

# VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO* CONGELADOS-DESCONGELADOS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO CON $\beta$ -MERCAPTOETANOL

## VIABILITY OF FROZEN-THAWED *IN VITRO* PRODUCED BOVINE EMBRYOS ON TWO DIFFERENT CULTURE MEDIA WITH $\beta$ -MERCAPTOETHANOL

Larocca, C., D. Fila, S. Kmaid, A. Fernández, I. Lago y G. Roses

Laboratorio de Trasplante de Embriones y Biotecnología. Facultad de Veterinaria. Lasplaces 1550. C.P. 11600. Montevideo. Uruguay.

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Cultivo de embriones. Transferencia de embriones.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Embryo culture. Embryo transfer.

### RESUMEN

El objetivo de este experimento fue examinar la influencia de dos medios en el desarrollo de embriones producidos por fertilización *in vitro* y congelados en un medio con 1,5 M de etilenglicol. 17 blastocitos tempranos, 46 blastocitos y 14 blastocitos expandidos de buena a excelente calidad fueron congelados en el día 7 posterior a la fecundación *in vitro*. Se utilizó como crioprotector 1,5 M de etilenglicol en mPBS suplementado con albúmina/ácido linoleico (40 mg/ml) y 0,1 M de sacarosa. Los embriones se equilibraron 15-20 minutos a temperatura ambiente (20 °C). Las pajuelas se colocaron directamente a -7 °C, a los 2 minutos se realizó el *seeding* y se mantuvo 10 minutos. Luego de 60-90 días, los embriones se descongelaron a temperatura ambiente durante 10 segundos y luego a 30 °C en baño de agua durante 30 segundos. Luego de 3 lavados en PBS más 10 p.100 de suero de ternero (CS) se formaron dos grupos con los embriones de distintos estadios. En un grupo se incluyeron en *CR1aa* (Rosenkrans *et*

*al.*, 1993) suplementado con 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) y 10 p.100 de suero fetal bovino (FCS), y el grupo control en *TCM 199* suplementado con 10 mM de  $\beta$ -ME y 10 p.100 de SFB. Se observaron a las 72 horas de cultivados a 5 p.100 de CO<sub>2</sub>, 38,5 °C de temperatura y 99 p.100 de humedad relativa. Se transfirieron 5 embriones en forma directa (no cultivados) a 3 receptoras.

El número de embriones desarrollados o eclosionados estuvo significativamente asociado con el estadio del desarrollo embrionario y el medio de cultivo *in vitro* ( $p < 0,01$ ). Entre los blastocitos tempranos hubo una mayor proporción de embriones desarrollados y eclosionados en *CR1aa* que en *TCM 199* (9/12 vs 1/5,  $p < 0,05$ ). En *TCM 199*, los blastocitos se desarrollaron en mayor proporción que en *CR1aa* (25/32, 1/5 y 4/9 respectivamente,  $p < 0,05$ ). Los resultados fueron analizados por el test de  $\chi^2$ .

Nosotros concluimos que el número de embriones eclosionados o desarrollados está aso-

ciados significativamente con el estado de desarrollo del embrión y éste con el medio de desarrollo.

are significantly associated with embryo stage and culture medium.

## SUMMARY

The objective of this experiment was to study the influence of two developing media on *in vitro* produced bovine embryos frozen in 1.5 M of ethilenglycol. Seventeen early blastocysts, 46 blastocysts and 14 expanded blastocysts of good to excellent quality were frozen on day 7 after *in vitro* fertilization. Ethilenglycol 1.5 M was used as cryoprotector in modified PBS supplemented with linolenic acid/albumin (40mg/ml) and 0.1 M of sucrose. Embryos were equilibrated 15-20 min. at room temperature (20 °C). Straws were transferred to -7 °C, after two minutes seeding was performed and a holding time of 10 minutes was kept. After 60-90 days, embryos were thawed in air for 10 sec and 30 °C in water bath during 30 sec. After 3 washings in PBS supplemented with 10 percent of calf serum (CS), embryos were divided into two groups for *in vitro* survival assesment. A group was cultured in CR1aa (Rosenkrans *et al.*, 1993) supplemented with 10 mM of  $\beta$ - mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) and 10 percent of fetal calf serum (FCS), and the control group in TCM 199 supplemented with 10 mM de  $\beta$ -ME and 10 percent of FCS. The embryos were cultured for 72 h in 5 percent CO<sub>2</sub>, 38.5 °C and 99 percent relative humidity.

