

PRODUZIONE DI GEMELLI MONOZIGOTI BOVINI MEDIANTE MICROCHIRURGIA EMBRIONALE

MAURIZIO MONACI
Dottori di Ricerca
Facoltà di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Perugia - Italia

LAUDINOR DE VUONO
Professor Assistente Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP

UMBERTO CHICCHINI
Professore Straordinario - Fuori Ruolo
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università
degli Studi di Perugia - Italia

MONACI, M.; DE VUONO, L.; CHICCHINI, U. Produzione di gemelli monozigoti bovini mediante microchirurgia embrionale. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(1):111-122, 1990.

RIASSUNTO: Gli autori dopo aver preso in considerazione la microchirurgia degli embrioni bovini per ottenere gemelli monozigoti, passano all'esame dei risultati conseguiti con il trapianto di essi nelle riceventi. Tale trapianto veniva effettuato sia immediatamente dopo la duplicazione (Tr. I), sia dopo il loro sviluppo in vitro per 36 ore (Tr. II) ottenendo un tasso di gravidanza del 40% e del 72% rispettivamente.

PAROLE-CHIAVE: Chirurgia, microchirurgia embrionale; Gemelli monozigoti di bovine

INTRODUZIONE

Con il termine di microchirurgia o micromanipolazione si definiscono quelle procedure applicate agli embrioni, mediante l'impiego di uno stereomicroscopio e di un dispositivo detto micromanipolatore. Esse comportano la separazione e l'aggregazione di blastomeri, l'iniezione di sostanze o cellule all'interno dell'embrione e la rimozione di alcune sue parti inclusa la membrana pellucida. Uno degli scopi della micromanipolazione è quello di incrementare la progenie da femmine geneticamente superiori e ciò rappresenta un importante vantaggio zoeconomico; inoltre la produzione di gemelli

identici può avere molti sviluppi nel futuro delle produzioni animali, in quanto offre l'opportunità per nuovi studi nel campo della riproduzione, della fisiologia, della nutrizione e della genetica.

Tale tecnica prevede la fessurazione della membrana pellucida e la dissezione della massa embrionale in gruppi distinti di cellule sfruttando la capacità potenziale di questi gruppi cellulari di moltiplicarsi.

WILLADSEN^{18,19,20,21} (1979, 1980, 1981, 1982) ha ottenuto nell'ovino e nel bovino, da embrioni micromanipolati a stadi precoci di sviluppo, coppie di gemelli identici, impiegando, come riceventi temporanee, pecore non gravide fitante che gli embrioni non avevano raggiunto lo stadio di morula compatta o blastociste precoce. Dopodiché gli embrioni, prelevati dalle riceventi intermedie, venivano trasferiti nelle riceventi definitive. Successivamente OZIL et alii¹⁴ (1982); LAMBETH et alii⁷ (1982); WILLIAMS et alii²³ (1982) definirono un nuovo metodo per produrre gemelli monozigoti da morule e blastocisti di bovino eliminando l'impiego delle "incubatrici" intermedie e trasferendo gli embrioni micromanipolati nelle riceventi con metodo incruento. In seguito, altri autori hanno confermato la validità del suddetto metodo (LAMBETH et alii⁸, 1983; OZIL¹³, 1983; VOELKEL et alii^{15,16}, 1984; WILLIAMS et alii²⁴, 1984; BREM et alii³, 1984; BAKER et alii¹, 1984; BAKER & SHEA², 1985; MERTES & BONDIOLI¹¹, 1985; MASSIP et alii¹⁰, 1985) ottenendo tassi di gravidanza del 16% e del 62.5% rispettivamente quando venivano trapiantati o un singolo embrione o due demi-embriani nella stessa ricevente (LAMBETH et alii⁹, 1983) derivanti da morule compatte o blastocisti precoci. WILLIAMS et alii²⁴ (1984) hanno conseguito tassi di gravidanza del 48% da embrioni nella fase di sviluppo di morula compatta mentre del 60% da blastocisti precoci.

