

Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem

Roberto Sartori e Margot Alves Nunes Dode

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil;
E-mail: sartori@cenargen.embrapa.br, margot@cenargen.embrapa.br

Introdução

Na reprodução de bovinos, além dos aspectos relacionados ao sêmen e técnicas de inseminação ou monta natural, alterações na qualidade ovocitária, ou no ambiente uterino e de ovidutos também podem afetar os índices de fecundação e de desenvolvimento embrionário. Dentre os fatores que podem comprometer o transporte de gametas, fecundação dos ovócitos, integridade ovocitária, ou a viabilidade embrionária e fetal em bovinos, encontram-se fatores ambientais, genéticos, metabólicos, nutricionais e infecciosos. Esta revisão procura descrever e discutir resultados de diversos estudos que avaliaram taxas de fecundação e de morte embrionária em bovinos com ovulação única ou superovulados. Além disso, apresenta dados de morte embrionária em receptoras de embriões produzidos *in vivo*, *in vitro* e clonados por transferência nuclelar (TN).

Taxas de fecundação em fêmeas bovinas com ovulação única (não superovuladas)

Durante a monta, o touro deposita bilhões de espermatozoides na vagina da vaca. Entretanto, devido ao fato da cérvix ser o maior obstáculo ao transporte espermático, o número de espermatozoides que alcançam o corpo uterino não ultrapassa 1% (Harper, 1982). Na IA, o sêmen é depositado diretamente no útero, ultrapassando a cérvix e permitindo o uso de um número reduzido de espermatozoides. Após a monta ou IA, o sêmen é exposto a uma série de ambientes distintos que alteram significativamente o número e a função espermática. Muitos espermatozoides são perdidos no trato genital feminino pelo transporte retrógrado (Mullins e Saacke, 1989). Espermatozoides viáveis que são retidos no trato genital feminino devem atravessar o útero, passar para o oviduto pela junção útero-tubárica, interagir com o epitélio do oviduto e sofrer capacitação antes de poder fecundar o ovócito (Berger, 1996).

Na fêmea bovina, ao início do estro, altas concentrações de LH desencadeadas pelas elevadas concentrações circulantes de estradiol (E₂) induzem o reinício da meiose no ovócito (revisado por Mermillod et al., 1999) e iniciam uma seqüência de eventos que levam à ovulação. Quando o folículo se rompe, o ovócito rodeado por células do cumulus é liberado na cavidade peritoneal e capturado pelas células epiteliais ciliadas do infundíbulo. O ovócito é então transportado através da ampola para a junção istmo-ampolar, onde ocorre a fecundação.

Diversos estudos têm relatado que a taxa de fecundação após IA de estruturas colhidas de oviduto ou útero de vacas não superovuladas é alta, independente de idade ou raça (Tabela 1). Estudos com novilhas de corte ou leite observaram 82 a 100% de taxa de fecundação após uma única IA. Taxas de fecundação similares (75 a 100%) foram também relatadas em vacas de corte (Tabela 1). Resultados inferiores de taxa de fecundação, entretanto, foram observados em algumas circunstâncias específicas. Vacas com alta produção leiteira sob condições de estresse térmico apresentaram taxas de fecundação de apenas 55% (Tabela 1). Vacas leiteiras repetidoras de serviço ("repeat-breeders") tiveram 62 e 72% de fecundação, como descrito por Almeida (1995) e O'Farrell et al. (1983), respectivamente. Em um experimento em que vacas holandesas não lactantes foram inseminadas somente no momento do início do estro, a taxa de fecundação foi ao redor de 67% (Tabela 1). Portanto, embora em geral as taxas de fecundação são elevadas em bovinos, algumas condições especiais tais como estresse térmico, ou momento inadequado da IA, podem comprometer a fecundação.

