

LUIZ CARLOS TADEU CAPOVILLA

**VIABILIDADE TÉCNICA E ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE
GÊMEOS EM VACAS DA RAÇA NELORE PELA
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.**

Dissertação apresentada como requisito principal à
obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias,
Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal
do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki

CURITIBA

2000

AGRADECIMENTOS

- PROF. DR. LUIZ ERNANDES KOZICKI
Por ter acreditado, incentivado e orientado o presente trabalho de tese.

- PROF. DR. AMADEU BONA FILHO
Pelo auxílio, apoio e incentivo na área técnica

- LUIZ CARLOS SLIVAK
Pela amizade e cessão dos animais de sua propriedade.

- MARIA DA GRAÇA CAPOVILLA DE OLIVEIRA
Pelo incansável apoio logístico.

- DR^a MARITZA SANTOS VELLIOS
Pelo trabalho realizado no auxílio de procura, avaliação, classificação e congelamento dos embriões.

- DR. MAURÍCIO MEDEIROS CABRAL
Pelo apoio e amizade em todas as fases deste trabalho, sem o qual, provavelmente não teríamos êxito.

- VÍTOR DE OLIVEIRA
Pela amizade e cessão de materiais e equipamentos de computação.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
3. MATERIAL E MÉTODO	6
3.1 Local, instalações, manejo e alimentação	6
3.2 Animais	7
3.3 Sistemática dos cruzamentos	7
3.4 Etapas e Procedimentos	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
5. CONCLUSÃO	13
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1. Custo, em real (R\$), por vaca 1/2 Nelore x 1/2 Red Angus superovulada e coletada no processo de transferência embrionária. São José dos Pinhais (PR), 1998 . (n=5)	14
2. Custo do embrião, em real (R\$), em função do número de vacas coletadas, via transcervical. São José dos Pinhais (PR) – (R\$ - Outubro de 1998)	14
3. Custo, em real (R\$), por vaca receptora da raça Nelore inseminada e inovulada via transcervical. São José dos Pinhais (PR) – (R\$ - Outubro de 1998)	15
4. Custo, em real (R\$), do bezerro nascido em função do número de vacas doadoras coletadas. São José dos Pinhais (PR) – (R\$ - Outubro de 1998)	16
5. Custo do bezerro, em real (R\$), nascido em função do número de doses de sêmen utilizada. São José Pinhais (PR) – (R\$ - outubro de 1998)	17
6. Custo do bezerro, em real (E\$), nascido no programa de inseminação artificial mais implante de embrião. São José dos Pinhais (PR) – (R\$ - outubro de 1998)	17
7. Custo médio, em real (R\$), por vaca da raça Nelore por ano – (R\$ - outubro de 1998).....	17
8. Projeção de despesas e receitas, em Real (R\$), em função das taxas de nascimento em vacas nelore inseminadas. São José dos Pinhais (PR) – (R\$ - Outubro de 1998)	18
9. Projeção de despesas e receitas, em Real (R\$), em função das taxas de nascimento em vacas Nelore inseminadas e inovuladas. São José dos Pinhas (PR) – (R\$ - Outubro de 1998).....	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acre
AM	Amazonas
AP	Amapá
BA	Bahia
BSA	Albumina bovina sérica
CE	Ceará
CL	Corpo Lúteo
CNPGC	Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte
D ₀	Dia Zero
D ₅	5º dia
D ₇	7º dia
DF	Distrito Federal
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ES	Espírito Santo
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GO	Goiás
IA	Inseminação artificial
IE	Implante de embrião
IMV	Instrumentos Médico Veterinário
LH	Hormônio Luteinizante
M	Molar
MA	Maranhão
MG	Minas Gerais
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
PA	Pará
PB	Paraíba
PBS	Solução salina tamponada
PE	Pernambuco
PI	Piauí
PMSG	Gonadotrofina sérica de égua prenhe
PR	Paraná
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
RO	Rondônia
RR	Roraima
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
SE	Sergipe
SP	São Paulo
TE	Transferência de embriões
TO	Tocantins

RESUMO

Com o objetivo de se produzir gestação gemelar em bovinos de corte, à nível comercial, foram utilizadas cinco vacas 1/2 Nelore x 1/2 Red Angus, ciclando naturalmente. As vacas foram sincronizadas, empregando-se implante de Norgestomet (3 mg) e simultaneamente usou-se 3 mg de Norgestomet e 5 mg de Valerato de Estradiol injetável no dia 0. No 5º dia iniciou-se a superovulação usando-se 350 UI de FSH em doses decrescentes durante 4 dias. No 7º dia retirou-se o implante e 50 e 60 horas após foram feitas as IA com sêmen de touro para pelagem vermelha (Limousin). Sete dias após a 1ª IA as vacas foram coletadas, usando-se catéter, equipo de coleta e filtro para embriões descartáveis. Este material foi reutilizado para coletar as 5 doadoras. Foram coletados e congelados 34 embriões viáveis, obtendo-se a média de 6,8 por doadora. Trinta e quatro vacas da raça Nelore foram inseminadas com sêmen de Aberdeen Angus no cio natural e 7 dias após esses animais receberam 1 embrião inovulado via transcervical no corno contralateral ao ovário com CL. Com esta sistemática as vacas que pariram bezerros com pelagem preta eram frutos da IA e os de pelagem vermelha da inovulação embrionária. Das parturições, 12 vacas geraram somente bezerro de pelagem preta (35,3%), 3 vacas pariram somente bezerro de pelagem vermelha (8,9%), 13 vacas pariram bezerro de pelagem vermelha e bezerro de pelagem preta (38,2%), 4 vacas tiveram abortamento entre o 6º e 7º mês (11,7%); dessas vacas, 2 abortaram 2 bezerros cada uma e 2 abortaram somente 1. Duas vacas estavam vazias no 45º dia após a inovulação embrionária (5,9%). Obteve-se 25 bezerros oriundos da IA (pelagem preta) (73,53%) e 16 bezerros da IE (pelagem vermelha) (47,05%). O total de bezerros nascidos foi de 41 (= taxa de natalidade 120,58%). Ao final do 4º mês de observação dos bezerros nascidos, restaram 36 (105,58%); supõe-se que se no experimento fossem utilizadas matrizes receptoras com maior aptidão leiteira, essa mortalidade teria sido evitada, em função da baixa produção leiteira da raça Nelore. Concluiu-se que a produção de prenhez gemelar em bovinos de corte à nível comercial é viável técnica e economicamente, desde que utilize-se touros reprodutores que gerem bezerros relativamente pequenos.