Prima della compattazione i blastomeri possono essere facilmente separati con minimo danno, ma il loro tasso di sopravvivenza è risultato essere basso dopo averli trasferiti direttamente nelle riceventi (MASSEY et alii⁹, 1982). Questa scarsa sopravvivenza è stata attribuita a vari fattori quale la disgregazione cui può andare incontro l'embrione per la scarsa aderenza fra le cellule (WILLADSEN & FEHILLY²², 1983).

Il presente studio è stato condotto per valutare il tasso di gravidanza tra demi-embriani mantenuti in vitro prima del transfer e quelli trapiantati direttamente.

MATERIALI E METODI

Preparazione delle donatrici e delle riceventi

Sei bovine Holstein Fresian, di 2-5 anni di età sono state sottoposte a trattamento superovulatorio, iniziando il 10⁰ giorno dall'estro, somministrando i/m 5 mg di FSH-P (Burns-Biotec) ogni 12 ore per quattro giorni. A 60 e 72 ore dalla prima somministrazione di FSH-P, gli animali ricevevano i/m 25 e 15 mg di PGF2 alpha (Lutalyse-Upjohn), mentre a bovine riceventi nullipare, venivano somministrati 30 mg di PGF2 alpha 12 ore prima rispetto alle donatrici.

Le donatrici sono state inseminate artificialmente a 12 e 24 ore dall'insorgenza dell'estro indotto, impiegando per ogni servizio 3 paillettes (0.5 ml) di seme congelato-scongelato con motilità del 70% e concentrazione di 4×10^6 spermatozoi/ml provenienti da uno stesso toro.

Raccolta degli embrioni

Il prelievo degli embrioni veniva effettuato al 7⁰ giorno dal primo intervento inseminativo con metodo incruento secondo le metodiche descritte da ELSDEN & SEIDEL JUNIOR⁴ (1985), impiegando per il flushing uterino la soluzione Dulbecco tamponata (D-PBS, Gibco) e modificata con l'1% di siero fetale bovino inattivato, 100 U.I. di penicillina/ml e 100 mcg di streptomina/ml.

Immediatamente al flushing uterino, al fine di ripristinare l'attività ovarica, alle donatrici erano somministrati i/m 30 mg di PGF2 alpha.

Il medium di lavaggio concentrato in circa 30 ml in un filtro per embrioni (Em Con-Immunosystem), veniva osservato impiegando uno stereomicroscopio Wild M8 (20-50X) e gli embrioni isolati venivano immediatamente trasferiti nella soluzione D-PBS modificata con 20% di siero fetale bovino inattivato e 1% di penicillina-streptomina/ml (Medium di mantenimento). Gli embrioni venivano classificati secondo criteri morfologici in quattro classi di sviluppo (A-B-C-D) (ELSDEN & SEIDEL JUNIOR⁴, 1985) e solo quelli appartenenti alle classi A e B erano impiegati per l'esperimento, e venivano mantenuti in vitro a 37⁰ C fino al momento della microchirurgia (30-60 minuti).

Microchirurgia degli embrioni

La bisezione degli embrioni è stata realizzata a temperatura ambiente con due micromanipolatori Leitz di tipo radiale impiegando uno stereomicroscopio Wild M8 (60-70X). I microstrumenti impiegati, derivati da tubi capillari (ϕ 1mm) lavorati alla microforgia,

erano quelli descritti da WILLIAMS et alii²⁴ (1984). L'embrione da micromanipolare, mantenuto in una piastra Petri (ϕ 75mm) contenente il medium di mantenimento (30 ml) e tenuto in posizione dalla "holding" pipette, veniva duplicato con il microbisturi sezionando contemporaneamente la zona pellucida e la massa cellulare, lungo un piano mediano (Fig. 1-2-3).

Con la pipetta di suzione metà embrione veniva prelevato dalla zona pellucida originale e trasferito nella zona pellucida di ovocellule congelate-scongelate (Fig. 4-5).