Após a fecundação, o zigoto passa por uma série de divisões celulares (clivagem) e permanece no oviduto até o dia 3 ou 4, quando então entra no útero. A porcentagem de ovócitos que não são capturados pelo infundíbulo após a ovulação ou a porcentagem de embriões/óvulos que não são transportados ao útero após 3 a 4 dias do pico de LH, não é conhecida, mas é muito provável que alguns embriões/óvulos são

perdidos antes de alcançarem o útero. De fato, diversos estudos que lavaram o oviduto ou útero de bovinos com o propósito de avaliar taxa de fecundação ou qualidade embrionária entre os dias 3 e 14 após IA em vacas não superovuladas (Breuel et al., 1993; Ryan et al., 1993; Almeida, 1995; Dunne et al., 2000; Dalton et al., 2001a; Sartori et al., 2002b) ou superovuladas (Kelly et al., 1997; Sartori et al., 2003b; 2004b) colheram abaixo de 85% de embriões e/ou óvulos por corpo lúteo (CL). Caso de fato nem todos os óvulos alcançam o sítio de fecundação, é provável que as taxas de fecundação relatadas na literatura estejam superestimadas. Além disso, os estudos que avaliaram taxas de fecundação em bovinos foram conduzidos sob condições experimentais controladas, que podem não refletir completamente a realidade nas fazendas.

Tabela 1. Taxa de fecundação em vacas e novilhas não superovuladas.

Referência	Animal	Taxa de fecundação; % (n/n)
Ahmad et al. (1995)	Vacas de corte	95,0% (19/20)
Ahmad et al. (1995)	Vacas de corte com folículo persistente	100,0% (14/14)
Almeida (1995)	Vacas de leite lactantes repetidoras de cio	62,4% (63/101)
Almeida (1995)	Vacas de leite lactantes não repetidoras de cio	74,5% (70/94)
Breuel et al. (1993)	Vacas de corte pós parto	75,0% (30/40)
Cerri et al. (2004)	Vacas de leite lactantes	80,2% (69/86)
Dalton et al. (2001a)	Vacas de leite não lactantes (IA no início do cio)	66,7% (52/78)
Dalton et al. (2001a)	Vacas de leite não lact. (IA 12 h após início do cio)	78,2% (61/78)
Dalton et al. (2001a)	Vacas de leite não lact. (IA 24 h após início do cio)	82,1% (32/39)
Diskin e Sreenann (1980)	Novilhas de corte	91,2% (156/171)
Dunne et al. (2000)	Novilhas de corte	89,2% (33/37)
Hawk e Tanabe (1986)	Vacas em primeiro serviço	97,6% (41/42)
Hawk e Tanabe (1986)	Vacas repetidoras de cio	88,5% (23/26)
O'Farrell et al. (1983)	Vacas de leite lactantes repetidoras de cio	72,0% (13/18)
Roche et al. (1981)	Novilhas de corte	82,2% (88/107)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (inverno)	85,9% (73/85)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (verão)	84,9% (90/106)
Saacke et al. (1998)	Vacas	83,8% (26/31)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite não lactantes (inverno)	89,5% (34/38)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite lactantes (inverno)	87,8% (36/41)
Sartori et al. (2002b)	Novilhas de leite (verão)	100,0% (32/32)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite lactantes (verão)	55,3% (21/38)
Tanabe et al. (1994)	Vacas de leite lactantes	87,0% (87/100)
Wiebold (1988)	Vacas de leite lactantes	100,0% (25/25)
Média	Todos	82,1% (1188/1447)

Taxas de fecundação em fêmeas bovinas superovuladas

Vacas e novilhas submetidas a tratamentos hormonais com o propósito de produzirem ovulações múltiplas, geralmente apresentam uma alta porcentagem de ovócitos não fecundados no lavado uterino (Tabela 2). Entre os trabalhos citados na Tabela 2, as menores taxas de fecundação após superovulação foram observadas em vacas repetidoras de serviço (Hawk e Tanabe, 1986), vacas inseminadas no início do estro (Dalton et al., 2000), e novilhas inseminadas com espermatozoides sexados (Sartori et al., 2004b). Em contraste, quando fêmeas superovuladas foram inseminadas com sêmen de alta qualidade e no momento apropriado em relação ao estro (Dalton et al., 2000; Sartori et al., 2004b), as taxas de fecundação relatadas foram superiores a 80%. Apesar disso, nos estudos que compararam diretamente vacas não superovuladas às superovuladas (Elsden et al., 1976; Saacke et al., 1998 [Tabelas 1 e 2]), taxas menores de fecundação ocorreram nas superovuladas. Como discutido por Kafi e McGowan (1997), a