Five embryos were directly transferred to 3 recipients. Number of developed or hatched were significantly associated with embryo developmental stage and *in vitro* culture medium ( $p < 0.01$ ). Among early blastocysts there was a higher proportion of developed hatched in CR1aa compared with TCM 199 (9/12 vs. 1/5,  $p < 0.05$ ). In TCM 199, blastocysts developed in a higher rate than in CR1aa (25/32, 1/5 and 4/9 respectively,  $p < 0.05$ ). The results were analyzed by  $\chi^2$  test. We concluded that the number of hatched or developed embryos after freezing and thawing

## INTRODUCCIÓN

La capacidad de los embriones obtenidos *in vitro* o *in vivo* para ser viables y culminar en terneros vivos, es muy importante a nivel de la producción comercial. Los métodos de congelación convencionales requieren la remoción del crioprotector en etapas y tienen sus inconvenientes en la actividad de campo debido a que el embrión es manipulado y expuesto. Leibo (1984,1986) desarrolló un método en una sola etapa en la cual el glicerol se remueve del embrión dentro de la propia pajuela que también tiene columnas de mPBS (fosfato buffer salino modificado por Dulbecco) con FCS (suero fetal bovino), donde se unen las columnas previamente a la transferencia directa. Han sido reportados varios métodos de implante directo con embriones bovinos congelados-descongelados (Massip *et al.*, 1987; Voelkel and Hu, 1992; Douchi *et al.*, 1995). El método de transferencia directa es más simple y permite evitar errores debido a que el embrión es manipulado y expuesto. Lo importante es evitar el daño osmótico para lo cual es necesario utilizar un crioprotector muy permeable como es el caso del etilenglicol (EG), que difundirá rápidamente hacia fuera cuando se coloca el embrión en medio isotónico o en el útero de la receptora. Takahashi *et al.* (1993), lograron el desarrollo *in vitro* de embriones madurados *in vitro* (IVM), fertilizados *in vitro* (IVF), sin necesidad de co-cultivo con células, median-

te la adición al medio de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME), un tiol de bajo peso molecular.

Tradicionalmente se ha trabajado con diversos medios en el desarrollo para probar la viabilidad de los embriones producidos *in vitro* congelados-descongelados. El medio utilizado mas frecuentemente fue el medio de cultivo de tejido 199 (TCM 199). En esta década, se han utilizado otros medios, entre los que encontramos de interés el CR1aa (Rosenkrans *et al.*, 1993), debido a que posibilita no utilizar células en co-cultivo. Este es un método práctico para cuando se descongelan embriones congelados ya que no obliga a tener células en cultivo.

El objetivo en este trabajo fue estudiar la viabilidad de los embriones producidos *in vitro* y congelados con EG en diferentes estadios, así como el desarrollo posterior en dos medios de cultivo conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### COLECCIÓN Y MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS

Los ovarios fueron obtenidos en un frigorífico cercano al laboratorio de FIV (1 hora) y transportados al mismo a 25-30 °C en solución salina fisiológica (0,9 p.100) con gentamicina (100  $\mu$ g/ml) (Lab. Herix, Uruguay).

