

**VIABILIDADE TÉCNICA E ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE GÊMEOS EM VACAS DA RAÇA
NELORE PELA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES**
(Technology and economic viability of twin pregnancy production in nelore breed by embryo transfer)

CAPOVILLA, L.C.T.¹; KOZICKI, L.E.²; VELLIOS, M.S.¹; CABRAL, M.M.³

¹Médicos Veterinários;

²Departamento de Medicina Veterinária - UFPR – Curitiba, e-mail: lkozicki@agrarias.ufpr.br;

³Universidade Anhembi-Morumbi - São Paulo.

RESUMO – Objetivando induzir gestação gemelar em bovinos de corte comercial, foram utilizadas 05 vacas 1/2 Nelore x 1/2 Red Angus como doadoras e 34 vacas Nelore como receptoras, ciclando naturalmente. As vacas foram sincronizadas mediante implante de Norgestomet (3 mg) e 3 mg de Norgestomet mais 5 mg de Valerato de Estradiol injetáveis no dia 0. No 5º dia iniciou-se a superovulação empregando-se 350 UI de FSH em doses decrescentes durante 4 dias. No 7º dia retirou-se o implante; 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. Usou-se material para coletas de embriões do tipo descartável sendo 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 um 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 frutos 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 produtos de gestação gemelar e 2 abortaram fetos únicos. 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, desenvolveram-se 36 (105,58%). Sugere-se que sejam utilizadas matrizes receptoras com maior aptidão leiteira. Concluiu-se que a produção de prenhez gemelar em bovinos de corte à nível comercial é viável técnica e economicamente, desde que se utilize touros reprodutores que gerem bezerros relativamente pequenos e receptoras com aptidão leiteira.

Palavras chave: gestação gemelar, bovinos corte, transferência embrionária, viabilidade.

ABSTRACT – For an experiment to produce twin gestation in a beef commercial herd, 5 cows ½ Nelore x ½ Red Angus, naturally cycling were synchronized at D₀ with implants of Norgestomet (3 mg) and injection of 3 mg of Norgestomet and 5 mg of estradiol valerate. Superovulation has been initiated at D₅ using 350 IU of FSH in decreasing doses during 4 days. At D₇ Norgestomet was removed, artificial insemination (AI) being then carried out 50 and 60 hours later with Limousin bulls (red hair) semen. Seven days after the first AI, embryos were collected from 5 cows using a disposable catheter and equipment and filter for embryos. Thirty four viable embryos, with an average of 6.8 per donor, were collected and frozen. Thirty four Nelore cows were inseminated with Aberdeen Angus semen in the natural heat. Seven days later these animals were inovulated with one embryo in the contralateral horn to the corpus luteum. Therefore, black calves resulted from AI whereas red calves from embryo transfer. Only black colored calves (35.3%) were produced by 12 cows, 3 cows delivered only red calves (8.9%), 13 cows produced both black and red colored calves (38.2%), 4 cows aborted between the 6th and 7th months of pregnancy (11.7%), of which 2 cows aborted 2 products each one and 2 cows only 1 product each. Two cows were open at the 45th day after the embryo inovulation (5.9%). A total of 25 black color calves (73.53%) were produced from AI and 16 red color (47.05%) from embryo transfer. The total number of calves amounted 41 products (birth rate = 120.58%), ending after 4 months of observation, with a total of 36 calves (105.58%). It is possible that the use of cows with higher milk production could reduce this rate of mortality probably due to the low milk production of the Nelore breed. It was concluded that the gestation of twins in beef cows is technically and economically possible being necessary, however, the use of bulls that produce relatively small calves.

Key words: twin gestation, beef cattle, embryo transfer, economic viability.

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.

Nas últimas décadas com a importação de raças européias à produção de carne, iniciou-se o cruzamento industrial. Porém a quantidade dos produtos gerados a partir dessa biotecnologia, demonstra que há muito por fazer, para se elevar os índices de produtividade e de desfrute. 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 brasileira, submetendo os animais à engorda e ao emagrecimento conforme à disponibilidade de alimentos, somando-se a isso problemas de sanidade. Essa sistemática de pecuária acarretou efeitos danosos à atividade, levando-a à beira da falência, pois atualmente os pecuaristas, em sua grande maioria, encontram-se descapitalizados, e suas pastagens estão degradadas.

