

## INDUÇÃO DE GESTAÇÕES GEMELARES EM VACAS DE CARNE POR TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*.

### INDUCING TWINNING IN BEEF COWS BY THE TRANSFER OF *IN VITRO* PRODUCED EMBRYOS

A.E.M. Horta, Carla C. Marques, M. Irene Vasques, R.M. Leitão e A.Vaz Portugal  
*Dpto. de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional-INIA, Vale de Santarém*

#### Resumo

Um grupo de 200 vacas Alentejanas mantidas em regime extensivo (ECLAIR/AGRE 0018), foi utilizado durante 3 anos para a indução de gestações gemelares utilizando inseminação artificial (IA, n=192) associada à transferência de um embrião FIV (TE+IA, n=154), ou recebendo a transferência de dois embriões FIV (TE, n=240). Trinta e sete das vacas inseminadas receberam somente IA, no prazo fixo de 72 horas após a sincronização dosaios, sem terem manifestado sinais de cio. A TE foi realizada por via cervical, sob anestesia epidural, 6-8 dias após um cio detectado conseqüente à sincronização com progestagénio e PGF<sub>2α</sub>. Das vacas transferidas, 58 receberam embriões FIV frescos (TEf), tendo as restantes recebido embriões FIV descongelados (TEc). Em 34 animais que não conceberam, realizou-se a TE com embriões congelados 7 dias após o cio repetente dos 21 dias (TEc rep). Todas as vacas foram submetidas a diagnósticos de não gestação (por doseamento de progesterona) aos 21 e 42 dias pós ovulação e a diagnósticos de gestação por ecografia/palpação transrectal aos 42, 60 e 100 dias. Para prevenir a ocorrência de nados mortos associados a vitelos gigantes e gestações prolongadas, o parto foi induzido nalguns animais através da implantação com Norgestomet (4-8 dias) associado à PGF<sub>2α</sub> (25 mg, i.m.) e à dexametasona (45 mg, i.m.) no dia da colocação dos implantes (n=17), com exclusão da dexametasona (n=14) ou da PGF<sub>2α</sub> (n=13). O efeito do encurtamento da gestação para 266-269 dias sobre o peso e mortalidade dos vitelos ao parto foram avaliados.

As taxas de gestação aos 21, 42, 60 e 100 dias e as taxas de parto foram respectivamente: 56,8%, 46%, 37,8%, 35,1% e 29,7% (grupo IA, n=37); 77,4%, 71,3%, 57,4%, 52,2% e 47,8% (grupo IA+TEc, n=115); 90%, 87,5%, 65%, 65% e 57,5% (grupo IA+TEf, n=40); 58,3%, 54,6%, 34,2%, 23,5% e 19,3% (grupo TEc, n=187); 83,3%, 61,1%, 55,6%, 44,4% e 38,9% (grupo TEf, n=18); 41,2%, 26,5%, 14,7%, 14,7% e 11,8% (TEc rep). A taxa de partições gemelares foi de 43,5% (IA+TEf), 16,4% (IA+TEc), 57,1% (TEf), 22,2% (TEc) e 0% (IA). Nos grupos em que a IA foi associada à TE, os embriões FIV contribuíram com 31% (congelados) e 46,7% (frescos) para o total de vitelos nascidos. Os partos espontâneos ocorreram entre os 273 e 297 dias de gestação. O melhor método de indução dos partos foi o que combinou o progestagénio (4 dias) a dexametasona e a PGF<sub>2α</sub>, sendo os partos sincronizados em 78% das vacas nas 48 horas subsequentes à extracção dos implantes. Os métodos que excluíram a PGF<sub>2α</sub> ou a dexametasona não conseguiram sincronizar os partos por incapacidade de provocar a luteólise nesta fase da gestação. A nado-mortalidade em partos espontâneos (vitelos com origem na FIV) foi de 26,7% nos singulares (54,4 ± 2,8 Kg LSD de peso à nascença) e de 27,8% nos gemelares (43,4 ± 2,6 Kg LSD de peso à nascença). A indução do parto reduziu significativamente o peso à nascença e a nado-mortalidade foi nula (38,8 ± 4,9 Kg LSD e 37,0 ± 6,3 Kg LSD para singulares e gemelares, respectivamente; P<0.001). O peso ao parto dos vitelos singulares esteve positivamente correlacionado com a duração da gestação (dias), quer em vitelos puros

( $Y = a + 0,488 \text{ Kg} * X$ ;  $P < 0,001$ ), quer em vitelos cruzados provenientes de FIV ( $Y = a + 0,764 \text{ Kg} * X$ ;  $P < 0,01$ ).