ABSTRACT

In order to produce gemelar gestation in beef commercial herd, 5 cows 1/2 Nelore x 1/2 Red Angus, naturally cycling were utilized. The cows were synchronized using implants of norgestomet (3 mg) plus injection of 3 mg of Norgestomet and 5 mg of Estradiol Valerat in D0. In D5 Superovulation was initiated using 350 UI of FSH in decreasing doses during 4 days. In D7 the implant was removed and 50 and 60 hours later AI was done with semen of bulls of red hair (Limousin). Seven days after the first AI the cows were flushed using disposable catheter, equipo and filter for embryos. This material was utilized to collect the 5 donors. Thirty four viable embryos were collected and frozen, average 6,8 per dam. Thirty-four Nelore cows were inseminated with semen from Aberdeen Angus in the natural heat and seven days later these animals were inoulated with one embryo in the contralateral horn to the CL. Therefore black calves resulted from AI, where as red calves resulted from ET. Twelve cows produced only black colored calves (35,3%), 3 cows only delivered red calves (8,9%), 13 cows produced both, black and red colored calves (38,2%); 4 cows had abortion between 6^o and 7^o month (11,7%), of which 2 cows aborted 2 products each one and 2 cows only 1 product each. Two cows were open in the 45^o day after the embryo inoulation (5,9%). Twenty five calves were obtained from AI (black color) (73,53%) and 16 products from ET (red color) (47,05%). The total of products was 41 (= birth rate 120,58%). In the end of 4^o month of observation of the products, the total was 36 (105,58%). We suppose that if in this experiment we utilized recipients cows with higher milk production, this mortality could be reduced, as it is probably due to the low milk production of the Nelore breed. It was concluded that, the production of gemelar gestation in beef cows is possible technically and economically, but it is necessary to utilize bulls which produce relatively small calves.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte, principalmente no Brasil Central, caracteriza-se por explorar o sistema de criação extensiva predominantemente com gado zebuino, apresentando na maioria das vezes sofríveis índices zootécnicos, ressaltando-se a baixa taxa de natalidade, desmama e abate, e elevada idade ao primeiro parto e longo intervalo entre partos (EMBRAPA, 1996).

Nas últimas décadas com a importação de novas raças européias especializadas na produção de carne, iniciou-se o chamado cruzamento industrial. Porém a quantidade dos produtos gerados a partir dessa biotecnologia na pecuária, demonstra que ainda há muito por fazer, para se elevar os índices de produtividade e de desfrute desse rebanho. Conforme a FNP, Consultoria & Comércio (1998), verifica-se que apenas 14,0 % do rebanho nacional brasileiro emprega cruzamentos industriais.

Esses dados demonstram a maneira equivocada da exploração pecuária, onde os animais engordam e emagrecem conforme a disponibilidade de alimentos, somando-se a isso inclusive problemas de sanidade. Esse tipo de pecuária acarretou efeitos danosos a atividade, levando-a à beira da falência, pois atualmente os pecuaristas, em sua grande maioria, encontram-se descapitalizados, e suas pastagens estão degradadas, havendo a necessidade imperiosa de manutenção de máquinas e estruturas da propriedade. A carne daí gerada, por outro lado, não oferece um elevado predicado de qualidade ao mercado consumidor, que está sistematicamente mais exigente. Esses aspectos estão relacionados ao rebanho comercial.

Entretanto um promissor panorama é vislumbrado dentro da pecuária nacional de corte (rebanhos puros), ao utilizar-se significativa tecnologia de ponta na área da reprodução animal, aliada a programas nutricionais avançados e a elevada seleção genética dentre as muitas raças bovinas existentes no Brasil

Os aspectos positivos estão relacionados à biotecnologia empregada em rebanhos puros, enfocando aqui a área de reprodução animal, na qual procedimentos como: coleta e congelamento de sêmen, inseminação artificial, superovulação, sincronização de cio, coleta e congelamento de embriões, implantes

em receptoras, ultrasonografia dentre outras, já fazem parte do manejo reprodutivo de rebanhos de gado puro.

Por outro lado vários aspectos adversos não permitem o emprego das tecnologias em um rebanho comercial, à exceção da inseminação artificial (IA), atingindo contudo, ínfimo percentual de 2,0 % do rebanho nacional, conseguindo-se ainda assim alguma melhoria da performance de produtividade.

Face a esses fatores, o presente trabalho de pesquisa reveste-se de significativa importância pelo seu caráter inédito e pioneiro no Brasil.

Assim numa tarefa ousada e dispendiosa de rebanhos bovinos comerciais de corte para a execução desse experimento, objetivou-se mediante o emprego da transferência de embrião (TE), buscar a viabilidade técnica e econômica para produzir gestação gemelar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A técnica de transferência de embrião foi implementada no Brasil no final da década de 70. Ela pode ser aplicada numa série de áreas importantes, dentre as quais destacam-se: o melhoramento genético animal, a melhoria dos testes de progênie bem como a redução dos custos desses testes, a prevenção da disseminação de doenças infecciosas e é de fundamental utilidade às pesquisas (MAPLETOFT, 1995). A TE permite uma mais rápida expansão e distribuição de genética superior, levando aos criatórios um melhoramento genético significativo. É com essa preponderante intenção que a TE é vista atualmente a nível mundial (McDONALD, 1989).

A TE pode revestir-se de importantíssimo valor comercial e ser economicamente viável, se for realizada explorando-se animais selecionados dentre os 10% melhores de cada rebanho (SEIDEL, 1991). Dependendo do preço do embrião e do índice de prenhez, o custo de produção de bezerros empregando-se a TE, alcança cifras entre 30 e 60% mais baratas do que criar as bezerras (RIHA *et al.* 1998).

Tecnicamente para se conhecer quando os animais estão aptos a integrarem um programa de TE, deve-se prioritariamente avaliar a fertilidade das

fêmeas mediante estudo do seu passado reprodutivo, observação visual, palpação retal e vaginoscopia (MUNAR *et al.* 1990).

Aspectos ligados à nutrição animal e ao clima, são importantes indicadores de que as respostas ovulatórias de uma doadora podem ser afetadas negativamente, por uma diminuição da qualidade da forragem e pelo estresse térmico, conforme relatos de CUENCA e BOTTARO (1995). As vacas doadoras devem estar em bom estado corporal e ganhando peso no início e durante o programa de TE (CUENCA e BOTTARO, 1995).

Ao se superovular as doadoras, estando elas ciclando, pode-se desconsiderar o dia do estro ao se utilizar implantes de progestágeno (FRARE *et al.* 1998). Segundo ALVAREZ *et al.* (1973) pode-se reduzir o excesso de manejo das doadoras, empregando-se uma única dose subcutânea de hormônio folículo estimulante (FSH), ao invés de duas aplicações diárias durante quatro dias.

Em pesquisas realizadas na década de noventa os resultados das superovulações demonstraram que a aplicação de uma única injeção subcutânea de FSH, atrás da escápula e distante 30 cm da cernelha é superior (YAMAMOTO *et al.* 1992) ou semelhante (MISRA *et al.* 1992; BO *et al.* 1994) ao método tradicional de várias aplicações. Segundo HOCKLEY *et al.* (1992) para que uma aplicação subcutânea única possa funcionar bem, é necessário que o animal apresente uma camada razoável de gordura subcutânea. A injeção subcutânea de hormônios determina menor resposta superovulatória em gado leiteiro, porque estes possuem maior deposição de gordura abdominal do que subcutânea (BO *et al.* 1994).

Dados relativos à superovulação propriamente dita e a obtenção média de embriões viáveis por superovulação são relatados por ROMMEL e KÖNIG (1988) 5,80 e por LOONEY *et al.* (1988) 11,6.