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

Os aspectos positivos estão relacionados à biotecnologia empregada em rebanhos puros, enfocando a área de reprodução animal, na qual procedimentos como coleta e congelamento de sêmen, inseminação artificial, superovulação, sincronização de cio, coleta, congelamento e inovulação de embriões dentre outras, participam do manejo reprodutivo de rebanhos de gado puro.

Por outro lado aspectos adversos limitam o emprego das tecnologias em um rebanho comercial, à exceção da inseminação artificial (IA), atingindo contudo, percentual de 2,0 % do rebanho nacional, obtendo-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. Deste modo, 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.

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 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 obtido, o custo de produção de bezerras empregando-se a TE, alcança cifras de 30 a 60% mais baratas do que criar as bezerras (RIHA *et al.*, 1998).

Tecnicamente para se avaliar os animais 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, pela redução 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 ciclando, pode-se desconsiderar o dia do estro ao se utilizar implantes de progéstágeno (FRARE *et al.*, 1998). Segundo ALVAREZ *et al.* (1973)

reduz-se o excesso de manejo das doadoras, empregando-se uma 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 injeção subcutânea de FSH, atrás da escápula e distante 30 cm da cernelha é 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 ser eficiente, 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 à 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 à 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 espermatozoides 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 FREBLING, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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.

BAKER *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 embrião para o corno contralateral ao corpo lúteo (CL) de uma vaca receptora que foi inseminada e 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 em três receptoras parindo 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, dezoito 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).

Ao se adotar 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).

Em outro experimento 06 vacas receptoras foram inseminadas no cio natural e receberam cinco dias após, um embrião no corno contralateral ao CL. Destas cinco ficaram prenhes, e duas pariram gêmeos no período normal de gestação. Esses dois animais não tiveram retenção de placenta (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 e CLAYTON, 1998).

TESTART *et al.* (1975) idealizaram um experimento para produzir gestações gemelares implantando um embrião no útero de dezessete vacas presumidamente prenhes pela 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 quádrupla; nenhum gêmeo foi perdido no nascimento, mas a perda de triplos, quádruplos e quádruplos foi de 54%. Não se associou a gestação múltipla com a dificuldade de parturição. Porém 48% 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 bezerras 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 reduzida 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 bezerras pós nascimento foi de 22, 6% em contraste com 9,6% do rebanho total (RUTLEDGE, 1975).

Material e Método

O trabalho foi desenvolvido em uma fazenda no município de São José dos Pinhais (PR), em 1998 e 1999. Os animais eram mantidos no inverno em pasto de aveia e silagem de milho contendo 2% de uréia e no verão em pasto de milheto e silagem de milho contendo 2% de uréia.

Para a realização deste experimento foram utilizadas as seguintes instalações: 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.

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 receptoras da raça Nelore que entrariam na estação de monta pré estabelecida. As matrizes que apresentaram qualquer tipo de problema foram descartadas. No início da estação reprodutiva, aproximadamente 40 a 50 vacas entravam em cio diariamente.

Igualmente foram utilizadas 05 vacas cruzadas 1/2 Nelore x 1/2 Red Angus, previamente selecionadas, para serem

Viabilidade técnica e econômica da produção de gêmeos em vacas de raça Nelore pela transferência...