menor taxa de fecundação em bovinos superovulados pode ser decorrente de distúrbios no transporte de espermatozóides e ovócitos, além da qualidade inferior dos ovócitos. De fato, conforme citado por Hyttel et al. (1991), tratamentos superovulatórios têm efeitos adversos na maturação ovocitária ou das células da granulosa, comprometendo não somente a fecundação mas também a viabilidade embrionária.

Tabela 2. Taxa de fecundação em vacas e novilhas superovuladas.

Referência	Animal	Taxa de fecundação; % (n/n)
Hawk e Tanabe (1986)	Vacas em primeiro serviço	73,8% (267/362)
Hawk e Tanabe (1986)	Vacas repetidoras de cio	43,0% (55/128)
Saacke et al. (1998)	Vacas	64,5% (100/155)
Dalton et al. (2000)	Vacas de leite não lactantes (IA no início do cio)	29,2% (57/195)
Dalton et al. (2000)	Vacas de leite não lact. (IA 12 h após início do cio)	59,9% (124/207)
Dalton et al. (2000)	Vacas de leite não lact. (IA 24 h após início do cio)	81,1% (103/127)
Sartori et al. (2003b)	Novilhas de leite	67,8% (99/146)
Sartori et al. (2004b)	Novilhas de leite	87,9% (124/141)
Sartori et al. (2004b)	Novilhas de leite (IA com espermatozóide sexado)	56,0% (112/200)
Média	Todos	62,7% (1041/1661)

Taxas de fecundação em ovócitos maturados e fecundados *in vitro* e taxa de ativação de ovócitos receptores após a transferência nuclear

A fecundação *in vitro* (FIV) é uma das etapas da produção *in vitro* de embriões (PIV), que envolve a manipulação dos gametas e a obtenção de embriões em laboratório. Para a PIV são utilizados ovócitos imaturos recuperados de folículos antrais de ovários de animais vivos e/ou de ovários obtidos logo após o abate dos animais. Quando os ovócitos são aspirados dos folículos ovarianos (em geral de 2 a 6 mm de diâmetro) para serem utilizados na PIV, eles ainda são imaturos e necessitam sofrer o processo de maturação *in vitro*. Essa é realizada cultivando os ovócitos, logo após a aspiração folicular, em meio de maturação com temperatura e atmosfera apropriadas, por um período de 22 a 24 horas. A maturação envolve mudanças nucleares e citoplasmática que devem ocorrer simultaneamente e que conferem aos ovócitos a capacidade de serem fecundados e terem desenvolvimento embrionário normal (Dode, 2006). Após a maturação, os ovócitos são transferidos para gota de fecundação e o sêmen, previamente preparado, é adicionado na gota em uma concentração final de 1 a 2 milhões de espermatozóides/mL de meio (Parrish et al., 1985; Gordon, 2003). Ovócitos maduros e espermatozóides são incubados por um período de 12 a 18 horas (Dode et al., 2002). Após a co-incubação as estruturas são transferidas para o meio de cultivo embrionário onde permanecem por um período de sete dias, quando então, são transferidas para as receptoras, de forma semelhante ao realizado com os embriões produzidos *in vivo*.

Após a penetração no ovócito, o espermatozóide inicia uma série de eventos envolvendo os componentes nucleares e citoplasmáticos de ambos os gametas. Ocorre a descondensação da cabeça, a formação do envelope nuclear e do pró-núcleo masculino. Concomitantemente, o ovócito retoma a meiose, expulsa o segundo corpúsculo polar e forma o pró-núcleo feminino. Após a formação dos pró-núcleos, esses se aproximam e ocorre a singamia e a formação do novo indivíduo com início das divisões meióticas.