La zona pellucida delle ovocellule è stata aperta con la microlama e vuotata del suo contenuto con la pipetta di suzione.

Dopo la micromanipolazione le due metà di ogni embrione apparivano avere circa la stessa grandezza (Fig. 6); un demi-embrione veniva trasferito in una ricevente (grado di sincronia \pm 12 ore), con metodo incruento, impiegando la piolette di Cassou nel corno uterino ipsilaterale all'ovajo contenente il corpo luteo (ELSDEN & SEIDEL JUNIOR⁴, 1985) (Tr. I), mentre l'altra metà era coltivata in vitro per 36 ore prima del transfer, in un terreno costituito da fibroblasti uterini fetali in Ham's F10 (Tr. II).

Le riceventi sono state sottoposte a diagnosi clinica di gravidanza dopo 60 giorni dal transfer.

Coltivazione in vitro degli embrioni

La preparazione dei monostrati di fibroblasti uterini fetali è stata eseguita impiegando le procedure descritte da WIEMER et alii¹⁷ (1988): i tessuti endometriali sono stati ottenuti asetticamente dall'utero di feti bovini durante l'ultimo periodo di gravidanza (circa 270 giorni). L'apparato riproduttivo, escluso la vagina e le ovaie, veniva posto in un beaker sterile, mantenuto a +4⁰ C, contenente 100 ml di Hank's Balanced Salt Solution (Gibco) con 500 U.I. di penicillina/ml e 500 mcg di streptomina/ml (PST) e trasportato in laboratorio entro un'ora dal prelievo. Prima della dissezione veniva rimosso dalle corna e dal corpo dell'utero il tessuto connettivo in eccesso. La mucosa delle corna uterine è stata esteriozzata e porzioni di tessuto endometriale sono state rimosse e lavate in Hank's Balanced Salt Solution con l'aggiunta di PST (HBSS). I tessuti sono stati ridotti in frammenti di 3 mm³ e lavati più volte in HBSS. Quaranta di tali frammenti endometriali sono stati distribuiti in 12 bottiglie di plastica per colture cellulari da 25 cm² con l'aggiunta di 2 ml di Ham's F10 (Gibco) contenente 10% di siero fetale bovino inattivato, 500 U.I. di penicillina/ml, 500 mcg di streptomina/ml e 0.25 mcg di amphotericina-B/ml. Gli espianti di tessuto

venivano incubati in termostato a 37 °C in atmosfera umidificata e 5% di CO₂ in aria. Le colture venivano osservate giornalmente impiegando un microscopio a contrasto di fase (60-100X). Intorno al 5^o giorno di incubazione si notava una rapida crescita cellulare. La metà del medium di coltura veniva sostituito ad intervalli di 72 ore.

Dopo 9 giorni di incubazione gli espianti venivano trasferiti in nuove bottiglie di coltura (25 cm²), contenenti ognuna 10 ml di Ham's F10 con l'aggiunta del 10% di siero fetale bovino inattivato, 200 U.I. di penicillina/ml, 200 mcg di streptomina/ml e 0.25 mcg di amphotericina-B/ml.

Dopo 14 giorni dall'inizio dell'incubazione degli espianti endometriali, i monostrati cellulari che si erano formati, venivano tripsinizzati con la Soluzione Salina Tamponata (PBS-Gibco) contenente 0.05% tripsina, 0.002% EDTA (ad ogni subpassaggio) e bottiglie addizionali venivano seminate con metà della concentrazione originale (diluizione 1:2). Tra ogni subpassaggio le cellule venivano mantenute a 37 °C con 5% di CO₂ per 4-7 giorni, fino alla formazione di un monostrato confluyente. Dopo 7 subpassaggi i monostrati venivano conservati a -196 °C per 20-30 giorni prima del loro impiego.