### Summary

A group of 200 Alentejano beef cows kept in pasture (research contract nº AGRE 0018/ECLAIR), was used during 3 years to induce twin gestations using artificial insemination (AI, n=192) associated with the transfer of one IVF embryo (AI+ET, n=154) or transferring two IVF embryos to non inseminated cows (ET, n=240). In thirty seven cows which were only inseminated, AI was performed at the fixed time of 72 hours after synchronizations, without having shown oestrus signs. ET was performed non-surgically under epidural anaesthesia, 6-8 days after synchronized heats. There were 58 cows receiving fresh IVF embryos (ETf) and the remaining received thawed IVF embryos (ETt). There were 34 cows receiving frozen embryos 7 days after a repeating oestrus 21 days following synchronizations (ETt rep). Non-pregnancy diagnosis by progesterone determination was performed at 21 and 42 days after ovulation. Pregnancy diagnosis by rectal palpations and ultrasonography was performed at 42, 60 and 100 days of gestation. To prevent calf mortality at birth, associated to oversized fetus and prolonged gestations, calving was induced in some animals by (I) Norgestomet implants (4 or 8 days) associated to PGF<sub>2α</sub> (25 mg i.m.) and dexametasone (45 mg i.m.) at implantation (n=17), or (II) excluding PGF<sub>2α</sub> (n=13) or (III) excluding dexamethasone (n=14). Gestation length was shortened to 266-269 and its effect on calf birth weight and mortality was studied.

Gestation rates at 21, 42, 60 and 100 days and calving rates were respectively: 56.8%, 46%, 37.8%, 35.1% and 29.7% (group AI, n=37); 77.4%, 71.3%, 57.4%, 52.2% and 47.8% (group AI+ETt, n=115); 90%, 87.5%, 65%, 65% and 57.5% (group AI+ETf, n=40); 58.3%, 54.6%, 34.2%, 23.5% and 19.3% (group ETt, n=187); 83.3%, 61.1%, 55.6%, 44.4% and 38.9% (group ETf, n=18); 41.2%, 26.5%, 14.7%, 14.7% and 11.8% (group ETt rep). Twinning rate at calving was 43.5% (AI+ETf), 16.4% (AI+ETt), 57.1% (ETf), 22.2 (ETt) and 0% (AI). In the groups where AI was associated to ET, IVF embryos accounted to 31% (ETt) and 46.7% (ETf) of total births. Natural calvings occurred between 273-297 days of gestation. Treatment (I) was the best one for calving induction synchronizing 78% of calvings during the first 48 hours after implant removal. Treatments excluding PGF<sub>2α</sub> or Dexametasone (I and II) could not synchronize parturitions due to a lack of luteolysis at this stage of gestation. Calf mortality at birth after natural calvings was 26.7% in singles ( $54.4 \pm 4.9 \text{ Kg}$  LSD of birth weight) and 27.8% in twins ( $43.4 \pm 2.6 \text{ Kg}$  LSD of birth weight). Calving induction significantly reduced calf birth weight and stillbirths were abolished ( $38.8 \pm 4.9 \text{ Kg}$  LSD and  $37.0 \pm 6.3 \text{ Kg}$  LSD, for singles and twins, respectively;  $P < 0.001$ ). Calf birth weight in singles was positively correlated with gestation length (days) either in purebred calves ( $Y = a + 0.488 \text{ Kg} * X$ ;  $P < 0.001$ ) or crossbred calves ( $Y = a + 0.764 \text{ Kg} * X$ ;  $P < 0.01$ ).

## Introdução

Muito do trabalho publicado sobre a indução da gemelaridade através de transferência de embriões (TE) tem utilizado embriões produzidos *in vivo* (1, 2). A produção de embriões *in vivo* é um processo que só se tem justificado, dado o seu elevado custo de produção, em animais de grande mérito genético.

Com o desenvolvimento das técnicas de maturação e fertilização *in vitro* de oocitos (FIV) bovinos desde o início da década de 80 (3) tornou-se possível a produção industrial e comercialização de embriões a partir de fêmeas abatidas em matadouro (4., 5, 6, 7).

Neste caso particular os embriões obtidos destinam-se à produção de carne a partir de dadoras não seleccionadas geneticamente, representando ganho adicional em explorações de carne ou leite através da indução da gemelaridade (6, 8, 9).

Neste trabalho, desenvolvido entre 1990 e 1993, procurou-se otimizar a taxa de indução de gemelares por TE utilizando embriões FIV em vacas de raça Alentejana (Projecto ECLAIR nº AGRE 0018).