A taxa de fecundação após a FIV pode ser avaliada pela presença do espermatozóide no citoplasma do ovócito, pela descondensação da cabeça, pela formação dos pró-núcleos e pela taxa de clivagem. Em bovinos devido à presença de vesículas de lipídeos e outros pigmentos, a presença do espermatozóide no citoplasma e a formação dos pró-núcleos não são visíveis, a não ser que outras técnicas como coloração e/ou centrifugação e avaliação em microscopia de contraste de fase ou interferência sejam empregadas (Gordon, 2003). Portanto, o parâmetro mais utilizado para avaliar a fecundação é a taxa de clivagem. A taxa de fecundação avaliada pela formação dos pró-núcleos às 18 horas após a inseminação é, em geral,

acima de 70% (Alomar et al., 2006; Alomar et al., 2007). Resultados semelhantes foram relatados quando a taxa de fecundação (> 70%) foi avaliada pela taxa de clivagem (Bousquet et al., 1999; Dode et al., 2002; Palma e Sinowatz, 2004; Pereira et al., 2005; Cesari et al., 2006; Corrêa et al., 2008). Apesar da maioria dos ovócitos obtidos por aspiração folicular terem capacidade de clivar (Sirard et al., 2005), essa taxa pode variar significativamente, pois além dos fatores que normalmente afetam a fecundação *in vivo*, outros como a qualidade do ovócito, preparação do sêmen e condições de cultivo podem também influenciar. Entretanto, o fator de maior impacto na taxa de clivagem e/ou fecundação é o touro utilizado, sendo a grande variabilidade na fertilidade *in vitro* de touros um dos problemas na utilização comercial da PIV. Essa variação tem sido demonstrada em diversos estudos, em que a taxa de clivagem variou de 26% a 94% quando diferentes touros foram utilizados na FIV (Kochher et al., 2003; Palma e Sinowatz 2004; Alomar et al., 2006; Alomar et al., 2007).

Na clonagem por TN, ovócitos maturados *in vitro* são enucleados para remoção do material genético e, então utilizados como citoplasmas receptores. A seguir, é realizada a reconstrução do embrião, utilizando como fonte doadora de núcleo células embrionárias (Heyman et al., 1994), células fetais (Hill et al., 2000) ou de animais adultos (Iguma et al., 2005). A célula doadora de núcleo, que é introduzida no espaço perivitelinico, deve fundir-se com o citoplasma receptor, o que é realizado pela aplicação de pulsos elétricos. Finalmente, a ativação do citoplasma pode ser induzida por métodos físicos ou químicos. Esse passo é também fundamental para o sucesso da TN, pois simula a ação do espermatozoide. As estruturas então, são transferidas para o cultivo embrionário onde permanecem por sete dias, semelhante aos embriões PIV.

Portanto, no caso da TN a taxa de clivagem também pode ser utilizada para avaliar o sucesso da fusão e ativação. Em bovinos a taxa de clivagem após a TN pode ser influenciada por vários fatores tais como qualidade do ovócito, tipo de célula doadora de núcleo e método utilizado para a ativação. Entretanto, os resultados relatados na literatura não são inferiores aos obtidos na PIV, variando de 60 a 80% (Iguma et al., 2005; Hussein et al., 2007; Moura et al., 2007).