McINTOSH e HAZELEGER(1994), VOELKEL e HU (1992), FUHRER *et al.* (1995), LANGE (1995), VISINTIN *et al.* (1995), NISHIGAI *et al.*(1999) relatam a obtenção de 59%, 50%, 50%, 58,2 %, 46% e 62% de prenhez respectivamente, ao implantarem um embrião por receptora.

A importância em aumentar a incidência de gestação gemelar em bovinos, particularmente em gado de corte, reveste-se de grande importância e tem sido tentado por vários pesquisadores. As tentativas de se produzir gêmeos por

administração de gonadotrofinas têm entretanto encontrado limitado sucesso, devido a extrema variação individual à resposta ovariana. Uma alternativa mais plausível e onde pode-se controlar a produção de gêmeos, é através da transferência de dois embriões, como relatam ROWSON *et al.* (1969).

Os nascimentos gemelares são naturalmente pouco freqüentes, segundo GRUNERT e BIRGEL (1982) alcançando a cifra de 2% e são resultado de dois mecanismos diferentes: os heterozigóticos oriundos de dois ovócitos no mesmo estro e fecundados por dois espermatozóides diferentes variando sua freqüência segundo as raças entre 0,93% e 4,47% (HANCOCK, 1954). Especificamente para a raça Charolesa o percentual atinge 3,35% (MENISSIER e FREBLIC, 1974), e os monozigóticos que são produtos de divisão natural de um embrião.

Relativamente em um significativo número de criatórios foi encontrada tendência do touro e da vaca em contribuir ao aumento da incidência de gestações gemelares entre as filhas. Em levantamento de 30 anos, dos 7387 partos acompanhados, 4,2% foram múltiplos (ERB e ANDERSON, 1960).

Quanto aos gêmeos monozigóticos (duplicação do mesmo embrião), JOHANSSON *et al.* (1974) observaram a freqüência natural de 0,14 a 0,44%. Segundo ANDERSON (1978) há várias maneiras de se obter gestação gemelar: através da seleção genética; do tratamento hormonal com gonadotrofinas exógenas e da transferência de embriões.

Os nascimentos heterozigóticos podem ser aumentados experimentalmente seja pela superovulação com hormônios gonadotrópicos (MAULEON, 1970), seja pela transferência uterina de dois embriões (TESTART *et al.* 1975; GORDON e BOLAND, 1977). A transferência de hemi-embrião resulta em 1,2 gestações por embrião original (TAKEDA *et al.* 1986), VOELKEL *et al.* (1984), dividiram uma mórula em quatro partes iguais e após transferência para quatro receptoras obtiveram duas gestações.

BACKER *et al.* (1984), trabalhando com embriões bovinos obtiveram a taxa de 43% de gestação, após transferência de um hemi-embrião por receptora.

A transferência de um embrião para cada corno uterino de uma vaca não coberta ou de um segundo zigoto para o corno contralateral ao corpo lúteo (CL) de uma vaca receptora que foi fertilizada há poucos dias atrás, é mais eficiente do que

a simples ovulação para a produção de gêmeos em bovinos (ROWSON *et al.* 1971; ANDERSON, 1978). Sete de oito embriões, após descongelamento, foram bipartidos e transferidos para sete receptoras sincronizadas, resultando que três dessas receptoras pariram 5 bezerros, sendo dois bezerros gêmeos monozigóticos (WANG *et al.* 1995). Vinte e seis de 43 animais que receberam um embrião de nível 1 (N1), sete dias após a inseminação artificial (IA), engravidaram; destas, dezito produziram gêmeos e oito pariram somente um bezerro; dos dezessete animais, que receberam um embrião nível 2 (N2), doze ficaram prenhes e duas produziram gêmeos (FABARO *et al.* 1998)

Quando adota-se a sistemática de se fazer a IA mais a TE depois de 7 dias, há a tendência do índice de gestação ser mais elevado do que o simples implante de embriões (SUZUKI *et al.* 1996).

DYMNICKI *et al.* (1998) obtiveram com embriões frescos transferidos para o mesmo corno, 50% de gestação versus 75% quando transferidos cada um para um corno. Um embrião foi transferido para cada corno uterino de novilhas sincronizadas, obtendo-se 75% de prenhez e destas 53% ficaram prenhes de gêmeos (ANDERSON *et al.* 1976)

Seis vacas receptoras foram inseminadas no cio natural e cinco dias após, receberam um embrião no corno contralateral ao CL; cinco ficaram prenhes e dessas, duas pariram gêmeos dentro do período normal de gestação (278 e 283 dias). Esses dois animais eliminaram a placenta dentro do período fisiológico (BOLAND *et al.* 1976).

Segundo um trabalho comparativo, vacas que pariram gêmeos após TE perderam 15% de seus produtos e tiveram a taxa de sobrevivência de 85% contra 5% de perda e 95% de sobrevivência nas que pariram somente um bezerro (SMEATON *et al.* 1998).

TESTART *et al.* (1975) idealizaram um experimento para produzir gestações gemelares implantando um embrião ao útero de dezessete vacas presumidamente prenhes através de IA cinco a dez dias antes. O embrião foi colocado no corno contralateral ao corpo lúteo e os embriões tinham 6 a 8 dias. As gestações gemelares ocorreram em três das oito receptoras prenhes. Na tentativa

de produzir gestação gemelar TURMAN *et al.* (1971) trataram 81 vacas com 1.500 UI de gonadotrofina sérica da égua prenhe (PMSG); 52 vacas foram fertilizadas e dessas 29 pariram um bezerro e 23 apresentaram gestação múltipla, sendo 12 gemelar; 8 tripla; 2 quádrupla e 1 quántupla; nenhum gêmeo foi perdido no nascimento, mas a perda de triplos, quádruplos e quántuplos foi de 54%. Não se associou a gestação múltipla com o aumento da dificuldade de parturição. Quarenta e oito por cento dos animais que produziram múltiplos tiveram retenção de placenta.

Semelhantemente JOHNSON *et al.* (1975) trataram 65 vacas com PMSG em diferentes esquemas de dosagens, produzindo 12 gestações múltiplas sendo 7 fetos duplos, 4 triplos e 1 quádruplo.

Dados relativos ao desenvolvimento corporal dos animais nascidos de gestação única ou gemelar, dão conta de que 350 bezerros nascidos de gestação única e 250 nascidos de gestação gemelar, foram comparados submetendo-os ao mesmo regime alimentar em doze medidas lineares a cada três meses de intervalo até 36 meses de idade e 2/3 deles foram acompanhados no seu desenvolvimento, até quarenta e oito meses. Concluiu-se que não houve aparente efeito sobre a maturidade e as diferenças declinaram a zero em torno dos dois anos (RUSSEL, 1976).

A possibilidade de seleção, para obtenção de gestações gemelares, é baixa, em função da baixa herdabilidade, repetibilidade e pequena variância. Entre os anos de 1931 a 1946 foram assinaladas 937 gestações múltiplas, sendo que dessas 3,95% eram de gêmeos e 0,21% eram triplos, totalizando 4,16%, ou seja, um duplo em cada 25, 3 parturições e um triplo em cada 468,5. A mortalidade de bezerros pós nascimento foi de 22, 6% em contraste com 9,6% do rebanho total (RUTLEDGE, 1975).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 LOCAL, INSTALAÇÕES, MANEJO E ALIMENTAÇÃO.