## Materiais e métodos

Um efectivo de 200 vacas Alentejanas adultas mantidas em regime de pastoreio extensivo, foi utilizado durante 3 anos para a indução de gestações gemelares utilizando inseminação artificial (IA, n=192) associada à transferência de um embrião FIV (TE+IA, n=154), ou recebendo a transferência de dois embriões FIV (TE, n=240). Trinta e sete das vacas inseminadas receberam somente IA, no prazo fixo de 72 horas após a sincronização dosaios, sem terem manifestado sinais de cio.

A TE foi realizada por via cervical, sob anestesia epidural, 6-8 dias após um cio detectado conseqüente à sincronização com progestagénio e PGF<sub>2α</sub> (10). Das vacas transferidas, 58 receberam embriões FIV frescos (TEf), tendo as restantes recebido embriões FIV descongelados (TEc). Em 34 animais que não conceberam, realizou-se a TE com embriões congelados 7 dias após o cio repetente dos 21 dias (TEc rep).

Todas as vacas foram submetidas a diagnósticos de não gestação (por doseamento de progesterona) aos 21 e 42 dias pós ovulação e a diagnósticos de gestação por ecografia/palpação transrectal aos 42, 60 e 100 dias.

Para prevenir a ocorrência de nados mortos associados a vitelos gigantes e gestações prolongadas (11), o parto foi induzido nalguns animais através da implantação com Norgestomet (2 implantes s.c. durante 4 ou 8 dias) associado à PGF<sub>2α</sub> (25 mg, i.m.) e à dexametasona (45 mg, i.m.) no dia da colocação dos implantes (n=17). Em 14 vacas realizou-se a mesma metodologia com exclusão da dexametasona. Em 13 vacas realizou-se o mesmo tratamento excluindo a PGF<sub>2α</sub>. O efeito do encurtamento da gestação para 266-269 dias sobre o peso e mortalidade dos vitelos ao parto foram avaliados.

Os embriões foram produzidos a partir da maturação e fertilização *in vitro* (com sémen de bovinos de carne) de oocitos aspirados de ovários de fêmeas cruzadas abatidas em matadouro, segundo metodologias referidas anteriormente (4, 12, 13).

As vacas foram pesadas após o parto e os pesos foram comparados entre vacas parindo gemelares (n=26) e singulares (n=90).

## Resultados

Na tabela 1 apresentam-se as taxas de gestação (aos 21, 42, 60 e 100 dias pós ovulação) e de parto nos diferentes grupos de animais. A taxa de partos foi significativamente superior nos grupos em que se realizou a TE associada à IA relativamente aos grupos em que se praticou unicamente a TE (50,3% vs 21,0%,  $P < 0,001$ ). O grupo IA+TEc apresenta uma taxa de parto significativamente superior ao grupo TEc ( $P < 0,001$ ). As menores taxas de parto são observadas no grupo TEc rep (11,8%) que são significativamente inferiores às dos grupos IA+TEc (47,8%;  $P < 0,01$ ) e IA+TEf (57,5%;  $P < 0,001$ ). Verifica-se uma tendência para melhores taxas de parto nos grupos recebendo embriões frescos, quando comparados com os seus homólogos congelados. A IA realizada sistematicamente às 72 horas pós sincronização (grupo IA) apresenta uma taxa de parto de 29,7%.

Tabela 1 - Taxas de gestação (%), de parto e de gemelaridade, utilizando diferentes associações de inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) frescos (f) ou congelados (c) (rep = transferências realizadas em vacas com cio repetido 21 dias após a sincronização).

	(n)	Dias de gestação				Parto (%)	Gemelaridade	
		G21	G42	G60	G100		(n)	(%)
IA	37	56.8	46.0	37.8	35.1	29.7	0/11	0
IA + TEc	115	77.4	71.3	57.4	52.2	47.8	9/55	16,4
IA + TEf	40	90.0	87.5	65.0	65.0	57.5	10/23	43,5
TEc	187	58.3	54.6	34.2	23.5	19.3	8/36	22,2
TEf	18	83.3	61.1	55.6	44.4	38.9	4/7	57,1
TEc rep	34	41.2	26.5	14.7	14.7	11.8	0/4	0
<b>Total</b>	<b>431</b>	<b>65.9</b>	<b>59.4</b>	<b>42.9</b>	<b>36.2</b>	<b>31.6</b>	<b>31/136</b>	<b>22,8</b>

