

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

LUCIANA DA SILVA LEAL

ASPECTOS GERAIS DA  
BIPARTIÇÃO E QUARTEAÇÃO DE  
EMBRIÕES

Monografia apresentada à disciplina de  
Seminários I, do Programa de  
Pós-graduação em Medicina Veterinária,  
área de concentração em Reprodução  
Animal, curso Mestrado.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Titular Eunice Oba

Docentes responsáveis:

Prof.<sup>a</sup> Adj. Maria Denise Lopes

Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo

Botucatu

2002

## SUMÁRIO

I.	Introdução e objetivo.....	3
II.	Revisão de literatura	
	1. Bovinos.....	4
	2. Ovinos.....	12
	3. Caprinos.....	13
	4. Eqüinos.....	14
III.	Considerações finais.....	15
IV.	Referências bibliográficas.....	16

## I. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

A pecuária brasileira passa por um processo de transformação, com a qual tenta-se maximizar a produtividade, utilizando tecnologias que permitam lucro na produção. A biotecnologia reprodutiva tem avançado nestes últimos anos e conseguido resultados relevantes com a manipulação, sexagem e divisão de embriões, fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e clonagem. A comprovação da eficácia de tais técnicas só é obtida após a transferência das estruturas produzidas no momento adequado, com a confirmação da gestação e o nascimento de produtos saudáveis.

Os benefícios imediatos da divisão de embriões são duplicados; não somente o número potencial de bezerros obtidos de uma vaca doadora cresce, como existe a possibilidade de produzir-se gêmeos idênticos, interessantes para serem utilizados em pesquisas nas áreas de genética, nutrição, ambiente e sanidade animal.

Atualmente este procedimento pode ser feito em condições de campo, permitindo a transferência de embriões biopsiados a fresco. Neste sentido, Rumpf et al. (1993), afirmaram que a bipartição de embriões a fresco, em fazendas, é um excelente instrumento à disposição dos técnicos para aumentar o número de produtos por embrião recuperado.

O objetivo desta revisão é apresentar dados sobre a divisão de embriões em mamíferos, com principal ênfase na espécie bovina.

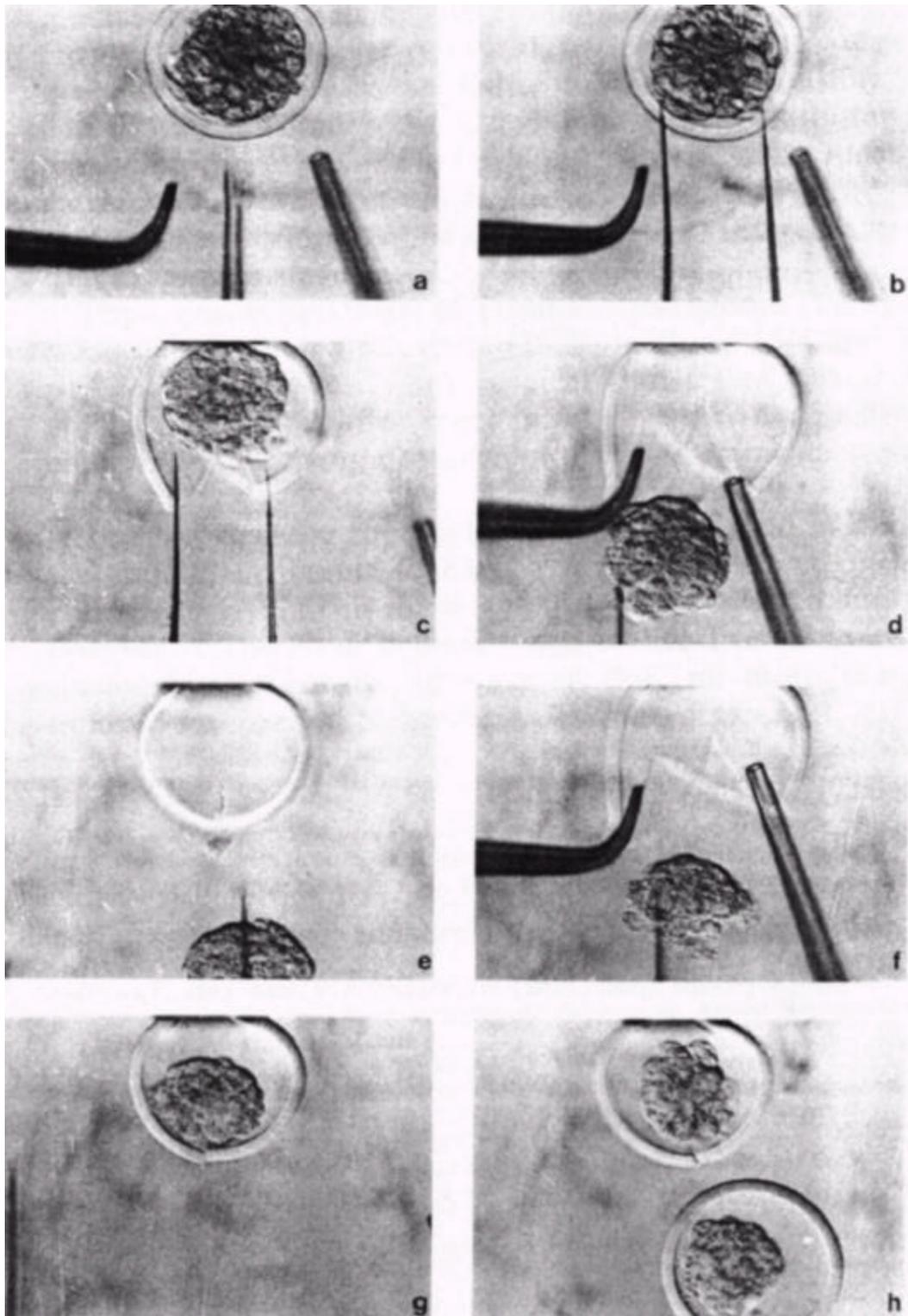
## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Bovinos