O trabalho foi desenvolvido na Fazenda Vô João, localizada no município de São José dos Pinhais (PR), durante o ano de 1998 e 1999.

Os animais eram mantidos no inverno (maio a setembro) em pasto de aveia e silagem de milho contendo 2% de uréia e no verão (outubro a abril) em pasto de milho e silagem de milho contendo 2% de uréia

Para a realização deste experimento foram utilizadas as seguintes instalações: uma mangueira contendo tronco de contenção onde eram efetuadas as IA, coletas e as inovulações dos embriões, um pequeno cômodo (readequado para laboratório) onde estava disponibilizada a aparelhagem necessária para realização da procura, isolamento, seleção e congelamento dos embriões.

3.2 ANIMAIS

Os animais (tanto as doadoras como as receptoras) encontravam-se com escore da condição corporal entre 3 e 3,5 e ganhando peso.

Foram selecionadas através de avaliação minuciosa das condições reprodutivas (exame ginecológico completo, além de exames complementares tais como brucelose e tuberculose), 1200 matrizes que entrariam na estação de monta pré estabelecida. As matrizes que apresentaram qualquer tipo de problema foram descartadas. Os animais incluídos no trabalho receberam as vacinas necessárias. Com isso obteve-se em determinados dias do início da estação reprodutiva, aproximadamente 40 a 50 vacas ciclando naturalmente.

Igualmente foram utilizadas 05 vacas cruzadas 1/2 Nelore x 1/2 Red Angus, previamente selecionadas, para serem integradas ao programa, como produtoras de embriões e foi feita a projeção para 1, 15 e 20 vacas coletadas no mesmo dia.

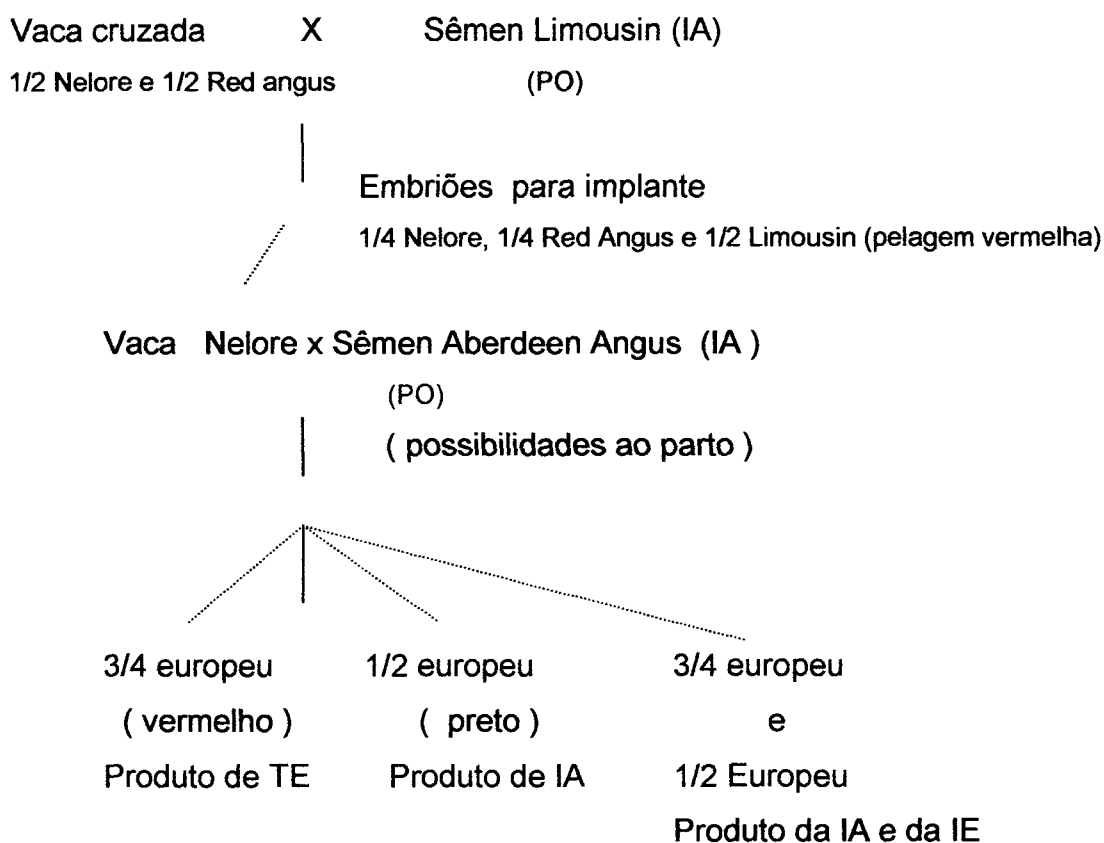
3.3 SISTEMÁTICA DOS CRUZAMENTOS.

As vacas cruzadas (doadoras de embriões) após superovuladas foram inseminadas com sêmen de touros da raça Limousin com a finalidade de se obter embriões 3/4 de sangue europeu e apresentando pelagem vermelha.

Os embriões obtidos eram então implantados em vacas Nelore, após terem sido inseminadas com sêmen de touros da raça Aberdeen Angus. Desta maneira, a vaca Nelore que produzisse um bezerro preto, este seria produto da IA e a matriz

que produzisse um bezerro vermelho, este seria produto do implante de embrião e a vaca que gerasse dois bezerros, os produtos seriam frutos tanto da IA como também do implante embrionário realizado.

O esquema abaixo demonstra essa situação.



3.4 ETAPAS E PROCEDIMENTOS.

1ª - Etapa

Procedimentos nas doadoras (coleta)

Os procedimentos tiveram início com as 05 vacas cruzadas (1/2 Nelore x 1/2 Red Angus) as quais foram submetidas ao processo de sincronização de estro, superovulação e IA (touro Limousin) para posterior coleta. Optou-se por essas raças para se obter bezerros menores ao nascimento, evitando-se assim futuros problemas de parturição. Os procedimentos foram assim efetuados:O processo de

sincronização de estro foi realizado com o uso de um implante subcutâneo auricular de Progestágeno Sintético¹.

O processo da superovulação foi iniciado no 5º dia após o implante do progestágeno e foi efetuado com o uso de 350 UI de Gonadotrofina Hipofisária Suína² durante 4 dias seguidos, em doses decrescentes, com duas aplicações (IM) diárias como segue:

1 °. Dia - 140 UI sendo 70 UI pela manhã e 70 UI à tarde

2 °. Dia - 90 UI sendo 45 UI pela manhã e 45 UI à tarde

3 °. Dia - 70 UI sendo 35 UI pela manhã e 35 UI à tarde (dia da retirada do implante do Progestágeno)

4 °. Dia - 50 UI sendo 25 UI pela manhã e 25 UI à tarde

A primeira IA foi realizada às 50 horas e a segunda às 60 horas após a remoção do progestágeno, sem a observação de cio, utilizando-se uma dose de sêmen em cada IA. A coleta dos embriões ocorreu sete dias após a primeira inseminação artificial.

Em seguida realizou-se a seleção e a classificação dos embriões, segundo o estágio de desenvolvimento de acordo com o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.