Desenvolvimento e sobrevivência embrionária

Diversos estágios do desenvolvimento embrionário inicial são importantes para o desenvolvimento e sobrevivência do embrião. O embrião move-se do oviduto para o útero no estágio de 8 a 16 células (Grealy et al., 1996). Com 5 a 6 dias de idade o embrião atinge o estágio de 16 a 32 células e estas células começam a se juntar para se formar uma esfera compacta denominada mórula. A compactação celular e as junções intercelulares representam o primeiro estágio crítico em que o embrião começa a atuar como um organismo individual. Nos dias 7 ou 8 uma cavidade se forma e as células do blastocisto inicial diferenciam-se em massa celular interna, destinada a formar o feto, e trofoblasto, destinado a formar a placenta (revisado por Sreenan et al., 2001). Entre os dias 9 e 10, o blastocisto expandido eclode da zona pelúcida e continua a se expandir antes de começar a alongar por volta do dia 13. O alongamento ocorre ao redor do momento do reconhecimento materno da gestação e é acompanhado por um aumento na atividade metabólica e secreção de interferon τ (revisado por Mann et al., 1999; Thatcher et al., 2001). A fixação do embrião ao endométrio começa aproximadamente no dia 19. A implantação embrionária está completa no dia 42. A sobrevivência do embrião e estabelecimento da gestação envolvem comunicação ativa e passiva entre o embrião e o útero. A manutenção do CL, como resultado dos sinais embrionários para a mãe, garante a produção continuada de progesterona (P₄), a qual é necessária para preparar o endométrio para implantação e nutrição embrionária. A presença do embrião por volta do dia 16 do ciclo inibe a síntese e liberação de PGF₂ α do endométrio (revisado por Geisert et al., 1994; Mann et al., 1999; Thatcher et al., 2001; Okuda et al., 2002), prevenindo assim a luteólise e o conseqüente declínio na produção de P₄.

Embora falha na fecundação após inseminação não pareça ser um grande problema para o estabelecimento da gestação em bovinos, mortalidade embrionária é considerada a principal causa responsável pelo aumento no intervalo de partos nos bovinos. A maioria das perdas embrionárias ocorre durante o período embrionário da gestação (< 45 d) tanto em bovinos de corte quanto de leite (Thatcher et

al., 1994; Vanroose et al., 2000; Sreenan et al., 2001) e, de acordo com Wathes (1992), a maioria das mortes embrionárias ocorre nos primeiros dias após fecundação e durante o processo de implantação.

As condutas utilizadas para avaliar mortalidade embrionária precoce em bovinos têm sido abater animais em intervalos específicos após a inseminação e colher embriões/óvulos do oviduto ou útero, e mais recentemente, colher embriões *in vivo* do útero utilizando-se lavados uterinos. Diversos estudos sobre perda embrionária inicial foram realizados há mais de 20 anos (Boyd et al., 1969; Ayalon et al., 1978; Diskin e Sreenan, 1980; Roche et al., 1981; Maurer e Chenault, 1983). Estudos que avaliaram vacas de corte com alta incidência de infertilidade (“repeat-breeders”), observaram em torno de 30% de perda embrionária até o dia 7 após o estro (Ayalon et al., 1978; Maurer e Chenault, 1983). Por outro lado, estudos com novilhas de corte de fertilidade elevada, descreveram altas taxas de sobrevivência embrionária até o dia 8. A maioria das mortes embrionárias nesses estudos ocorreu entre o dia 8 e 18 após IA (Diskin e Sreenan, 1980; Roche et al., 1981). Em um estudo mais recente, Dunne et al. (2000) não observaram diferenças na sobrevivência embrionária nos dias 14, 30 ou ao parto em novilhas de corte. Os autores sugeriram que a maioria das perdas embrionárias nas novilhas havia ocorrido antes do dia 14. A Tabela 3 resume resultados de diversos estudos sobre desenvolvimento e sobrevivência embrionária inicial em bovinos de corte, novilhas de leite e vacas de leite não lactantes. Em geral, com exceção de vacas que ovularam folículos persistentes, a porcentagem de embriões viáveis colhidos entre os dias 3 e 16 foi elevada na maioria dos estudos (78% de média).

Tabela 3. Porcentagem de embriões viáveis colhidos de bovinos não superovulados (exceto vacas leiteiras lactantes).