I monostrati per la coltivazione dei demi-embrioni venivano preparati seminando 1 x 10⁵ fibroblasti vitali (6^o-7^o subpassaggio) in 0.5 ml di Ham's F10 per pozzetto, in piastre contenenti ognuna 4 pozzetti, 24-48 ore prima dell'inizio dell'esperimento e mantenuti a 37 °C in atmosfera umidificata e 5% di CO₂ in aria.

La crescita e lo sviluppo in vitro dei demi-embrioni sono stati osservati a 12, 24, 36 ore dall'inizio della co-coltura, impiegando un microscopio a contrasto di fase (40-200X). Erano classificati non vitali gli embrioni che presentavano alterazioni morfologiche quali blastomeri asimmetrici o estrusi dalla massa embrionale, frammentazione e vacuolizzazione cellulare e riduzione o collasso del blastocele.

RISULTATI

Dalle donatrici sono stati raccolti in totale ventinove embrioni e ovocellule con la media di 4.8 per animale. Ventidue ovocellule (75%) indicavano l'avvenuta fecondazione e diciotto di queste erano alla fase di sviluppo di morula tardiva o blastociste precoce (81%). Delle diciotto morule e blastocisti, quindici (83%), appartenenti alle classi A e B, venivano micromanipolate con successo (100%) (Tab. 1).

Dopo la micromanipolazione sono stati osservati detriti cellulari sulla superficie di taglio di alcuni demi-embrioni. La percentuale di sopravvivenza in

vitro dei quindici demi-embrioni è risultata essere, dopo 12 ore dall'inizio della co-coltura, dell'86%, mentre del 73% alla 24^o e 36^o ora (Graf.1).

Il tasso di gravidanza ottenuto dal transfer di quindici demi-embrioni immediatamente la duplicazione (Tr. I) è risultato essere del 40% (6/15) e del 72% (8/11) da demi-embrioni selezionati in vitro prima del transfer (Tr. II) (Tab. 1).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Per quanto riguarda il numero degli embrioni raccolti per donatrice e il loro grado di sviluppo, dopo aver sottoposto gli animali a superovulazione con FSH-P, i risultati poco si discostano da quelli ottenuti in altre precedenti nostre ricerche impiegando HMG (Serono) (MONACI et alii¹², 1988): nel primo caso abbiamo ottenuto 4.8 embrioni/ovocellule per donatrice, mentre nel secondo caso 5.5 embrioni/ovocellule per donatrice.

Per quanto riguarda la dissezione degli embrioni per ottenere gemelli identici, impiegando la tecnica di WILLIAMS et alii²⁴ (1984), sia pure per trapiantarli in momenti diversi (subito dopo la duplicazione o successivamente dopo 36 ore di mantenimento in coltura), è stata semplice e nella generalità dei casi priva di inconvenienti dannosi a livello cellulare tali da compromettere il successivo sviluppo. Infatti in alcuni casi abbiamo notato detriti cellulari lungo la linea di taglio, evenienza già descritta da JØRGENSEN et alii⁵ (1985), per cui è possibile pensare, quando i danni cellulari sono di notevole entità, che detti embrioni possano essere ostacolati nel loro successivo sviluppo, sia che vengano trapiantati nella ricevente sia che vengano posti nel terreno di coltura.

È nostra convinzione che con la metodologia descritta soltanto una percentuale di embrioni molto bassa possa andare incontro ad eccessivi danneggiamenti tali da comprometterne la vitalità e quindi la diminuita capacità di secernere fattori luteotrofici necessari a prevenire la luteolisi nella ricevente.