Um sub-grupo 30 vacas incluídas no grupo IA+TEc foi submetido a stress de transporte e mudança de alimentação brusca nos 20 dias seguintes às ovulações, devido a inundações fluviais ocorridas no seu habitat. As 8 vacas que vieram a parir (26,7%) não geraram nenhum dos embriões transferidos, tendo originado somente produtos oriundos da IA. Uma segunda situação de stress (Figura 1) foi caracterizada por temperaturas ambientais extremamente elevadas durante os 100 dias que se seguiram às ovulações (limites das temperaturas máximas: 19,6°C-42,4°C). Neste caso, houve 10 de 20 vacas do grupo IA (50%) que permaneceram gestantes para além dos 100 dias de gestação, enquanto que do grupo IA+TEc somente 17 de 42 vacas conseguiram parir (40,5%), tendo sobrevivido somente 5 produtos resultantes da TE contra 16 sobreviventes da IA do mesmo grupo. As taxas de gemelaridade em ambas as situações referidas foram seriamente afectadas.

As taxas de partições gemelares (Tabela 1) foram de 43,5% (IA+TEf), 16,4% (IA+TEc), 57,1% (TEf), 22,2% (TEc) e 0% (IA). Nos grupos em que a IA foi associada à TE, os embriões FIV contribuíram com 31% (congelados) e 46,7% (frescos) para o total de vitelos nascidos.

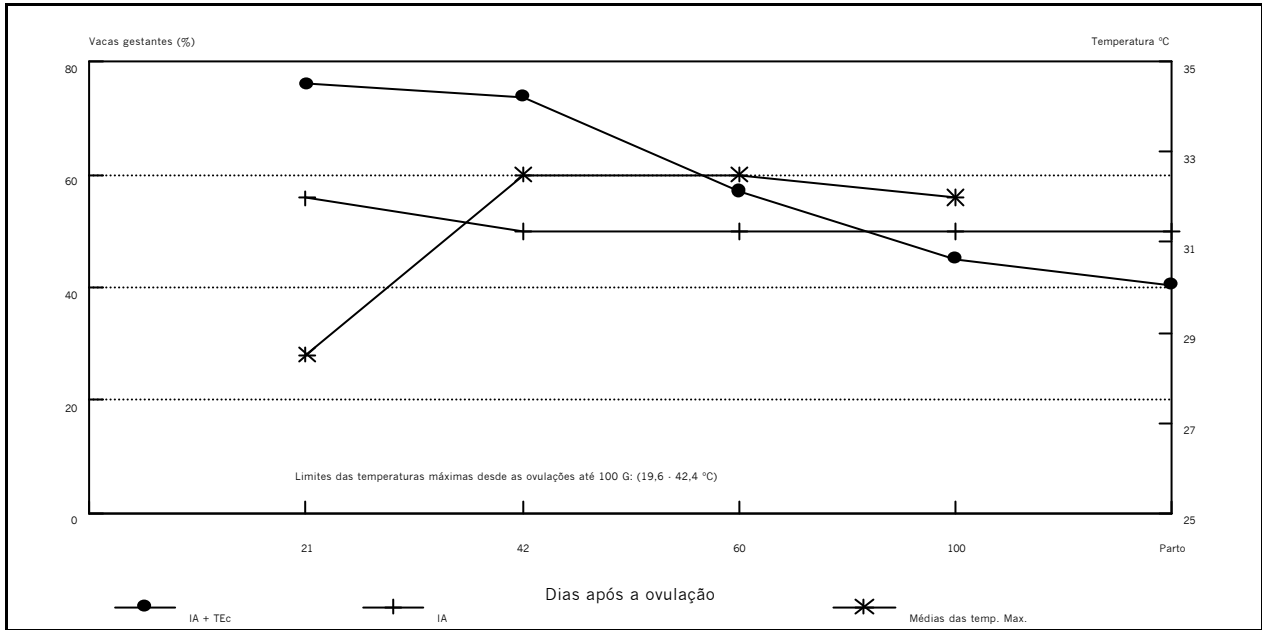


Figura 1 - Perdas durante a gestação em consequência de stress térmico ambiental nos grupos IA e IA+TEc.

Os partos espontâneos de gemelares e singulares ocorreram entre os 273 e 297 dias de gestação (Figura 2). A mortalidade ao nascimento começou a verificar-se a partir dos 281 dias de gestação e aumentou com a duração da gestação, atingindo os 22,7%. Considerando ainda os partos singulares e gemelares em conjunto, verificou-se um aumento do peso dos vitelos ao nascimento de 0,924 Kg por cada dia de aumento na duração da gestação ( $Y=0,924 \cdot X$ ,  $R^2=22\%$ ;  $P<0,01$ ).