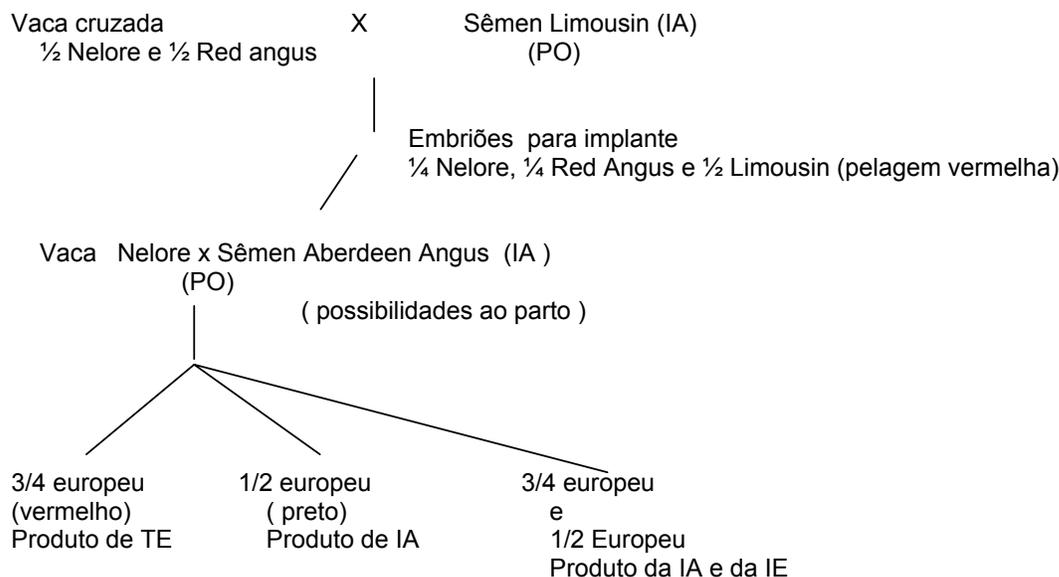
integradas ao programa, como produtoras de embriões.

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 receptora Nelore que gerasse 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:



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 sintético.

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:

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

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

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

4º. 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 STRINGFELLOW e SEIDEL (1998).

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 34 vacas Nelore que foram inseminadas em um mesmo dia. Os procedimentos foram: identificação de cio, inseminação artificial e a inovulação embrionária, com inovulador e bainha para inovulação 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 1:60. A observação para o aparte das matrizes marcadas em cio, ocorria duas vezes ao dia, com duração de uma hora pela manhã (8 às 9 horas) e uma hora à tarde (16 às 17 horas).

A sistemática da inseminação artificial: 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 07 dias após a primeira inseminação via transcervical, sendo o material utilizado, lavado em PBS e reutilizado para os trinta e quatro implantes.

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: 12 vacas conceberam somente da inseminação artificial (bezerro de pelagem preta), correspondendo a 35,3 % do total de matrizes do programa; 03 vacas conceberam somente do implante de embrião (bezerro de pelagem vermelha), correspondendo a 8,9 % do total; 13 vacas conceberam tanto da inseminação artificial como do implante de embrião (bezerro de pelagem preta e bezerro de pelagem vermelha), correspondendo a 38,2 % do total; 04 vacas tiveram abortamento entre o 6. e o 7. mês de gestação (11,7%) e 02 vacas ficaram vazias, correspondendo a 5,9 %. O total de produtos oriundos da IA foi de 25 animais, atingindo a taxa de natalidade de 73,53%; o total de produtos do implante de embrião (IE) foi de 16 animais, perfazendo o índice de natalidade de 47,05 %. Produtos nascidos no programa foi de 41 animais, obtendo-se a taxa de natalidade de 120,58 %.

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), (n=5)

Nº 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.

Nosso índice situa-se 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. Relatos dos autores

supracitados, dão conta de que eles não acompanharam os bezerros nascidos para verificação da taxa final de natalidade. Dados da presente pesquisa apontaram, que após 4 meses de observação dos produtos gerados,

Viabilidade técnica e econômica da produção de gêmeos em vacas de raça Nelore pela transferência...

36 viveram. Nesta fase ocorreu o índice de mortalidade de 12,19% dos nascidos, determinando a 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 coletasse 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 a segunda IA no próximo cio, e 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).

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 COLETADA		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

Observa-se nesse experimento que a produção média de embriões por vaca está dentro dos padrões normais corroborando os relatos de

HAFEZ (1995), cuja produção média por vaca gira em torno de sete embriões viáveis, tornando assim os custos compatíveis com o processo.

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).

	CUSTO EM R\$ PARA			
	DADOS REAIS		DADOS PROJETADOS	
	5	1	15	20
Nº de vacas	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 diária = 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

A TABELA 3 mostra o custo por vaca receptora inseminada e inovulada e na TABELA 5 esta demonstrado o custo do bezerro nascido, em função do número de doses de semen utilizadas e do índice de

concepcao. Na TABELA 6 observa-se o custo do bezerro nascido no programa de IA mais 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), ao afirmar que a taxa de nao/retorno, esta em torno de 70 a 80 %, e a taxa de prenhez através do implante embrionário girando 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 e CLAYTON (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.