Um método original para a produção de gêmeos monozigóticos em ovinos e bovinos foi descrito por Willadsen (1979). Entretanto, este método requeria técnicas para proteger a zona pelúcida e os embriões eram cultivados *in vivo* numa receptora intermediária antes da transferência, o que tornou o método difícil de ser usado em combinação com as técnicas de rotina adotadas na transferência de embriões em vacas.

Em 1982, OZIL et al., mostraram que era possível produzir gêmeos idênticos após a transferência direta de embriões micromanipulados sem usar cultivo *in vivo* e sem precisar de uma proteção artificial da zona pelúcida após a micromanipulação. Estes pesquisadores coletaram embriões de 6 a 7 dias de novilhas Charolês superestimuladas. Após a bipartição dos embriões recuperados, introduziu-se uma das metades na zona pelúcida original e a outra metade em zona pelúcida proveniente de ovócito de vacas abatidas. Catorze pares de hemi-embriões foram transferidos para 14 vacas receptoras, por via transcervical, obtendo-se uma taxa de gestação de 64,2%.

De uma forma geral a técnica de divisão de embriões pode ser explicada através da figura a seguir.



Fonte: Ozil et al. (1982).

Figura 1. Demonstração de uma das técnicas para a divisão de embriões.

- a.** O embrião a ser dividido (de preferência mórula ou blastocisto inicial, de excelente ou boa qualidade) é colocado numa microgota com meio para manipulação. O embrião pode ser preso utilizando-se ou não uma pipeta fixadora;
- b e c.** Dois instrumentos pontiagudos abrem a zona pelúcida;
- d.** Um pequeno volume de meio é injetado dentro do embrião para facilitar a saída da massa celular;
- e.** A massa celular é dividida em duas partes utilizando-se agulha de vidro fina ou microlâmina;
- f, g e h.** Cada metade é inserida numa zona pelúcida que pode ser proveniente de ovócito de animais abatidos ou de embriões degenerados.

Na revisão bibliográfica realizada encontrou-se variações nos procedimentos adotados na técnica de divisão dos embriões e na implantação das estruturas produzidas, entre elas estão:

#### **a.) Estágio de desenvolvimento**

Em 1984, WILLIAMS et al. concluíram que o estágio de desenvolvimento do embrião no momento da divisão influencia na taxa de gestação. Estes pesquisadores obtiveram taxas de gestação de 16% para mórulas bipartidas e 60% para blastocistos iniciais bipartidos.