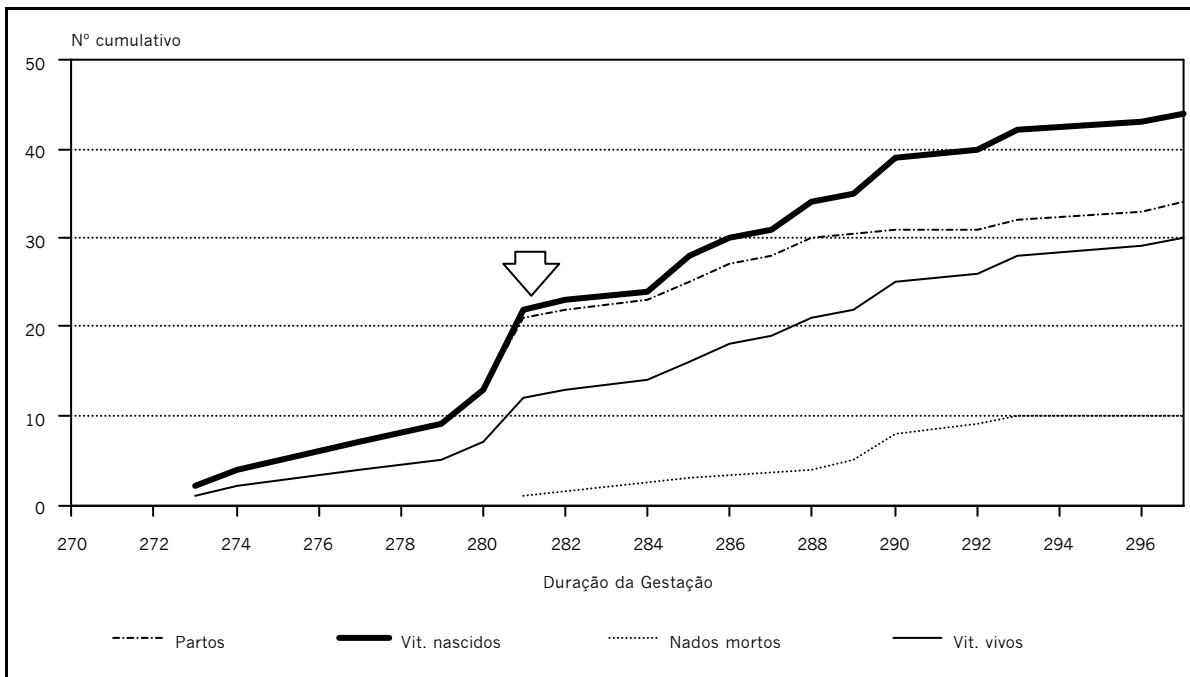


Figura 2 - Ocorrência de partos espontâneos em singulares e gemelares.

O melhor método de indução dos partos foi o que combinou o progestagénio (4 dias) a dexametasona e a PGF<sub>2α</sub>, sendo os partos sincronizados em 78% das vacas nas 48 horas subsequentes à extracção dos implantes. Os métodos que excluíram a PGF<sub>2α</sub> ou a dexametasona não conseguiram sincronizar os partos por incapacidade de provocar a luteólise nesta fase da gestação.

A nado-mortalidade em partos espontâneos (vitelos com origem na FIV) foi de 26,7% nos singulares (54,4 Kg de peso médio à nascença) e de 27,8% nos gemelares (43,4 Kg de peso médio à nascença), como se mostra na Tabela 2. A diferença dos pesos ao nascimento entre singulares e gemelares foi significativa (P<0,001; Tabela 2). As gestações gemelares foram significativamente mais curtas que as singulares quer nas que resultaram de produtos da IA (281,1 vs 287,8 dias; P<0,001) quer nas que resultaram de embriões FIV (282,1 vs 290,6 dias; P<0,001).

Tabela 2 - Diferenças nos pesos ao nascimento entre gemelares (Gem) e singulares (Sing), em partos espontâneos (PE) ou induzidos (PI) e com produtos resultantes da IA ou da TE.

		(n)	Média (Kg)	Interv. de Conf. das médias (LSD)		Sign*	Mortalidade ao parto (%)
Produtos IA:							
PE	Sing	8	38,5	33,9	43,1	a	12,5
	Gem	12	32,3	28,6	36,1	b	0,0
PI	Sing	8	27,8	24,5	31,0	c	0,0
	Gem	5	23,4	19,3	27,5	d	0,0
Produtos TE:							
PE	Sing	15	54,4	51,6	57,2	e	26,7
	Gem	18	43,4	40,8	46,0	f	27,8
PI	Sing	5	38,8	33,9	43,7	a	0,0
	Gem	3	37,0	30,7	43,3	a	0,0

\* Colunas com letras diferentes indicam médias significativamente diferentes (ANOVA-LSD; P<0,001).