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).
VACAS COLETADAS E IMPLANTADAS + PROJEÇÃO DE COLETAS E IMPLANTES

ITENS	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	
Custa da (IA) e (IE)		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
Nº 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
Nº 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

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 compara-se o custo da IA em função do número de doses usadas e no programa de IA mais IE e a taxa de nascimento alcançada, como é demonstrado na TABELA 6. Nessa pode-se observar que o menor custo do bezerro nascido

está em função do número de vacas coletadas. À 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.

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	DADOS DE SÊMEN					
	1		1,5		2	
Número de doses						
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	1.542,00	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

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 duas 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.

Viabilidade técnica e econômica da produção de gêmeos em vacas de raça nelore pela transferência...

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

De grande importância seria o conhecimento dos intervalos entre partos dos animais trabalhados produtores de gêmeos e os que geraram um único

bezerro. Deve-se ressaltar que não ocorreram distocias fetal ou maternal bem como *Retentio secundinarum* nos animais com gestação gemelar.

TABELA 7 – CUSTO MÉDIO, EM REAL (R\$), POR VACA DA RAÇA NELORE POR ANO, JOSÉ DOS PINHAIS-PR (R\$ - OUTUBRO DE 1998).

MÃO DE OBRA (PARA 500 VACAS PARIDAS)	
2 empregados	750,00
R\$ 750,00 vezes doze meses	9.000,00
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, 1999 (comunicação pessoal).

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

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, adotando-se a técnica da IA no dia do estro e da transferência de embrião no 8º dia após a IA das vacas receptoras.

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

Considerando-se o fato de haver escassos trabalhos publicados sobre a produção de gestação gemelar em bovinos, torna-se premente 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 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	15	20	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

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. **INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION**, 10, v.II, 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**, Botucatu, SP, 1999.
- CUENCA, L.; BOTTARO, R. Transferencia de embriões en ganado de carne. In: Seminário Internacional De Transferencia De Embriões, Biotecnologia Y Tecnologias Avanzadas, Montevideu, maio/1995. **Anais...** Montevideu, Facultad de Veterinária, 1995, p.95-103, 1995.
- DYMNICKI, E.; REKLEWSKI, Z.; SLONIEWSKI, K.; WOJDAN, J. The possibility of obtaining twins in cattle using superovulation and embryo transfer. **Prace i Materialy Zootechniczne, Zeszyt Specjalny**, n.6, p.79-83, 1998.
- 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, **Anuário da Pecuária Brasileira**, São Paulo, p.105, 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. **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, XI, Belo Horizonte/MG, **Anais**, p.416, 1995.
- GORDON, I.; BOLAND, M.P. Cattle twinning by nonsurgical egg transfer, **Control of Reproduction in the Cow**, 1977, p.335-336.
- GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H. **Obstetria Veterinária, Porto Alegre**, Editora Sulina, 2ª ed., 1982, p. 69.
- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, Editora Manole, 6ª ed., 1985, p. 469-535.

- 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 Folltropin 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, P.1394-1399, 1975.
- LANGE, H. Cryopreservation bovine embryos and demi-embryos using ethylene glycol for direct transfer after thawing. **Theriogenology**, v.43, N.1, 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, Montevideo. **Anais...** Montevideo, Facultad de Veterinaria, 1995, p.1-7.
- MAULEON P.; BOSCH, 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**, Philadelphia, Lea & Febiger, 4^a ed., 1989, p.526-551.
- McINTOSH, A.; 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**, São Paulo, Editora Varela, 1991, p.101-109.
- 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.; KÖNIG, 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, 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. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, New Zealand-Hamilton, v.58, p.245-247, 1998.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de embriões**, Illinois, 3.ed., 1998, 180 p.
- 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 (PMSG) 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". CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, XI, Belo Horizonte/MG, 1995. **Anais**, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995, p.415.
- VOELKEL, S.A.; HUMES, P.E.; GODKE, R.A. Pregnancy rates resulting from non-surgical transfer of micro manipulated bovine embryos. INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINACION, 10, **Proceedings**, 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.