Mc Evoy & Sreenan (1990) verificaram taxa de gestação (50 vs. 73%), taxa de sobrevivência fetal (15 vs. 45%) e número de fetos por embrião original (30 vs. 91%) menores para mórulas bipartidas do que para blastocistos bipartidos.

No entanto, Reichenbach et al. (1998) concluíram que a divisão de mórulas de qualidade boa ou satisfatória, cultivadas por um curto período, pode produzir um

número satisfatório de pares viáveis de hemi-embriões monozigóticos quando comparada a divisão de blastocistos de boa qualidade do grupo controle.

#### **b.) Presença ou ausência de zona pelúcida**

Segundo Warfield et al. (1986) a técnica de divisão de embriões poderia se tornar mais prática se as estruturas produzidas pudessem ser transferidas sem zona pelúcida (*zona-free*). Eles realizaram um estudo com três grupos (G) distintos: G<sub>1</sub> = hemi-embriões inseridos em zona pelúcida estranha; G<sub>2</sub> = hemi-embriões sem zona pelúcida e G<sub>3</sub> = hemi-embriões embebidos num pequeno *plug* de 7 % de gelatina. Não houve diferença significativa nas taxas de gestação entre hemi-embriões inseridos ou não em zona pelúcida, e a sobrevivência fetal foi similar nos três grupos. Em 1989, SEIKE et al. também não obtiveram diferença significativa entre as taxas de gestação resultantes da implantação de embriões bipartidos sem zona pelúcida e embriões íntegros com zona pelúcida.

#### **c.) Transferência de um ou um par de hemi-embrião**

Ozil et al. (1982) verificaram taxa de gestação de 64,2% para pares de hemi-embriões transferidos para as vacas receptoras e taxa de gestação gemelar de 66,6%.

Lambeth et al. (1983) superestimularam vacas doadoras com Hormônio folículo estimulante (FSH), administrado duas vezes ao dia, por via intramuscular. Os embriões foram coletados nos dias 6,5 a 7 após o cio, mantidos num meio contendo 10% de soro fetal bovino, bipartidos num plano vertical e inseridos em zona pelúcida. Em seguida, realizou-se a transferência não-cirúrgica de hemi-embriões e pares de hemi-embriões para as vacas receptoras, obtendo-se taxa de gestação maior no último grupo. Os resultados estão apresentados na tabela a seguir.

Tabela 1. Embriões coletados de maneira não-cirúrgica para micromanipulação e subsequente transferência não-cirúrgica para vacas receptoras.

Item	Número	Porcentagem
Nº de estruturas coletadas	37	100,0
Nº de estruturas fertilizadas	30	81,1
Nº de mórulas e blastocistos	28	93,3
Nº de embriões selecionados	20	71,4
Nº de embriões bipartidos	18	90,0
Nº de receptoras	14	100,0
Nº de receptoras com um par de hemi-embrião	8	57,1
Nº de receptoras com um hemi-embrião	6	42,9
Nº de prenheses com um par de hemi-embrião	5	62,5
Nº de prenhez com um hemi-embrião	1	16,6

Fonte: Lambeth et al. (1983)

Rumpf et al. (1993) trabalharam com três grupos (G): G<sub>1</sub>= bissecção e inovulação de um hemi-embrião para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo para cada receptora; G<sub>2</sub> = bissecção e inovulação do par de hemi-embrião para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo de uma receptora e G<sub>3</sub> = inovulação de embrião inteiro. Foram utilizados somente embriões nos estágios de desenvolvimento de mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto, de graus I e II. Todas as inovulações foram a fresco e por via transcervical. No G<sub>1</sub> foram bipartidos 13 embriões obtendo-se 26 hemi-embriões, todos inovulados em 26 receptoras, das quais 14 ficaram prenhas (53,8% considerando o número de hemi-embriões e 107,7% considerando o número de

embriões originais). No G<sub>2</sub> foram bipartidos 18 embriões, obtendo-se 36 hemi-embriões, inovulados aos pares em 18 receptoras, das quais somente 6 (31,5%) ficaram prenhas. No G<sub>3</sub> foram inovulados 16 embriões e obtidas 10 prenheses (62,5%). O resultado obtido pela inovulação do par de hemi-embrião (31,5%) foi inferior aos resultados obtidos pelos autores citados acima, porém foi semelhante aos resultados alcançados por Warfield et al. (1986) (32,0%).