Los folículos de 2-5 mm de diámetro fueron puncionados con una aguja hipodérmica 18G conectada a una jeringa de 5 ml para aspirar su contenido. Solo los ovocitos rodeados completamente por su cúmulus (3 capas o más de células) fueron utilizados para la maduración *in vitro* (IVM). Estos

fueron lavados 3 veces con fosfato buffer salino modificado por Dulbecco (mPBS, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10 p.100 de suero de ternero (CS) (Gibco Laboratories, Grand Island NY, USA). Para la maduración, los ovocitos fueron lavados dos veces en medio de cultivo tisular Hepes 199 (TCM 199), con sales de Earle (Gibco Laboratories, Grand Island NY, USA), antibióticos (100.000 UI/l de penicilina y 10 mg/l de estreptomina) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) y suplementado con 5 p.100 de FCS (suero fetal bovino) y madurados por 22-24 horas en ese medio. Los ovocitos fueron cultivados en gotas de 50  $\mu$ l (20-25 ovocitos/gota) cubiertas con aceite mineral estéril, a 38,5 °C con un 99 p.100 de humedad relativa y 5 p.100 de CO<sub>2</sub> en aire.

### PREPARACIÓN DEL SEMEN

Para el presente experimento fue utilizado semen congelado proveniente de un toro Holando de fertilidad probada *in vivo*.

Para la inseminación, dos pajuelas plásticas (IMV, Francia), de 0,25 ml. fueron descongeladas en baño térmico de agua a 37 °C por 20 segundos. El semen se lavó por centrifugación dos veces a 500 g durante 5 min con medio de Brackett y Oliphant (1975) modificado (mBO) sin glucosa y sin albúmina sérica bovina (BSA) y suplementado con 3,884 mg/ml de cafeína (Sigma Chemical St. Louis MO, USA) y 0,02 mg/ml de heparina (Sigma Chemical St. Louis MO, USA). La concentración del semen final fue ajustada a 12,5 millones de espermatozoides por ml con mBO de dilución conteniendo

20 mg/ml de BSA sin heparina ni cafeína (Larocca *et al.*, 1996).

#### CULTIVO *IN VITRO*

Los ovocitos incubados fueron retirados de las gotas de maduración, lavados en medio Bo de lavado de ovocitos (Brackett y Oliphant) conteniendo 10 mg/ml de BSA y llevados a las gotas de inseminación (20-25 ovocitos/gota) con una mínima cantidad de medio e incubados por cinco horas. Después de la fecundación *in vitro*, los ovocitos fueron lavados dos veces en TCM 199 e incluidos en las gotas originales de maduración. El medio de las gotas fue renovado parcialmente (50 p.100) cada 48 horas. Las observaciones fueron realizadas a las 48 horas para evaluar la tasa de división (CR) y cada 24 horas hasta el día 7 para el estudio de desarrollo a mórula, y/o blastocisto (M/B).

#### CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES

Se seleccionaron para la congelación blastocistos tempranos n=17 (EB), blastocistos n=46 (B), blastocistos expandidos n=14 (EB\*), de excelente calidad, en el día 7 post-fecundación *in vitro*. El crioprotector utilizado fue etilenglicol (EG) 1,5 M en PBS suplementado con sacarosa 0,1 M y albúmina\ácido linoleico (40 mg/ml). Después de equilibrar los embriones durante 15-20 min a temperatura ambiente (20 °C), fueron aspirados en la solución crioprotectora, dos embriones por pajuelas de 0,25 ml a temperatura ambiente.

Las pajuelas fueron colocadas directamente en una congeladora de embriones computerizada ET-1 (FHK,

Fujihira Industry CO.,LTD., Japón) con alcohol metílico a -7 °C. Dos minutos después, se realizó la siembra de pequeños cristales de hielo (*seeding*) tocando la columna del crioprotector al lado del extremo del algodón utilizando una fórceps enfriada previamente en nitrógeno líquido. Luego de que las pajuelas fueran mantenidas a esa temperatura durante 10 min, se congelaron a -0,3 C/min hasta llegar -30 °C y se colocaron en nitrógeno líquido.

Después de 60-90 días de congelados, las pajuelas con los embriones fueron descongelados a temperatura ambiente por 10 segundos y colocados en baño de agua de 30 °C durante 30 segundos. Los embriones fueron lavados tres veces y transferidos en PBS suplementado con 10 p.100 CS y antibióticos para su rehidratación.