Os embriões após sua classificação, quanto ao grau de desenvolvimento e qualidade, foram imediatamente congelados em Etileno Glicol 1.5 M para posterior transferência direta. Somente os embriões classificados como : mórula, mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto nível 1 e nível 2, foram congelados.

2º - Etapa

Procedimentos nas receptoras (implante)

Os procedimentos tiveram início com as trinta e quatro (34) vacas Nelore que foram inseminadas em um mesmo dia, dentre as quarenta e duas (42) disponíveis. Os procedimentos foram os seguintes: identificação de cio, inseminação artificial e a inovulação embrionária, com inovulador e bainha para inovulação IMV

1. Crestar® (Implante = 3mg de Norgestomet e os 2 ml injetáveis = 3mg de Nosgestonet + 5 mg de Valerato de Estradiol) - Droga da Firma Intervet
Pluset® - Droga da Firma Serono

no corno contra-lateral ao corpo lúteo, constatado através de palpação retal, no 7º dia após a inseminação artificial.

Para a identificação do cio empregou-se rufiões com buçal marcador, permanecendo os rufiões entre as matrizes, em proporção de um para sessenta. A observação para o aparte das matrizes marcadas em cio, ocorria duas vezes ao dia, tendo a duração de uma hora pela manhã (8 às 9 horas) e a outra à tarde (16 às 17 horas).

A sistemática da inseminação artificial ocorreu da seguinte maneira: as vacas identificadas no período matutino eram inseminadas à tarde (após às 17:30 horas) e as identificadas à tarde eram inseminadas na manhã do dia seguinte (após às 7:00 horas).

O implante do embrião era realizado sete dias após a primeira inseminação e o método utilizado foi o não cirúrgico, sendo o material lavado em PBS e reutilizado para os trinta e quatro implantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das cinco vacas doadoras cruzadas e que foram coletadas, obteve-se 34 embriões viáveis, de acordo com a classificação desejada, perfazendo a produção média de 6,8 embriões por animal.

Das 34 vacas Nelore que foram inseminadas com sêmen de Aberdeen Angus e posteriormente implantado embriões three-Cross (Nelore x Red angus) x Limousin , obteve-se os seguintes resultados: vacas que conceberam somente da inseminação artificial (bezerro de pelagem preta) foram 12 matrizes, correspondendo a 35,3 % do total de matrizes do programa; vacas que conceberam somente do implante de embrião (bezerro de pelagem vermelha) foram 3 matrizes, correspondendo a 8,9 % do total; vacas que conceberam tanto da inseminação artificial como do implante de embrião (bezerro de pelagem preta e bezerro de pelagem vermelha), 13 matrizes correspondendo a 38,2 % do total; vacas que abortaram entre o sexto e o sétimo mês de gestação: 4 vacas (11,7 % do total) e vacas vazias após o diagnóstico de gestação por palpação retal: 2 matrizes (5,9 % do total); total de produtos da IA: 25 animais, alcançando o índice de natalidade de

73,53%; total de produtos do implante de embrião (IE): 16 animais, perfazendo o índice de natalidade de 47,05 %; total de produtos nascidos no programa: 41 animais, alcançando a taxa de natalidade de 120,58 %.

Nosso índice situa-se portanto superior aos de FABARO et al. (1998) e aos de BOLAND et al. (1976), os quais obtiveram o índice de 97,67% e 116,66% de taxa de nascimento respectivamente. Ainda relativamente ao trabalho desses autores supracitados, não consta que eles acompanharam os bezerros nascidos para verificação da taxa final de natalidade.

Total de produtos, passado o período de observação de quatro meses, 36 animais. Nesta fase ocorreu um alto índice de mortalidade 12,19% dos nascidos, determinando assim uma taxa final de natalidade de 105,58 %.

Os custos estão projetados para lotes de 15 e 20 animais, no processo de coleta de embriões por dia, sendo essa a quantidade suportável da capacidade de somente dois técnicos, para se obter o máximo de eficiência econômica.

Considerando os dados obtidos de 6,8 embriões viáveis por vaca, teríamos disponíveis 102 ou 136 embriões para futuro implante, se coletássemos 15 ou 20 vacas, respectivamente. Outro fator importante no processo é a não identificação dos embriões colhidos, tornando possível a reutilização do material de coleta por várias vezes.

Podemos observar na tabela 1, que o custo para coleta dos embriões está em função do número de vacas coletadas durante um dia de serviço de dois técnicos especializados, um realizando a coleta e posterior inovulação e o segundo procurando, classificando, envasando e congelando os embriões. Dessa maneira é possível coletar até 20 vacas por dia, aplicando-se a metodologia, favorecendo a reutilização dos materiais de coleta, visto não ser necessário identificar os embriões colhidos. Estes são os dois fatores preponderantes para viabilizar economicamente a técnica empregada. Ressalte-se que nessa metodologia evita-se a 2ª inseminação artificial.

Considerando que o índice de aproveitamento do implante é maior que o índice alcançado com uma segunda inseminação no próximo cio, o processo utilizado, mesmo considerando que o custo do embrião é maior que o do sêmen, ainda assim torna-se viável economicamente.

O custo de produção dos embriões, está em função do número total de embriões viáveis colhidos durante um dia de trabalho dos técnicos especializados (Tabela 2). Observa-se nesse experimento que a produção média de embriões por vaca está dentro dos padrões normais corroborando com relatos de HAFEZ (1995), cuja produção média por vaca gira em torno de sete embriões viáveis, tornando assim os custos compatíveis com o processo.

A tabela 5 mostra o custo do bezerro nascido, em função do número de doses de sêmen utilizadas e do índice de concepção e na tabela 6 observa-se o custo do bezerro nascido no programa de IA + IE em função do número de vacas coletadas e o respectivo índice de nascimento, situando-se dentro dos padrões fisiológicos, confirmando dados de NOAKES (1991), afirmando que a taxa de não retorno à IA, está em torno de 70 a 80 %, e a taxa de prenhez através do implante embrionário gira em torno de 40 a 60 %.

Outros pontos a considerar foram o relativo aumento da porcentagem de abortos (11,7 %), sobre a qual não encontramos fundamento para o achado deste dado em função de que ocorreu o abortamento em duas matrizes com gestação gemelar e em duas com gestação simples, e uma porcentagem de vacas vazias (5,9 %) que impediram uma melhor taxa de prenhez. Entretanto a taxa de nascimento observada foi relevante (120,5 %), se comparada ao índice de 80% obtido nas propriedades controladas, mesmo considerando a mortalidade de bezerros de 12,19%; deste percentual, apenas 7,3% foram de gestação gemelar; esses dados de mortalidade de bezerros são inferiores aos relatados por SMEATON et al. 1998. Mesmo assim a porcentagem de bezerros obtidos no programa foi significativa (105,5 %), viabilizando economicamente o processo, como observa-se nas tabelas a seguir.

A tabela 4 mostra o custo do bezerro nascido após o período de observação, que foi de 4 meses, considerando o custo do embrião e o processo de inseminação e posterior implante nas receptoras. Esses valores são animadores quando comparamos o custo da IA em função do número de doses usadas e no programa IA + IE e a taxa de nascimento alcançada, como é demonstrado na tabela 5 e 6. Nessas pode-se observar que o menor custo do bezerro nascido está em

função do número de doses usadas na IA e na IA + IE. Entretanto a medida que aumenta-se a taxa de nascimento, há um decréscimo no custo do bezerro nascido.