#### **d.) Divisão do embrião antes ou após a congelação/descongelação**

A sensibilidade dos embriões micromanipulados à criopreservação deve-se à destruição dos blastômeros e à integridade da zona pelúcida (Filho, 1998).

Lehn-Jensen & Willadsen (1983) foram os primeiros a conseguir o nascimento de bezerros oriundos de hemi-embriões congelados. Estes autores observaram maior taxa de sobrevivência quando os embriões eram bipartidos após a descongelação de embriões íntegros. Rorie et al. (1986), obtiveram o mesmo resultado trabalhando com três grupos de embriões: o primeiro era constituído por 16 embriões bipartidos antes da congelação, o segundo por 16 embriões bipartidos após a descongelação e o terceiro grupo era de controle, formado por 13 embriões congelados sem bipartição. Os resultados deste estudo indicaram que é preferível bipartir os embriões após a descongelação de embriões inteiros que sobreviveram à criopreservação.

Entretanto, Niemann et al. (1985) sugerem que a congelação de hemi-embriões é mais eficiente do que a bipartição dos embriões no momento da descongelação.

Takeda et al. (1987) concluíram que a divisão dos embriões antes ou depois da congelação resultou em taxa de sobrevivência menor do que embriões divididos e transferidos a fresco.

### **e.) Bipartição versus quarteação**

Willadsen & Polge (1981) separaram os blastômeros de embriões bovinos de oito células em quatro pares. Cada par de blastômeros foi inserido em zona pelúcida de ovócito de suíno, embebido em ágar, e cultivado por quatro dias em oviduto de ovelha ligado. Dos 44 quartos de embriões cultivados, 91,0% apresentaram taxa de desenvolvimento normal. Antes de serem transferidos, os blastocistos foram liberados do cilindro de ágar. Vinte e seis blastocistos foram transferidos para 13 novilhas receptoras, cada uma recebeu dois hemi-embriões, um em cada corno uterino. Nove novilhas receptoras (69,2%) estavam gestantes no exame de palpação retal realizado após 50 dias da data de inovulação, sendo que seis (66,6%) apresentaram gestação gemelar. Entretanto, sete (46,6%) dos fetos foram absorvidos ou abortados entre os dias 57 e 203 da gestação. Oito fetos (53,3%) se desenvolveram e chegaram a termo: um grupo de animais trigêmeos, dois grupos de animais gêmeos e um animal sem gêmeo idêntico. Dois bezerros (um par de gêmeos) morreram ao nascimento devido a complicações obstétricas. Os seis animais que sobreviveram eram fêmeas.

Lehn-Jensen & Willadsen (1983) testaram a capacidade de sobrevivência de hemi-embriões e quartos de embriões à congelação/descongelação. Os embriões foram coletados nos dias 5 e 6 após o cio de novilhas superestimuladas. Foi realizada a divisão dos embriões em duas ou quatro partes. Cada parte foi inserida em zona pelúcida proveniente de ovócito de suíno. Os embriões foram inseridos em cilindros de ágar. Cada cilindro continha de 4 a 10 embriões. Os embriões foram cultivados em oviduto de ovelha ligado por um ou dois dias. Os embriões selecionados foram congelados em PBS contendo 10% de glicerol. Não se obteve gestação com a transferência de quartos de embriões.

Jin Rho et al. (1998) produziram 12 quartos de embriões derivados de três blastocistos produzidos *in vitro*. Transferiram os quartos de embriões em pares, em seis novilhas receptoras, resultando em duas prenheses originadas de dois blastocistos diferentes.