Se formaron con los embriones de los distintos estadios dos grupos: Grupo CR1aa, el medio de desarrollo fue el CR1aa (Rosenkrans *et al.*, 1993) suplementado con 10 mM de  $\beta$ -ME (J.T.Baker Inc., USA) y 10 p.100 de suero fetal bovino (FCS); Grupo control, el medio fue Hepes TCM 199 suplementado con 10 p.100 de FCS y 10 mM de  $\beta$ -ME.

Para evaluar la viabilidad, los embriones fueron cultivados individualmente en el medio correspondiente en una caja de cultivo de tejido cubriendo las cavas con aceite mineral estéril por 72 horas a 38,5 °C, 5 p.100 CO<sub>2</sub> y 99 p.100 de humedad relativa.

Cada 24 horas los embriones fueron evaluados, y considerados viables si progresaban a etapas de desarrollo posterior con buena morfología. Los embriones que rompieron la zona pelúcida y salieron (eclosionados), los

## VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS *IN VITRO*

desarrollados y los degenerados fueron cuantificados en cada grupo.

Cinco embriones congelados-descongelados se transfirieron directamente (no se observó ni manipuló el embrión), por vía no quirúrgica a tres receptoras, en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo, sin dilución previa de los crioprotectores.

El diagnóstico de gestación se realizó a los 25 días de implantados los embriones por medio de un solo operador por estudio de ultrasonografía transrectal, con un escáner de modo B en tiempo completo provisto de un transductor lineal de 5MHz (Aloka Echocamera SSD 500, Tokio, Japón).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos finales fueron analizados usando el test de  $\chi^2$ .

### RESULTADOS

Los resultados se muestran en la

**tabla I**, el número de embriones desarrollados o eclosionados estuvo significativamente asociado ( $p < 0,01$ ) con el estadio inicial y el medio de desarrollo. En los EB constatamos una mayor proporción de desarrollados más eclosionados (D + E) en CR1aa que TCM 199 (9/12 vs. 1/5;  $p < 0,05$ ). En el TCM 199 los B presentaron mayor proporción de D + E que los EB y EB\* (25/32, 1/5, 4/9 respectivamente;  $p < 0,05$ ).

De los cinco embriones transferidos en forma directa (sin manipular el embrión previo al implante), en tres receptoras, se obtuvo una gestación (20 p.100) de la cual nació, en agosto de 1996, un ternero viable (**figura 1**).

### DISCUSIÓN

El éxito de producir embriones derivados de FIV congelados, es esencial para la aplicación comercial de esta tecnología, en particular si se pue-

**Tabla I.** Desarrollo de embriones *in vitro* descongelados en dos medios diferentes con  $\beta$ -ME. (*In vitro* development of embryos thawed in two different media with  $\beta$ -ME).

| Etapas del desarrollo   | Grupo  | n  | Desarrollados +           |                             |                          |                          |                |        |
|-------------------------|--------|----|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|--------|
|                         |        |    | Eclosionados<br>n (p.100) | Eclosionados +<br>n (p.100) | Degenerados<br>n (p.100) | Degenerados<br>n (p.100) |                |        |
| Blastocitos tempranos   | TCM199 | 5  | 0 <sup>a</sup>            | (0)                         | 1 <sup>a</sup>           | (20)                     | 4 <sup>a</sup> | (80)   |
|                         | CR1aa  | 12 | 4 <sup>a</sup>            | (33,3)                      | 9 <sup>b</sup>           | (75)                     | 3 <sup>a</sup> | (25)   |
| Blastocitos             | TCM199 | 32 | 17 <sup>a</sup>           | (53,1)                      | 25 <sup>b</sup>          | (78,1)                   | 7 <sup>a</sup> | (21,9) |
|                         | CR1aa  | 14 | 5 <sup>a</sup>            | (35,7)                      | 8 <sup>a</sup>           | (57,1)                   | 6 <sup>a</sup> | (42,9) |
| Blastocitos expandidos* | TCM199 | 9  | 3 <sup>a</sup>            | (33,3)                      | 4 <sup>a</sup>           | (44,4)                   | 5 <sup>a</sup> | (55,6) |
|                         | CR1aa  | 5  | 1 <sup>a</sup>            | (20)                        | 2 <sup>a</sup>           | (40)                     | 3 <sup>a</sup> | (60)   |