A indução do parto reduziu significativamente o peso à nascença e a nado-mortalidade foi nula (38,8 Kg LSD e 37,0 Kg para singulares e gemelares, respectivamente; P<0,001, Tabela 2).

A duração da gestação foi significativamente reduzida por efeito da indução dos partos (Tabela 3). Assim, verificou-se um encurtamento da gestação máximo de 20,8 dias nas gestações singulares provenientes de TE e mínimo de 14,1 dias nas gestações gemelares com a mesma proveniência.

O peso ao parto dos vitelos singulares esteve positivamente correlacionado com a duração da gestação (dias), quer em vitelos puros ( $Y = a + 0,488 \text{ Kg} * X$ ; P<0,001), quer em vitelos cruzados provenientes de FIV ( $Y = a + 0,764 \text{ Kg} * X$ ; P<0,01), como se mostra na Figura 3.

O peso das vacas ao parto não foi significativamente diferente entre animais parindo gémeos ou singulares (663,0 Kg vs 677,8 Kg, respectivamente; P>0,05).

Tabela 3 - Diferenças entre a duração de gestações gemelares (Gem) e singulares (Sing), em partos espontâneos (PE) ou induzidos (PI) e com produtos resultantes da IA ou da TE.

		(n)	Média (dias)	Interv. de Conf. das médias (LSD)		Sign*
Produtos IA:						
PE	Sing	8	287,8	285,7	289,8	a
	Gem	12	281,1	279,4	282,8	b
PI	Sing	8	266,3	264,2	268,3	c
	Gem	5	266,8	264,2	269,4	c
Produtos TE:						
PE	Sing	15	290,6	288,9	292,3	d
	Gem	18	282,1	280,5	283,6	b
PI	Sing	5	269,8	266,8	272,8	e
	Gem	3	268,0	264,2	271,8	ce

\* Colunas com letras diferentes indicam médias significativamente diferentes (ANOVA-LSD; P<0,001).