#### **f.) Método de inovulação do embrião**

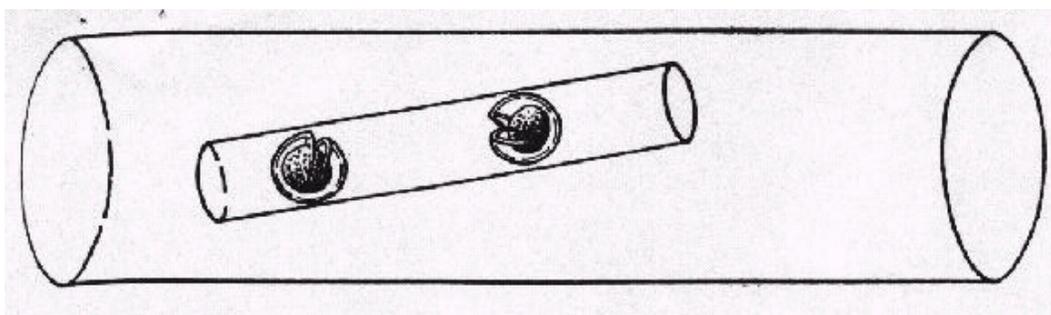
Williams et al. (1982) inovularam 20 pares de hemi-embriões em 20 vacas receptoras no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. Das 14 transferências cirúrgicas realizadas, 9 (64,3%) das vacas receptoras estavam prenhas e destas, 7 (77,8%) apresentavam gestação gemelar. Apenas uma prenhez (16,7%) foi obtida das 6 transferências não-cirúrgicas feitas.

Entretanto, em 1984, estes mesmos autores não notaram diferença significativa nas taxas de gestação obtidas através da transferência cirúrgica e não cirúrgica de embriões bipartidos.

Takeda et al. (1986) bipartiram 140 embriões de qualidade excelente ou boa. Uma das metades foi inserida na zona pelúcida do embrião original e a outra metade em zona pelúcida estranha. Embriões intactos e bipartidos foram transplantados de forma cirúrgica (via incisão no flanco) e de forma não-cirúrgica, no corno uterino ipsilateral ao ovário que apresentava corpo lúteo nas vacas receptoras sincronizadas. A prenhez foi determinada por palpação retal 60 dias após a implantação dos embriões. A transferência cirúrgica resultou numa taxa de gestação maior tanto para embriões inteiros como bipartidos.

## 2. Ovinos

Willadsen (1979) descreveu a produção artificial de cordeiros gêmeos monozigóticos. A técnica utilizada envolveu a separação microcirúrgica de blastômeros de embriões de duas células (coletados 2 dias após o cio), a inserção de cada blastômero em zona pelúcida estranha, o encaixe destas estruturas num cilindro protetor de ágar e cultura em oviduto de ovelha ligado (por 3,5 a 4,5 dias). A viabilidade das mórulas e blastocistos iniciais produzidos desta maneira foi em torno de 50%.



Fonte: Willadsen (1979).

Figura 2. Um par de hemi-embriões inseridos num cilindro de ágar que por sua vez está dentro de uma palheta francesa.

Em 1980, este mesmo autor estudou o desenvolvimento de embriões produzidos pela introdução de blastômeros provenientes de embriões de duas células, pares de blastômeros de embriões de quatro células ou quatro blastômeros de embriões de oito células em zona pelúcida estranha. Os embriões micromanipulados foram embutidos em cilindros de ágar minúsculos, transferidos para oviduto de ovelha ligado nos dias 2 a 8 do ciclo estral (considerando-se o dia do cio como dia zero) e recuperados quando a idade total dos embriões era de 5,5 a 6,5 dias. De 78 embriões transferidos, 69 (88,5%) foram recuperados e destes, 65 (94,2%) tiveram uma taxa de desenvolvimento normal. Trinta dos hemi-embriões produzidos foram transferidos para ovelhas receptoras no dia 6 do ciclo estral, resultando no nascimento de 24 cordeiros (taxa de prenhez de 80%).

Através desse experimento, Willadsen concluiu que não houve diferença aparente na capacidade de desenvolvimento entre embriões derivados de 2, 4 ou 8 células.