Per quanto concerne la percentuale degli attecchimenti nelle riceventi abbiamo notato che trasferendo i demi-embrioni dopo la micromanipolazione, questa non è troppo elevata raggiungendo il 40% circa, percentuale molto vicina a quella ottenuta da altri autori. Per quanto concerne invece la percentuale di attecchimento di demi-embrioni trasferiti in vivo dopo il loro iniziale sviluppo in coltura per 36 ore, periodo nel quale venivano tenuti sotto osservazione circa la loro vitalità, la percentuale di attecchimento è stata

notevolmente superiore e cioè del 72%. Ciò starebbe a dimostrare che la co-cultura dei demi-embrioni rappresenterebbe un eccellente metodo di selezione di quelli maggiormente danneggiati dalla micromanipolazione e nello stesso tempo favorirebbe la ricompattazione in quelli meno danneggiati. Si potrebbe anche supporre che i fibroblasti del terreno culturale potrebbero produrre sostanze nutritive favorevoli per lo sviluppo dei demi-embrioni rimuovendo nello stesso tempo i metaboliti tossici prodotti dagli embrioni stessi in coltura (KUZAN & WRIGHT⁶, 1984). Ciò comporta un risparmio del numero delle riceventi con notevoli vantaggi economici rendendo ancora più valida e più accessibile la pratica della microchirurgia per la creazione di gemelli identici, triplette e quadruplette necessari sia per la sperimentazione sia per l'applicazione nel campo zootecnico.

MONACI, M.; DE VUONO, L.; CHICCHINI, V. Production of bovine monozygotic twin by means of embryo microsurgery. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(1):111-122, 1990.

SUMMARY: The authors describe the procedures

concerning bovine embryo microsurgery to produce identical twin and then they examine the results obtained by the transfer in the recipients. The transplantation was carried out immediately after the micromanipulation, also after 36 h in culture. The pregnancy rate was 40% and 72% respectively.

UNITERMS: Surgery, microsurgery of embryo; Twins of cattle

MONACI, M.; DE VUONO, L.; CHICCHINI, U. Produção de gêmeos monozigóticos bovinos mediante microcirurgia embrionária. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(1):111-122, 1990.

RESUMO: Após a microcirurgia dos embriões bovinos para a obtenção de gêmeos monozigóticos, passa-se ao exame dos resultados obtidos com o transplante dos mesmos nas receptoras, tendo sido este efetuado imediatamente após a duplicação, ou após o seu desenvolvimento "in vitro" por 36 horas, obtendo uma taxa de gravidez de 42% e de 72% respectivamente.

UNITERMOS: Cirurgia, microcirurgia embrionária; Gêmeos monozigóticos bovinos

TABELLA 1 – Prospetto riassuntivo dei risultati ottenuti. Perugia, 1988.

Embrioni-ovocellule ottenuti	Resultati		embrioni Cat.A.B.	embrioni Cat.C.D.	embrioni manipolati	tasso di gravidanza	
	X embrioni-ovocellule per donatrice					Tr.I	Tr.II
Morule tardive e blastocisti precoci	18(81%)	4,8	15(83%)	3(16%)	15(100%)	6/15(40%)	8/11(72%)
2-16 cellule	4(18%)						
ovocellule non fertilizzate	7(24%)						
totale embrioni-ovocellule	29						