Para cada etapa de desarrollo, letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 1.** Diagnóstico de preñez del embrión *in vitro*. (Pregnancy diagnosis with *in vitro* embryo).

den utilizar métodos directos de transferencia. Es deseable reemplazar la BSA o el suero bovino en el medio de congelación para evitar transmisiones de enfermedades. Semple *et al.* (1995), demostraron que el suero bovino no es esencial para producir embriones *in vitro* que sobrevivan a la criopreservación. Luego de 72 h de cultivo para probar viabilidad de los embriones por desarrollo, se obtuvieron 58,7 p.100 y 51,6 p.100, sin suero y con suero respectivamente. Nosotros obtuvimos embriones eclosionados según los distintos estadios entre un 20 p.100 y 53,1 p.100, sin suero en la congelación (ver en la tabla entre Desarrollados + Eclosionados y Eclosionados).

Pollar y Leibo (1993), concluyen comparando embriones producidos *in vivo* e *in vitro*, que puede haber diferencias celulares entre estas dos cate-

gorías ante el proceso de congelación. El uso de la sacarosa como buffer fue descrito por Leibo y Mazur (1978).

En los diez últimos años el EG ha sido efectivamente empleado en embriones *in vivo* e *in vitro* porque permite la tranferencia directa de los embriones. Voelkel y Hu (1993), establecieron que una concentración de 1,5 M es la óptima. Suzuki *et al.* (1993), demostraron que no es necesario remover un 10 p.100 de EG previo a la transferencia directa; consideran que los rangos de preñez con EG 1,8 M son más altos: obtuvieron 74 p.100 de preñez con EG y en un rango de 30-48 p.100 de preñez con otros crioprotectores, planteando que el EG reduce el efecto tóxico asociado a la congelación.

Rosenkrans *et al.* (1993), comprobó utilizando el CR1aa que no era

## VIABILIDAD DE EMBRIONES BOVINOS *IN VITRO*

necesario el uso de células de co-cultivo. Nosotros no encontramos trabajos científicos con embriones de FIV descongelados y posteriormente desarrollados en CR1aa. Salamone *et al.* (1995), con embriones producidos con FIV frescos obtuvieron un 29,4 p.100 de mórulas y/o blastocistos en TCM 199, 8,6 p.100 en CR1aa con adición de BSA y 18,9 p.100 de CR1aa con adición de CS. Dochi (1993, comunicación personal) obtuvo mejores resultados en la viabilidad de embriones congelados-descongelados en CR1aa que en TCM 199.

El  $\beta$ -ME es un tiol que reduce el daño celular actuando como protector contra el efecto tóxico de la oxidación. Takahashi *et al.* (1993), con embriones frescos de FIV, utilizando TCM 199 más 10 p.100 de CS más 10 micro M de  $\beta$ -ME obtuvo 24,3 p.100 de desarrollo y 9,5 p.100 de eclosionados. En nuestro trabajo se obtuvo en CR1aa 75 p.100 de EB, 57,1 p.100 de B y 40 p.100 de EB\*, en D + E. En TCM 199 se obtuvo 20 p.100 de EB, 78,1 p.100 de B y 44,4 p.100 de EB\*, en D + E. Massip *et al.* (1982) han sugerido que los resultados con EB\* son más bajos que con B, estos resultados concuerdan con los nuestros.

Pollard y Leibo (1993), encontraron diferencias en embriones bovinos producidos *in vitro* e *in vivo* por su sensibilidad a bajas temperaturas con concentraciones de EG de 1,5 M. Ellos obtuvieron una viabilidad del 20 p.100

de embriones *in vitro* en TCM 199. Han *et al.* (1994), utilizaron como medios de cultivo, TCM 199 con monocapa de células de oviducto y fluido oviductal sintético, después de la descongelación no encontraron diferencias significativas en el desarrollo de B ni en su sobrevivencia. Estos autores obtuvieron un rango de sobrevivencia del 62 p.100 de B congelados en el día 7. En este trabajo obtuvimos un desarrollo de blastocistos del 53,1 p.100 en TCM 199 y 35,7 p.100 en CR1aa. En D+E obtuvimos 78,1 p.100 y 57,1 p.100 respectivamente en TCM 199 y CR1aa. Los más altos rangos los obtuvieron en EB\* mientras nosotros en B.