Em 1984, WILLADSEN e GODKE desenvolveram uma técnica mais simples para a produção de hemi-embriões. A simplificação da técnica possibilitou o uso de equipamentos menos sofisticados e mais baratos. Estes autores coletaram, cirurgicamente, 31 embriões de 18 ovelhas nos dias 6, 7 e 8 do ciclo estral, sendo que 27 destes embriões (87%) tinham se desenvolvido normalmente. Enquanto os animais permaneciam sob o efeito da anestesia geral, os embriões foram bipartidos. Para a manipulação dos embriões utilizou-se um micromanipulador Leitz (com uma unidade direita e esquerda) e um estereomicroscópio Wild M5. Cada uma das 18 ovelhas utilizadas no experimento recebeu um par de hemi-embriões. Duas ovelhas retornaram ao cio, sete apresentaram gestação de um feto e oito apresentaram gestação gemelar, resultando em taxa de gestação de 63,9% considerando o número de hemi-embriões e 127,8% considerando o número total de embriões originais implantados (18).

### **3. Caprinos**

A taxa de sobrevivência reduzida após a transferência de hemi-embriões pode ser devida a menor viabilidade embrionária após a divisão, falha na capacidade do hemi-embrião prevenir a regressão do corpo lúteo nas fêmeas receptoras ou uma combinação de fatores (Beckett et al., 1999).

Oppenheim et al. (2000) realizaram dois experimentos. No experimento 1, 115 hemi-embriões de cabras foram transferidos para 57 cabras receptoras. Dezenove receptoras prenhas (33,3%) produziram 22 cabritos (19,1%). No experimento 2, 67 hemi-embriões criopreservados que apresentavam-se viáveis após a congelação/descongelação foram transferidos para 21 cabras receptoras. Apenas uma

cabra emprenhou. Desta forma, estes autores concluíram que as técnicas de divisão e criopreservação de embriões têm um efeito negativo nas taxas de sobrevivência embrionária e gestação.

#### **4. Eqüinos**

Em 1984, ALLEN & PASHEN demonstraram que a técnica desenvolvida por Willadsen (1979) para a separação mecânica de blastômeros poderia também ser usada para a produção de potros idênticos. No experimento realizado por estes autores, 19 embriões de 2 a 8 células foram recuperados, cirurgicamente, de 23 éguas, um a três dias após a ovulação. Os blastômeros foram mecanicamente separados e inseridos, em várias combinações, no interior de zonas pelúcidas de suíno. Produziu-se 27 metades e 17 quartos de embriões. Estas estruturas foram revestidas por ágar e cultivadas *in vivo* em oviduto de ovelha ligado por 3,5 a 5 dias, para permitir o desenvolvimento de mórulas e blastocistos iniciais. Realizou-se transferência cirúrgica e não-cirúrgica de 13 hemi-embriões e 17 quartos de embriões para éguas receptoras, resultando em 10 gestações.

Huhtinen et al. (1997) realizaram a biopsia de embriões eqüinos para a determinação do sexo e observaram que a cápsula que reveste o embrião eqüino não dificultou a biopsia quando uma microlâmina foi usada. Porém, quando eles tentaram separar um blastômero com uma agulha, a cápsula elástica bloqueou o orifício da agulha.

### III. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A divisão de embriões é uma biotécnica da reprodução animal que pode ser utilizada na rotina de um programa de transferência de embriões para aumentar a produção de bezerros (Leibo & Rall, 1987).

O uso desta técnica em embriões bovinos transferidos a fresco apresentou sucesso em diversos experimentos. Porém, a viabilidade dos embriões produzidos é severamente reduzida quanto maior o número de divisões do embrião original e quando estes são submetidos à criopreservação.

Nas outras espécies domésticas o sucesso da divisão de embriões é mais restrito, com exceção da ovelha, que apresenta resultados relevantes.

Apesar de tantas vantagens, não foi encontrada na literatura cálculo real sobre o custo-benefício da implantação desta biotécnica num programa de transferência de embriões bovinos.

### IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ALLEN, W. R., PASHEN, R. L. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. **J. Reprod. Fert.**, v. 71, p. 607-13, 1984.