Observa-se conseqüentemente que o número de bezerros nascidos, interfere na composição da planilha de custo total, porém o número de bezerros produzidos passa a ser o principal componente de lucratividade do sistema adotado, como mostram as tabelas seguintes.

A tabela 7 mostra o custo médio de uma vaca por ano e é apresentada em função de que seus dados participam das tabelas 8 e 9. Nessas pode-se observar que através de uma projeção econômica, ao equacionarmos despesas e receitas, o melhor saldo, e principalmente, a melhor rentabilidade por vaca, é obtida quando trabalhamos com maior número de vacas coletadas, obtendo-se maior número de bezerros.

Seria de grande importância conhecer-se, se os intervalos entre partos dos animais trabalhados e que produziram gêmeos, é maior ou similar aos que geraram um único bezerro. Deve-se ressaltar que não ocorreram distocias fetal ou maternal bem como *Retentio secundinarum*.

Em função da existência de estação de monta no gado de corte trabalhado, esse intervalo entre partos não seria prejudicado.

5. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos nesse experimento e na metodologia utilizada, conclui-se que:

- é possível, técnica e economicamente produzir gestação gemelar em vacas de corte em rebanhos comerciais, através da técnica da IA e transferência de embrião como a adotada nesse trabalho.
- Considerando-se o fato de haver escassos trabalhos publicados sobre a produção de gestação gemelar em bovinos, torna-se evidente a necessidade de se desenvolver novos trabalhos nessa linha e com raças bovinas de corte com maior aptidão leiteira do que a utilizada no presente experimento.

TABELA 1 CUSTO, EM REAL (R\$), POR VACA 1/2 NELORE X 1/2 RED ANGUS SUPEROVULADA E COLETADA NO PROCESSO DE TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA. SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR), 1998 - (n=5)

N.º DE VACAS	CUSTO EM R\$ PARA:			
	DADOS REAIS	DADOS PROJETADOS		
	5	1	15	20
Crestar (implante e injeção)	60,00	12,00	180,00	240,00
Pluset	108,50	21,70	325,50	434,00
Sêmen - 2 doses	50,00	10,00	150,00	200,00
Custo - IA (Mão obra, material, Inseminador)	50,00	10,00	150,00	200,00
Solução de lavagem (PBS)	12,00	2,40	36,00	48,00
Sonda de Folley	3,00	3,00	3,00	3,00
Equipo de coleta	4,00	4,00	4,00	4,00
Filtro	10,00	10,00	10,00	10,00
Outros : (anestésico, seringa, etc.)	4,00	0,80	12,00	16,00
Mão de obra técnica (diária : R\$ 200,00)	***200,00	*100,00	**400,00	**400,00
Custo de congelamento	1,50	0,30	4,50	6,00
SUBTOTAL	503,00	174,20	1.275,00	1.561,00
Custo por vaca coletada, considerando-se a quantidade de animais	100,60	174,20	85,00	78,05

OBS.: * 1/2 diária de um técnico especializado.
 OBS.: ** 1 diária para dois técnicos especializados.
 OBS.: *** 1 diária para um técnico especializado.

TABELA 2 CUSTO DO EMBRIÃO, EM REAL (R\$), EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VACAS COLETADAS, VIA TRANSCERVICAL. SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR), (R\$ - OUTUBRO DE 1998)

Nº DE VACAS	VACAS COLETADAS	PROJEÇÃO PARA:		
	5	1	15	20
Custo de coleta (R\$)	503,00	174,20	1.275,00	1.561,00
Embriões produzidos	34	6,8	102	136
Custo do embrião (R\$)	14,79	25,62	12,50	11,48

TABELA 3 CUSTO, EM REAL (R\$), POR VACA RECEPTORA DA RAÇA NELORE INSEMINADA E INOVULADA VIA TRANSCERVICAL. SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR), (R\$ - OUTUBRO DE 1998).

Nº DE VACAS	CUSTO EM R\$ PARA:			
	DADOS REAIS	DADOS PROJETADOS		
	5	1	15	20
Embriões produzidos	34	6,8	102	136
Sêmen	170,00	34,00	510,00	680,00
Custo - IA (Mão obra, material, Inseminador, etc.)	170,00	34,00	510,00	680,00
Material de implantação	5,44	5,44	5,44	5,44
Mão de obra especializada (1 diárias = R\$ 200,00)	100,00	100,00	200,00	200,00
Custo do implante dos embriões	445,44	173,44	1.225,44	1.565,44
Custo dos Embriões	503,00	174,20	1.275,00	1.561,00
Custo total do Processo	948,44	347,64	2.500,44	3.126,44
Custo por vaca inseminada e implantada e projeção em função da quantidade de animais	27,90	51,12	24,51	22,99

TABELA 4 CUSTO, EM REAL (R\$), DO BEZERRO NASCIDO EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VACAS DOADORAS COLETADAS. SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR), (R\$ - OUTUBRO DE 1998).

ITENS	VACAS COLETADAS E IMPLANTADAS + PROJEÇÃO DE COLETAS E IMPLANTES							
	DADOS REAIS		PROJEÇÃO PARA:					
	5	34	1	6,8	15	102	20	136
Custo da coleta	503,00		174,20		1.275,00		1.561,00	
Custo da (I A) e (I E)		445,44		173,44		1.225,44		1.565,44
Custo total do processo	948,44		347,64		2.500,44		3.126,44	
Taxa de natalidade %	120,00		120,00		120,00		120,00	
N.º de bezerros nascidos	40,80		8,16		122,40		163,20	
Custo do bezerro nascido	23,25		42,60		20,43		19,16	
Taxa de mortalidade %	12,00		12,00		12,00		12,00	
N.º de bezerros após período de observação	35,90		7,18		107,71		143,62	
Custo final do bezerro produzido no sistema	26,42		48,41		23,21		21,77	

TABELA 5 CUSTO DO BEZERRO, EM REAL (R\$), NASCIDO EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE DOSES DE SÊMEN UTILIZADA. SÃO JOSÉ PINHAIS (PR), (R\$ - OUTUBRO DE 1998)

ITENS	DOSES					
	1		1,5		2	
Número de doses	1		1,5		2	
Sêmen (R\$)	5,00		7,50		10,00	
Mão de obra (R\$)	5,00		7,50		10,00	
Comissão por prenhez (R\$)	0,50		0,50		0,50	
Total (R\$)	1.035,00	1.038,00	1.540,00	1.542,50	2.045,00	2.047,50
Taxa de nascimento (%)	70	75	80	85	90	95
Custo nascimento (R\$)	14,79	13,83	19,25	18,15	22,72	21,55

TABELA 6 CUSTO DO BEZERRO, EM REAL (R\$), NASCIDO NO PROGRAMA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL MAIS IMPLANTE DE EMBRIÃO. SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR), - (R\$ - OUTUBRO DE 1998).