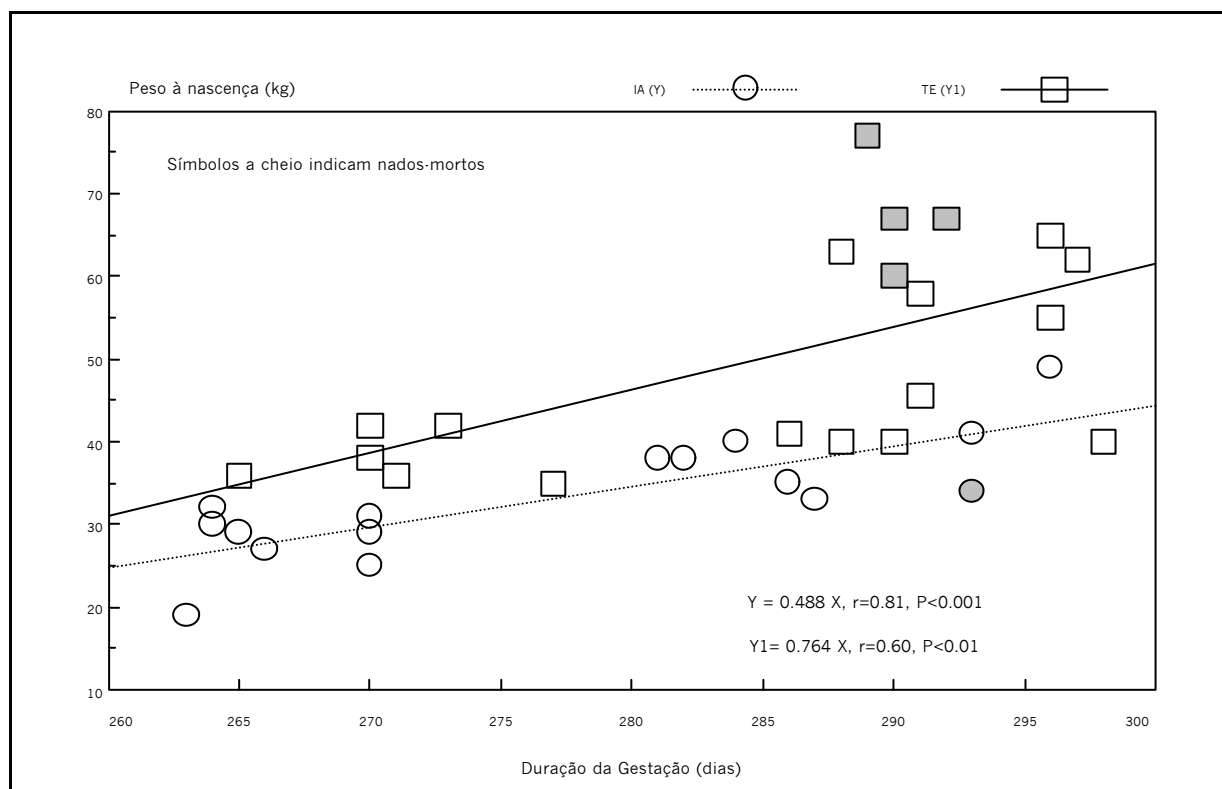


Figura 3 - Efeito da duração da gestação sobre o peso à nascença em vitelos nascidos de partições singulares. Comparação entre produtos cruzados provenientes de TE e vitelos puros de raça Alentejana provenientes de IA.

## Discussão e conclusões

De acordo com os resultados apresentados relativamente às taxas de gestação verifica-se que existem perdas embrio/fetais da ordem dos 30 a 40 pontos percentuais em todos os grupos entre os 21 dias e o parto. Os grupos em que se realizou a TE em vacas previamente inseminadas apresentaram melhores taxas de gestação e parto que as dos grupos em que se realizou somente a TE. As menores taxas de gestação e parto foram observadas nas vacas receptoras após o cio detectado 21 dias depois de uma prévia sincronização e TE (receptoras repetentes), o que está de acordo com resultados obtidos por outros autores (9). A taxa de gestação global obtida aos 42 dias de gestação em todos os grupos foi de 59,4%. Nos grupos em que se transferiram unicamente embriões FIV a mesma foi de 50,2% e, de 59,5% quando se excluíram as receptoras repetentes. Resultados semelhantes utilizando somente embriões FIV frescos (50%) foram obtidos por outros autores (9). Os nossos resultados aos 42 dias de gestação no grupo recebendo somente embriões frescos (61,1%) foram superiores aos dos autores citados anteriormente.

As taxas de gemelaridade ao parto foram superiores nos grupos que receberam embriões FIV frescos associados ou não a prévia IA (43,5% e 57,1%, respectivamente), sendo comparáveis à taxa de gemelaridade observada por outros autores (47%) associando a IA à TE com embriões FIV (14). As taxas de gemelaridade relativamente baixas observadas nos grupos em que se utilizaram embriões FIV congelados foram devidas nalguns animais a duas situações de stress relacionadas com o transporte e mudança brusca de alimentação no início da gestação, e temperaturas ambientais extremamente elevadas. As perdas embrionárias nesta última situação foram confirmadas pelo doseamento da PSPB (15). Os resultados obtidos em consequência destas duas situações de stress, sugerem que os embriões FIV são menos resistentes a este tipo de agressões que os produtos resultantes de IA.

Os resultados relativos às partições revelam que em partos espontâneos existe uma mortalidade ao parto de 26,7% e de 27,8% respectivamente em partições singulares e gemelares, como anteriormente havia sido já referido (11). Quer num caso como no outro, a indução farmacológica das partições antes dos 270 dias de gestação conduziu a uma prevenção eficaz da mortalidade ao parto. No caso dos singulares este efeito passou por uma redução significativa do peso ao nascimento. No caso dos gemelares o efeito preventivo passou pela redução do peso à nascença e pela melhor assistência aos casos de distócia proporcionada pela concentração dos partos. Com efeito, a proporção de apresentações posteriores em gemelares pode atingir os 97% contra somente 3% nos singulares (14).

No caso das gestações singulares provenientes de embriões FIV heterozigóticos identificou-se o aumento do peso ao nascimento em associação com o aumento da duração da gestação, conduzindo a desproporções feto-pélvicas, como causas próximas da mortalidade ao parto. De acordo com Guilbault et al. (16), utilizando embriões produzidos *in vivo*, existe um aumento da duração da gestação e do peso dos vitelos ao parto quando as raças das receptoras e das dadoras são diferentes. Esta situação provoca um aumento de antigénios trofoblásticos susceptíveis de serem reconhecidos como estranhos pela mãe, o que conduz ao aumento da produção de hormonas (sulfato de estrona) e proteínas (bPAG e PSPB) de origem placentária (17). Tem sido referido que quanto maior for a dissimilaridade antigénica entre as unidades materna e fetal, maiores placentas são encontradas na ratinha (18) e maior peso ao parto dos vitelos nos bovinos (19). Existe alguma evidência que os factores genotípicos que controlam o



crescimento fetal *in utero* se manifestam antes dos 200 dias de gestação, não sendo de excluir a sua participação no alongamento da gestação associada ao aumento do peso dos vitelos à nascença (20).