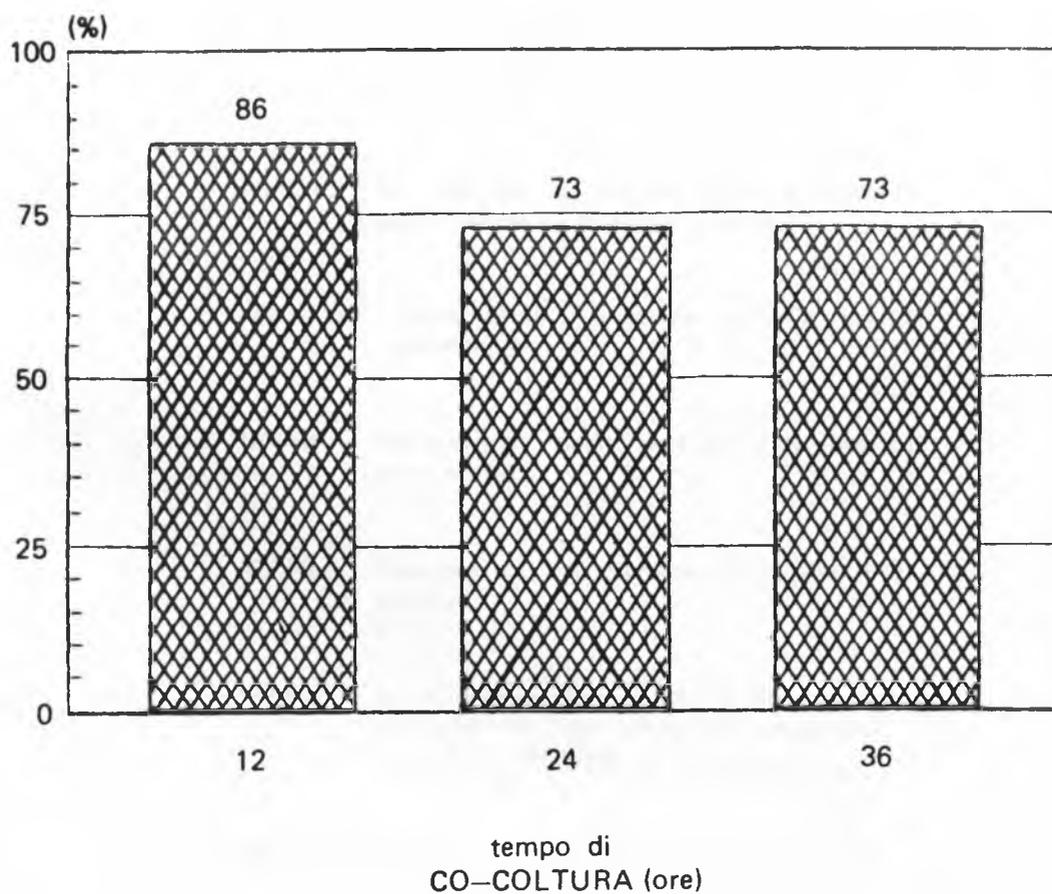


GRAFICO 1 – Percentuale di vitalità dei demi-embrioni in co-coltura a 12, 24 e 36 ore.

FIGURA 1 - L' embrione da micromanipolare è tenuto in posizione con la "holding" pipette.

FIGURA 2 - Taglio della membrana pellucida con il microbisturi.

FIGURA 3 - Duplicazione della massa cellulare lungo un piano mediano.

FIGURA 4 - Rimozione del demi-embrione con la pipette di suzione.

FIGURA 5 - Il demi-embrione è trasferito nella zona pellucida di una ovocellula congelata scongelata e liberata del suo contenuto.

FIGURA 6 - Una coppia di demi-embrioni identici.

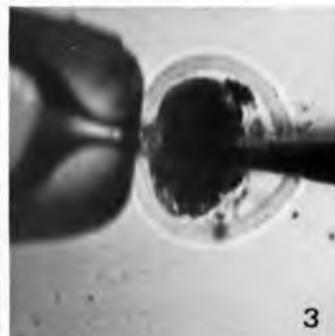
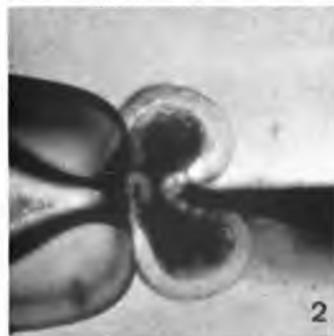
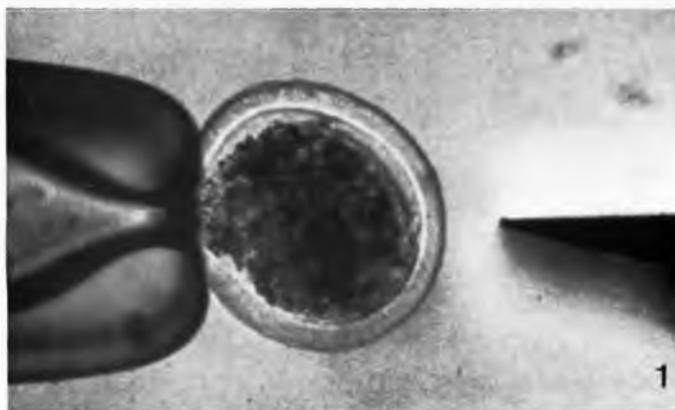


FIGURA 1 - O embrião a ser manipulado é mantido em posição através da pipeta de sucção.