	DADOS REAIS		PROJEÇÃO PARA:			
	5		15		20	
Número de Vacas Coletadas	5		15		20	
Custo total do processo IA + IE	948,44		2.500,44		3.126,44	
Taxa de Nascimento (%)	105	120	105	120	105	120
Custo nascimento (R\$)	26,42	25,45	23,21	20,43	21,77	19,16

TABELA 7 CUSTO MÉDIO, EM REAL (R\$), POR VACA DA RAÇA NELORE POR ANO, (R\$ - OUTUBRO DE 1998)

MÃO DE OBRA (PARA 500 VACAS PARIDAS)

2 empregados	750,00
R\$ 750,00 vezes doze meses	9000,00
R\$ 9.000,00 dividido por 500 vacas	18,00
Sal Mineral - 0,70 g dia x 365 = 25 kg	17,00
Pasto - Arrendamento: R\$ 3,50 x doze meses	52,50
Controle Sanitário (vacinas, vermífugos e controle de ectoparasitas)	5,00
Mortalidade - (considerar 0,5% ao ano)	1,20
TOTAL	92,50

Fonte: Cabral M.M. (informação pessoal).

TABELA 8 PROJEÇÃO DE DESPESAS E RECEITAS, EM REAL (R\$), EM FUNÇÃO DAS TAXAS DE NASCIMENTO EM VACAS NELORE INSEMINADAS. SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR), (R\$ - OUTUBRO DE 1998).

	VACAS IA					
	70	75	80	85	90	95
Taxas de nascimento (%)						
Custo de nascimento	14,79	13,83	19,25	18,15	22,72	21,55
Custo da vaca / ano	92,50	92,50	92,50	92,50	92,50	92,50
Custo das vacas vazias (6 meses)	1.387,50	1.156,25	925,00	693,75	462,50	231,25
Custo total do bezerro nascido	146,93	137,16	134,88	126,97	125,50	118,92
Despesas (totais) com bezerros	10.285,30	10.287,25	10.790,00	10.792,75	11.294,80	11.297,25
Receitas de vendas (unitário)	220,00	220,00	220,00	220,00	220,00	220,00
Receitas (totais) com bezerros	15.400,00	16.500,00	17.600,00	18.700,00	19.800,00	20.900,00
Saldo	5.114,70	6.212,75	6.810,00	7.907,25	8.505,20	9.602,75
Líquido por bezerro	73,07	82,84	85,13	93,03	94,50	101,08
Líquido por vaca	51,15	62,13	68,10	79,07	85,05	96,03

OBSERVAÇÕES:

- Considerar venda do bezerro a R\$ 1,00/kg, com peso médio de 220 kg
- Custo da vaca vazia em 6 meses = R\$ 92,5 / 2 = R\$ 46,25*30 = R\$ 1.387,50

TABELA 9 PROJEÇÃO DE DESPESAS E RECEITAS EM REAL (R\$) EM FUNÇÃO DAS TAXAS DE NASCIMENTO EM VACAS NELORE INSEMINADAS E INOVULADAS. SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR), (R\$ - OUTUBRO DE 1998).

	DADOS REAIS		PROJEÇÃO PARA:			
	5		15	20		
Taxa de nascimento	105	120	105	120	105	120
Custo de nascimento	26,42	23,25	23,21	20,43	21,77	19,16
Custo da vaca / ano	92,50	92,50	92,50	92,50	92,50	92,50
Custo das vacas vazias (6 meses)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Custo total do bezerro nascido	114,52	100,33	111,31	97,51	109,87	96,24
Despesas (totais) com bezerros	12.024,10	12.040,00	11.687,05	11.701,60	11.535,85	11.549,20
Receitas de venda (unitário)	220,00	220,00	220,00	220,00	220,00	220,00
Receitas (totais) com bezerros	23.100,00	26.400,00	23.100,00	26.400,00	23.100,00	26.400,00
Saldo	11.075,90	14.360,00	11.412,95	14.698,40	11.564,15	14.850,80
Líquido por bezerro	105,48	119,67	108,69	122,49	110,13	123,76
Líquido por vaca	110,76	143,60	114,13	146,98	115,64	148,51

OBSERVAÇÕES:

- Considerar venda do bezerro a R\$ 1,00/kg, com peso médio de 220 kg
- Custo da vaca vazia em 6 meses = R\$ 92,5 / 2 = R\$ 46,25*30 = R\$ 1.387,50

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, R.H.; COELHO, L.A.; PIRES, R.J.L.; MARTINEZ, A.C. Superovulação de vacas nelore com dose única de FSH aplicada por via subcutânea. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS – Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões**, Porto Alegre/RS, v. 27, n. 1, p. 199, 1973.
- ANDERSON, G.B. Methods for producing twins in Cattle, **Theriogenology**, V. 9, p.3-16, 1978.
- ANDERSON, G.B.; BALDWIN, J.N.; CUPPS, P.T.; DROST, M.; HORTON, M.B.; WRIGHT, R.W.Jr. Induced twinning in beef heifers by embryo transfer. **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 272, 1976.
- BAKER, R.D.; EBERHARD B.K.; LEFFEL R.E.; ROHDE R.F.; HENSCHEN, T.J. Pregnancy rates following surgical transfer of bovine demi – embryos. **10 th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination**, v. II, n. 220, p. 10-14, 1984.
- BO, G.A.; HOCKELEY, D.K.; NASSER, L.F.; MAPLETOFT, T.J. Superovulatory response to subcutaneous injection of follitropin in beef cattle. **Theriogenology**, v.42, p. 963-975, 1994.
- BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. Birth of twin calves following a simple transcervical non – surgical egg transfer technique. **The Veterinary Record** n. 99, p. 274-275, 1976.
- CABRAL, M.M. **Comunicação Pessoal**, 1999.
- CUENCA, L. e BOTTARO, R. Transferencia de embriones en ganado de carne. In: **Seminário Internacional De Transferencia De Embriones, Biotecnologia Y Tecnologias Avanzadas**, Montevidéo, maio/1995. Anais...Montevidéo, Facultad de Veterinária Dpto. De Reproducción Animal, p. 95-103, 1995.
- DYMNICKI, E.; REKLEWSKI, Z.; SLONIEWSKI, K.; WOJDAN, J. The possibility of obtaining twins in cattle using superovulation and embryo transfer. **Animal Breeding (Sumário)**, ref. 2414, p. 307, 1998.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Campo Grande (MS), Boletim informativo n.1996
- ERB, R. E.; ANDERSON, W.R.; HINZE, P. M. ; GILDOW, E. M. Inheritance of twinning in a herd of Holstein – Friesian cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 43, n. 3, 1960.
- FABARO, P.; DELLAFERRERA, G.; CREMONESI, F; PECILE, A. Induction of twin calving by embryo transfer after artificial insemination in cows treated with PRID. **Atti Della Societa Italiana di Buiatria**, v 31, p. 239-245, 1998.

FNP, Consultoria & Comércio, São Paulo (1998).

FRARE, J.; FAZZANO, C.; MUGNOL, M.; SCHERLOSKI, P.S. Superovulation of cattle donors not considering the base estrous. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS – Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões**, v. 26, n. 1, p. 271, 1998.

FÜHRER, E.K.; PÜRRER, F.; SCHMOLL, F.; BREM, G.; SCHELLANDER, K. Equilíbrio rápido e transferência direta de embriões bovinos: uma simplificação do processo de criopreservação. **XI Congresso Brasileiro De Reprodução Animal**, Belo Horizonte/MG, Anais, p. 416, 1995.