BECKETT, D. M., OPPENHEIM, S. M., MOYER, A. L., BONDURANT, R. H., ROWE, J. D., ANDERSON, G. B. Progesterin implants can rescue demi-embryo pregnancies in goats: a case study. **Theriogenology**, v. 51, p. 1505-11, 1999.

HUHTINEN, M., PEIPPO, J., BREDBACKA, P. Successful transfer of biopsied equine embryos. **Theriogenology**, v. 48, p. 361-67, 1997.

JIN RHO, G., JOHNSON, W. H., BETTERIDGE, K. J. Cellular composition and viability of demi- and quarter-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced *in vitro*. **Theriogenology**, v. 50, p. 885-95, 1998.

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**, v. 20, n. 1, p. 85-95, 1983.

LEHN-JENSEN, H., WILLADSEN, S. M. Deep-freezing of cow half and quarter embryos. **Theriogenology**, v. 19, n. 1, p. 49-54, 1983.

LEIBO, S. P., RALL, W. F. Increase in production of pregnancies by bisection of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 245, 1987.

Mc EVOY, T. G., SREENAN, J. M. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pelucida-free cattle demi-embryo. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1245-51, 1990.

NIEMANN, H., BREM, G., SACHER, B., SMIDT, D., KRÄUSSLICH, H. An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 519-24, 1985.

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2001.

OPPENHEIM, S. M., MOYER, A. L., BONDURANT, R. H., ROWE, J. D., ANDERSON, G. B. Successful pregnancy in goats carrying their genetically identical conceptus. **Theriogenology**, v. 54, p. 629-39, 2000.

OZIL, J. P., HEYMAN, Y., RENARD, J. P. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. **Vet. Rec.**, v. 110, p. 126-27, 1982.

REICHENBACH, H. D., SCHWARTZ, J., WOLF, E., BREM, G. Effects of embryo development stage, quality and short-term culture on the efficiency of bovine embryo splitting. **Theriogenology**, v. 49, p. 224, 1998.

RORIE, R. W., PENDLETON, R. J., YOUNGS, C. R., GODKE, R. A. Viability of demi-embryos produced before vs. after deep freezing. **Theriogenology**, v. 25, n. 1, p. 192, 1986.

RUMPF, R., BEM, A. R., SOUSA, R. V., PEIXER, M. A. S. Bisseção de embriões bovinos. **Ars Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 187, 1993.

SEIKE, N., SAEKI, K., UTAKA, K., SAKAI, M., TAKAKURA, R., NAGAO, Y., KANAGAWA, H. Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without zonae pellucidae. **Theriogenology**, v. 32, n. 2, p. 211-19, 1989.

SREENAN, J. M., DISKIN, M. G. Factors affecting pregnancy rates following embryo transfer in the cow. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 99-113, 1987.

TAKEDA, T., HALLOWELL, S. V. McCAULEY, A. P., HASLER, J. F. Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and nonsurgically. **Theriogenology**, v. 25, p. 205, 1986.

TAKEDA, T., HENDERSON, W. B., HASLER, J. F. Deep freezing of split and intact bovine embryos. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 285, 1987.

WARFIELD, S. J., SEIDEL Jr, G. E., ELSDEN, R. P. Transfer of bovine demi-embryos with and without zonae pellucidae. **Theriogenology**, v. 25, n. 1, 1986.

WILLADSEN, S. M. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. **Nature**, v. 277, p. 298-300, 1979.

WILLADSEN, S. M., GODKE, R. A. A simple procedure for the production of identical sheep twins. **Vet. Rec.**, v.10, p. 240-3, 1984.

WILLADSEN, S. M., POLGE, C. Attempts to procedure monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. **Vet. Rec.**, v. 108, p. 211-3, 1981.

WILLIAMS, T. J., ELSDEN, R. P., SEIDEL Jr, G. E. Effect of embryo age and stage on pregnancy rates from demi-embryos. **Theriogenology**, v. 21, n. 1, p. 279, 1984.

WILLIAMS, T. J., ELSDEN, R. P., SEIDEL Jr, G. E. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 521-29, 1984.

WILLIAMS, T. J., ELSDEN, R. P., SEIDEL Jr, G. E. Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. **Theriogenology**, v. 17, n. 1, p. 114, 1982.