As condições de manejo em pastoreio extensivo a que os animais estiveram submetidos, permitiram que vacas gerando gémeos chegassem ao parto em condições corporais idênticas às que pariram singulares. Em vacas leiteiras a gemelaridade provoca necessidades acrescidas de 2 Kg de concentrado por dia, durante o último trimestre de gestação (21).

## Bibliografia

- 1 - Ozil, J.P. (1983). Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fert.*, **69**:463-468.
- 2 - Davis, M.E., Harvey, W.R., Bishop, M.D., Gearheart, W.W. (1989). Use of embryo transfer to induce twinning in beef cattle: embryo survival rate, gestation length, birthweight and weaning weight of calves. *J. Anim. Sci.*, **67**:301-310.
- 3 - Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., Dressel, M.A. (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, **27**:147-158.
- 4 - Lu, K.H, Gordon, I., Gallagher, M., McGovern, H. (1987). Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Rec.*, **121**:259-260.
- 5 - Lu, K.H, Gordon, I., Chen, H.B., Gallagher, M., McGovern, H. (1988). Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.*, **122**:539-540.
- 6 - Gordon, I. (1989). Large-scale production of cattle embryos by *in vitro* culture methods. *Ag. Biotech. News and Information*, **1**:345-348.
- 7 - Gordon, I. e Lu, K.H. (1990). Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, **33**:77-87.
- 8 - Wooliams, J.A., Wilmut, I. (1989). Embryo manipulation in cattle breeding and production. *Anim. Prod.*, **48**:3-30.
- 9 - Reichenbach, H.D., Liebrich, J., Berg, U., Brem, G. (1992). Pregnancy rates and birth after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **95**:363-370.
- 10 - Horta, A.E.M., Vasques, M.I., Marques, C.C. (1993). Interpretação de perfis de progesterona durante a sincronização dos ciclos para transferência de embriões FIV em vacas Alentejanas. 5<sup>a</sup> Simpósio Internacional de Reprodução Animal, SPRA, Luso. (Aceite para publicação).
- 11 - Horta, A.E.M., Marques, C.M., Vasques, M.I., Leitão, R.M. (1992). Effect of inducing calvings on calf birth weight. 12th International Congress on Animal Reproduction. Haia. **Vol. 2**: 895-897.
- 12 - Yang, N.S., Lu, K.H., Gordon, I. (1990). *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*, **33**:352
- 13 - Lu, K.H., Polge, C. (1992). A summary of two-year's results in large scale *in vitro* bovine embryo production. 12th International Congress on Animal Reproduction. Haia. **Vol. 3**: 1315-1317.
- 14 - Diskin, M.G., McEvoy, T.G., Sreenan, J.M. (1990). Calving performance and calf survival in a twin calving beef herd. *Anim. Prod.*, **50**: 545 (Abstr)

- 15 - Vasques, M.I., Marques, C.M., Horta, A.E.M., Humblot, P., Sasser, R.G. (1993). Diagnóstico de gestações gemelares e de perdas embrio/fetais em bovinos pelo doseamento de PSPB. 5ª Simpósio Internacional de Reprodução Animal, SPRA, Luso. (Aceite para publicação).
- 16 - Guilbault, L.A., Roy, G.L., Beckers, J.F., Dufour, J.J. (1990). Influence of breed of fetus on periparturient endocrine responses and subsequent milk production of Ayrshire dams. *J. Dairy Sci.*, **73**:2766-2773.
- 17 - Zoli, A.P., Guilbault, L.A., Delahaut, P., Ortis, W.B., Beckers, J.F. (1992). Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: Its application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.*, **46**:83-92.
- 18 - James, D.A. (1967). Some effect of immunological factors on gestation in mice. *J. Reprod. Fert.*, **14**:265-275.
- 19 - Ounsted, M. (1978). Concepts and criteria of fetal growth. In: Abnormal fetal growth: Biological basis and consequences. Naftolin F. (Ed.), Berlim, pp. 149-164.
- 20 - Anthony, R.V., Bellows, R.A., Short, R.E., Staigmiller, R.D., Kaltenbach, C.C., Dunn, T.G. (1986). Fetal growth of beef calves. II. Effect of sire on prenatal development of the calf and related placental characteristics. *J. Anim. Sci.*, **62**:1375-1387.
- 21 - Mayne, C.S., McCaughey, W.J. (1990). An evaluation of the effects of twinning in dairy cows on animal production. *Anim. Prod.*, **50**: 545 (Abstr).