GORDON, I.; BORLAND, M.P. Cattle twinning by nonsurgical egg transfer, **Control of Reproduction in the Cow**, p. 335-336, 1977.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H. **Obstetrícia Veterinária** – Editora Sulina, 2ª Edição, p. 69, 1982.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, Editora Manole Ltda., 6ª edição, p. 469-535, 1995

HANCOCK, J. Monozygotic twins in cattle. **Adventure Genetic**, v. 6, p. 141-181, 1954.

HOCKLEY, D.K.; BO, G.A.; PALASZ, A.T.; DEL CAMPO, M.R.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation with a single subcutaneous injection of Follitropin in the cow: effect of dose and site of injection. **Theriogenology**, v.37, n. 1, p. 224, 1992.

JOHANSSON J.; LINDHE B.; PIRCHNER F. Causes of variation in the frequency of monozygous and dizygous twinning in various breeds of cattle. **Editora Heveditas**, v. 78, p. 201-234, 1974

JOHNSON, M.R., TURMAN, E.J.; STEPHENS, D.F. Gonadotropin induced multiple births in beef cows following estrus synchronization. **Journal of Animal Science**, v. 41, n. 5, 1975.

LANGE, H Cryopreservation bovine embryos and demi-embryos using ethylene glycol for direct transfer after thawing. **Theriogenology**, v.43, p. 258, 1995.

LOONEY, C.R.; BONDIOLLI, K.R.; HILL, K.G.; MASSEY, J.M. Superovulation of donor cows with bovine follicle-stimulating hormone (FSH) produced by recombinant DNA technology. **Theriogenology**. v. 29, n.1, p. 271, 1988.

MAPLETOFT, R.J. The use of embryo transfer technology in the 21 st century. **Seminário Internacional De Transferencia De Embriones, Biotecnologia y Tecnologias Avanzadas**, Montevidéo. Anais...Montevidéo, Facultad de Veterinária Dpto. De Reproducción Animal, p. 1-7, 1995.

MAULEON P.; BOSC, M. J.; COUROT, M.; PELOT, J.; SCHNEBERGER, J.; ORTAVANT, R. **Animal Broch Biophysic**, v. 10, p. 1-19, 1970.

MENISSIER F., FREBLING J., Aptitude à la gémellité des races à viande Françaises **25e réunion ann. Fédération européenne de Zootechnie**, Copenhague, v. 1, p. 250, 1974.

McDONALD L. E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**, Editora Lea & Febiger, 4^a Edição, p. 526-551, 1989.

McINTOSH, A. e HAZELEGER, N.L. The use of ethylene glycol for freezing bovine embryos. **Theriogenology**, V. 41, p. 253, 1994.

MISRA, A.K.; CHAUBAL, S.A.; KISHORE, G.K.; RAJESHWARAN, S. superovulatory response to single subcutaneous injection of Folltropin in holstein and sahiwal cows. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 260, 1992.

MUNAR, C.J.; NIGRO, M.A.; BURRY, E.R.; VAUTIER, R.A.; ARGERICH, A. Quality control in a large-scale embryo transfer program under farm conditions in the Argentine Republic. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 5-8, 1990.

NISHIGAI, M.; KAMOMAE, H.; TANAKA, T.; KANEDA, Y. The influence of developmental stage and morphological quality of frozen – thawed bovine embryos on pregnancy rate in bovine embryo transfer. **Journal of Reproduction and Development**, v. 45, n. 4, p. 301 – 306, 1999.

NOAKES, D.E. **Fertilidade e Obstetrícia em Bovinos**, Editora Livraria Varela, 1^a edição, p. 101-109, 1991.

RIHA, J.; FRELICH, J.; GOLDA, J.; VANEK, D. Alternative methods utilizing embryo transfer (ET) for the formation of beef cattle herds. **Archiv für Tierzucht**, v. 41, n. 4, p. 345-357, 1998.

ROMMEL, P. e KÖNING, I. Results of bovine embryo transfer in the German Democratic Republic. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 299, 1988.

ROWSON, L.E.A.; MOOR, R.M.; LAWSON, R.A.S. Twinning in Cattle., **The Veterinary Record**, v. 85, p. 583-584, 1969

ROWSON, L.E.A.; LAWSON, R.A.S.; MOOR, R.M. Production of twins in cattle by egg transfer. **Journal of Reproduction Fertility**, v.25, p. 261, 1971.

RUSSELL, W.S. Effect of twin birth on growth of cattle. **Journal of the British Society of Animal Production**, v. 22, parte 2, p. 167-173, 1976.

RUTLEDGE, J.J. Twinning in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 40, n. 5, p. 803-814, 1975.

- SEIDEL, G.E. Embryo transfer: the next 100 years. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 171-181, 1991.
- SMEATON, D.C.; CLAYTON, J.B. Productivity and profitability of twinning beef cows. New Zealand-Hamilton, **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 58, p. 245-247, 1998.
- SUZUKI, O.; GESHI, M.; YONAI, M.; SAKAGUCHI, M. Calf production by bilateral embryo transfer or contralateral embryo transfer to previously inseminated cows. **Animal Science**, v. 67, n. 8, p. 732-739, 1996.
- TAKEDA, T.; HALLOWELL, S. V.; MCGAULEY, A. D.; HASLER. Pregnancy Rates with Intact and Split Bovine Embryos transferred surgically and Nonsurgically. **Theriogenology**, v. 25, n. 1, p. 204, 1986.
- TESTART, J.; GODARD – SIOUR, C.; MESNIL DU BUISSON, F. Transvaginal Transplantation of an extra egg to obtain twinning in cattle. **Theriogenology**, v. 4, n. 5, p. 163-168, 1975.
- TURMAN, E.J.; LASTER, D. B.; RENBARGER, R. E.; STEPHENS, D. F. Multiple births in beef cows treated with equine gonadotropin (PMS) and chorionic gonadotropin (HCG). **Journal of Animal Science**, v. 32, n. 5, p. 962-967, 1971.
- VISINTIN, J.A.; GARCIA, J.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; PUPIM, F.P.V.; ARRUDA, R.P. Criopreservação de embriões bovinos: método "one-step". **XI Congresso Brasileiro De Reprodução Animal**, Belo Horizonte/MG, 1995. -Anais do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.415, 1995.
- VOELKEL, S.A.; HUMES, P.E.; GODKE, R.A. Pregnancy rates resultating from non-surgical transfer of micro manipulated bovine embryos. **X International Congress of Animal Reproduction and Artificial Inseminacion**, v. II, p. 10-14, 1984
- VOELKEL, S.A.; HU, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 23-36, 1992.
- WANG, F.M.; SANG, G. Z.; LI, J.G.; JIN, S.X.; Bisection and transfer of frozen embryos from Holstein cows. **Journal of Hebei Agricultural University**, v. 18, n. 3, p. 68-70, 1995.
- YAMAMOTO, M.; SUZUKI, T.; OOE, M.; TAKAGI, M.; KAWAGUSHI, M. Efficacy of single vs. Multiple injection superovulation regimens of FSH using polyvinilpyrrolidone. **Theriogenology**, 37910 p. 325, 1992.