Leibo y Loskutoff (1993), plantean que el criterio final para cualquier procedimiento de reproducción asistida es la obtención de preñeces y posteriormente nacimientos de terneros viables. Dochi *et al.* (1995), con embriones de FIV congelados con 1,8 M de EG obtuvieron un 60 p.100 de gestación por transferencia directa. Nuestros resultados fueron más bajos, de un 20 p.100 de preñez. Zhang *et al.* (1992), con embriones de FIV congelados-descongelados con 1,5 M de EG obtuvieron un 26 p.100 de preñez con animales nacidos viables.

Se concluye que la viabilidad de embriones congelados-descongelados está significativamente asociada con el estado del embrión a la congelación y este con el medio de desarrollo.

## BIBLIOGRAFÍA

Douchi, D., K. Imai and H. Takakura. 1995. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine

embryos stored frozen in ethylene glycol. *Animal Reproduction*, 38: 179-185.

- Han, Y.M., H. Yamashima, N. Koyama, K.K. Lee and Y. Fukui. 1994. Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF derived bovine blastocysts cultured *in vitro* after freezing and thawing. *Theriogenology*, 42: 645-654.
- Larocca, C., J.E. Romano, J. Calvo, I. Lago, D. Fila, G. Roses, M. Viqueira, S. Kmaid and K. Imai. 1996. Relation between bulls and semen preparation on *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 45: 267.
- Leibo, S.P. 1984. A one step method for direct non-surgical transfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21: 767-790.
- Leibo, S.P. 1986. Comercial production of pregnancies from one step diluted frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 25: 186.
- Leibo, S.P. and N.M. Loskutoff. 1993. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 81-94.
- Leibo, S.P. and E. Mazur. 1978. Methods for the preservation of mamalian embryos by freezing. In: Daniel, J.C. (ed.) *Methods in mammalian reproduction*. Academic Press, New York. pp. 179-201.
- Massip, A., P. Van Der Zwalmem, C. Hanzen and F. Ectors. 1982. Fast freezing of cow embryos in French strows with an automatic program. *Theriogenology*, 18: 325-332.
- Massip, A., P. Van Der Zwalmem, and F. Ectors 1987. Recent progress in cryopreservation on cattle embryo. *Theriogenology*, 25: 69-79.
- Pollard, J.W. and S.P. Leibo. 1993. Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 287.
- Rosenkrans, C.F., G.Q. Zeng, G.T. Mcnamara, P.K. Schoff and N.L. First. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*, 49: 459-462.
- Salamone, D.F., A. Valdez and J.B. Barañao. 1995. Development of bovine IVF embryos in a CR-1 culture medium suplmented with albumin or serum. *Theriogenology*, 43: 312.
- Semple, M.E., K.J. Betteridge and S.P. Leibo. 1995. Cryopreservation of *in vitro* derived bovine embryos produced in a serum-free culture system. *Theriogenology*, 43:320.
- Suzuki, T., M. Takagi, M. Yamamoto, A. Boediono, S. Saha, H. Sakakibara and M. Oe. 1993. Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology*, 40: 651-659.
- Takahashi, M., T. Nagai, S. Hamano, M. Kuwayama, N. Okamura and A. Okano. 1993. Effect of thiol compounds on *in vitro* developmente and intracelular glutathion content of bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 49: 228-232.
- Voelkel, S.A. and Y.X. Hu. 1992. Direct tranfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37: 23-37.
- Zhang, L., D.L. Barry, R.S. Denniston, T.D. Butch and R.A. Godke. 1992. Successful transfer of frozen-thawed IVF-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 37: 331.

*Recibido: 1-7-96. Aceptado: 12-11-97.*

*Archivos de zootecnia vol. 47, núm. 177, p. 10.*