FIGURA 2 - Incisão da membrana pelúcida com o microbisturi.

FIGURA 3 - Duplicação da massa celular ao longo de um plano mediano.

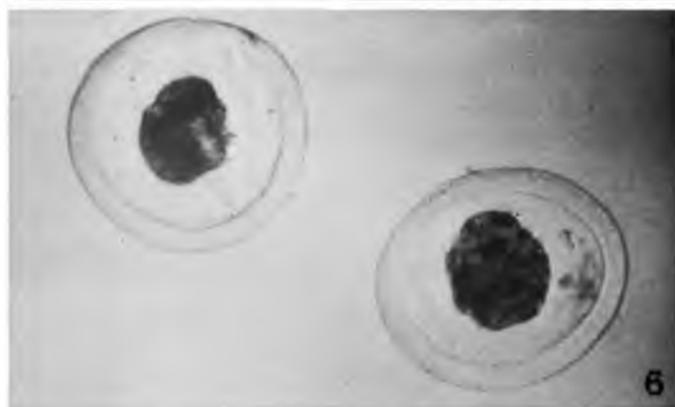
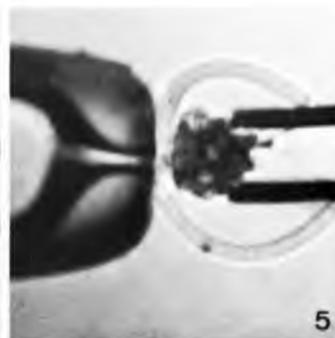
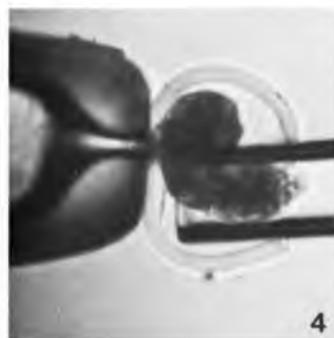


FIGURA 4 - Remoção do meio-embrião com a pipeta de sucção.

FIGURA 5 - Transferência do meio-embrião à zona pelúcida de uma ovocélula.

FIGURA 6 - Uma cópia dos "meio-embriões" idênticos.

BIBLIOGRAFIA

- 01-BAKER, R.D.; EBERHARD, B.E.; LEFFEL, R.E.; ROHDE, R.F.; HENSCHEN, T.J. Pregnancy rates following surgical transfer of bovine demi-embryos. In: WORLD CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ANIMAL INSEMINATION, 10., Urbana, 1984. *Proceedings*. Urbana, University of Illinois, 1984. v.2, p.220.
- 02-BAKER, R.D. & SHEA, B.F. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology*, 23:3-12, 1985.
- 03-BREM, G.; KRUFF, B.; SZILVASSY, B.; TENHUMBERG, H. Identical simmental twins through microsurgery of embryos. *Theriogenology*, 21:225, 1984.
- 04-ELSDEN, R.P. & SEIDEL JUNIOR, G.E. *Embryo transfer procedures for cattle*. Fort Collins, Colorado State University, 1985.
- 05-JØRGENSEN, P.H.; HYTTTEL, P.; PICERD, L. *Proceedings of the Society of Study in Fertility*, Aberdeen, 1985. [Abstr. 13].
- 06-KUZAN, F.B. & WRIGHT JUNIOR, R.W. Observations on the development of bovine morulae on various cellular and noncellular substrata. *J. anim. Sci.*, 54:811-816, 1982.
- 07-LAMBETH, V.A.; LOONEY, C.R.; VOELKEL, S.A.; HILL, K.G.; JACKSON, D.A.; GODKE, R.A. Micromanipulation of bovine morulae to produce identical twin off spring. In: WORLD CONGRESS ON EMBRYO TRANSFER IN MAMMALS, 2., Annecy, France, 1982. *Proceedings*. p.55.
- 08-LAMBETH, V.A.; LOONEY, C.R.; VOELKEL, S.A.; JACKSON, D.A.; HILL, K.G.; GODKE, R.A. Microsurgery on bovine embryos at the morula stage to produce monozygotic twin calves. *Theriogenology*, 20:85-95, 1983.
- 09-MASSEY, J.M.; ANDERSON, J.G.; ELLIS, W.C.; SORENSEN JUNIOR, D.A.; KRAEMER, D.C. Development of bovine embryos following enzymatic removal of the zona pellucida. *Theriogenology*, 17:99, 1982.
- 10-MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; ECTORS, F. Production de jumeaux monozygotes par duplication d'embryons chez les bovins. *Ann. Méd. vét.*, 129:53-57, 1985.
- 11-MERTES, P.C. & BONDIOLI, K.R. Effect of splitting technique on pregnancy rate from half embryos. *Theriogenology*, 23:209, 1985.
- 12-MONACI, M.; VERINI SUPPLIZI, A.; CHICHINI, U.; CHIACHIARINI, P.; POLISCA, A.; SILVESTRELLI, M. *Atti Soc. ital. Buiai.*, 20:211, 1988.
- 13-OZIL, J.P. Production of identical twins by bisection of blastocystis in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 69:463-468, 1983.
- 14-OZIL, J.P.; HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet. Rec.*, 110:126-127, 1982.
- 15-VOELKEL, S.A.; HUMES, P.E.; GODKE, R.A. Pregnancy rates resulting from non-surgical transfer of micromanipulated bovine embryos. In: WORLD CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ANIMAL INSEMINATION, 10., Urbana, 1984. *Proceedings*. Urbana, University of Illinois, 1984. v.2, p.251.
- 16-VOELKEL, S.A.; VILKER, S.D.; HUMES, P.E.; GODKE, R.A. Micromanipulation and non-surgical transfer of bovine embryos. *Anim. Sci.*, 59 (suppl. 1):393, 1984.
- 17-WIEMER, K.E.; CASEY, P.; DEVORE, D.; GODKE, R.A. The culture of equine embryos using new monolayer cultures derived from fetal uterine fibroblast cells. *Theriogenology*, 29:327, 1988.
- 18-WILLADSEN, S.M. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to procedure monozygotic twins. *Nature*, London, 277:298-300, 1979.
- 19-WILLADSEN, S.M. The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 59:357-362, 1980.
- 20-WILLADSEN, S.M. The developmental capacity of blastomeres from 4 - and 8- cell sheep embryos. *J. Embryol. exp. Morph.*, 65:165-172, 1981.

21-WILLADSEN, S.M. Micromanipulation of embryos of the large domestic species. In: ADAMS, C.E., ed. *Mammalian egg transfer*. Boca Raton, C.R.C. Press, 1982. p.185-210.

22-WILLADSEN, S.M. & FEHILLY, C.B. In: BEIER, H.M. & LINDER, H.R. *Fertilization of human egg in vitro*. Berlin, 1983. p.353.

23-WILLIAMS, T.J.; ELSDEN, R.P.; SEIDEL JUNIOR, G.E. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. *Theriogenology*, 17:114, 1982.

24-WILLIAMS, T.J.; ELSDEN, R.P.; SEIDEL JUNIOR, G.E. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 22:521-531, 1984.

Recebido para publicação em 11/07/89

Aprovado para publicação em 14/11/89