Referência	Animal	Dias após IA	Embriões viáveis; % (n/n)
Ahmad et al. (1995)	Vacas de corte	6	73,7% (14/19)
Ahmad et al. (1995)	Vacas de corte com folículo persistente	6	14,3% (2/14)
Diskin e Sreenann (1980)	Novilhas de corte	4 ou 8	95,3% (61/64)
Diskin e Sreenann (1980)	Novilhas de corte	12	56,0% (9/16)
Diskin e Sreenann (1980)	Novilhas de corte	16	65,7% (23/35)
Dunne et al. (2000)	Novilhas de corte	14	86,5% (32/37)
Roche et al. (1981)	Novilhas de corte	3 ou 8	82,2% (88/107)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite não lactantes (inverno)	6	82,3% (28/34)
Sartori et al. (2002b)	Novilhas de leite (verão)	6	71,9% (23/32)
Média	Todos	3 a 16	78,2% (280/358)

Contrastando com o elevado número de embriões viáveis observado em bovinos de corte, e fêmeas de leite não lactantes, estudos que avaliaram o desenvolvimento embrionário inicial em vacas de leite lactantes, demonstraram índices muito mais baixos de sobrevivência embrionária entre os dias 3 e 14, especialmente em vacas com alta produção leiteira (Tabela 4). Um estudo mais antigo (Boyd et al., 1969) relatou 70% de sobrevivência embrionária até o dia 26 da gestação. Entretanto, estudos mais recentes que colheram embriões do útero de vacas com alta produção de leite não superovuladas (Wiebold, 1988; Ryan et al., 1993; Sartori et al., 2002b; Cerri et al., 2004) demonstraram uma incidência muito mais elevada de mortalidade embrionária precoce. Wiebold (1988) coletou 25 embriões de 23 vacas lactantes no dia 7 e notou que todas as estruturas estavam fertilizadas (Tabela 1), sendo que 12 eram embriões normais e 13 anormais. Dos 13 anormais, pelo menos 9 eram degenerados e possuíam ≤ 8 células. Ryan et al. (1993) colheram embriões nas estações quente e fria do ano na Arábia Saudita e observaram uma porcentagem baixa de embriões viáveis nos dias 6 ou 7 (59% durante o verão e 52% durante o inverno). Vacas com embriões colhidos nos dias 13 ou 14 durante o inverno demonstraram porcentagens similares de embriões viáveis em relação aos dias 6 ou 7 (60%). Entretanto, vacas com embriões colhidos nos dias 13 ou 14

durante o verão tiveram uma porcentagem ainda menor de embriões viáveis (27%). Nos experimentos relatados por Sartori et al. (2002b), entre os embriões colhidos no dia 6 após IA de vacas holandesas com alta produção leiteira não superovuladas, 67% não estavam viáveis no experimento durante o verão e 52% não eram viáveis no experimento do inverno (Tabela 4). No mesmo estudo, novilhas holandesas geraram 72% de embriões viáveis no verão e vacas holandesas não lactantes geraram 82% de embriões viáveis no inverno (Tabela 3). Um outro estudo (Cerri et al., 2004) que avaliou os efeitos de dietas com fontes de gordura com diferentes perfis de ácidos graxos na taxa de fecundação e qualidade embrionária em vacas lactantes sincronizadas com o protocolo Ovsynch (Pursley et al., 1995), relatou que 26 a 48% dos embriões colhidos no dia 5 após IA eram de qualidade pobre ou degenerados. Quando os dados apresentados na Tabela 4 foram agrupados, apenas 51% dos embriões colhidos de vacas lactantes entre os dias 3 e 14 eram viáveis. Portanto, em vacas com alta produção leiteira, a maioria dos embriões pode estar com sua viabilidade comprometida antes do dia 13 da gestação. Além disso, a maior parte desses embriões parece já estar comprometida antes do dia 7 em vacas com alta produção leiteira não superovuladas.

Tabela 4. Porcentagem de embriões viáveis colhidos de vacas leiteiras lactantes não superovuladas .

Referência	Animal	Dias após IA	Embriões viáveis; % (n/n)
Cerri et al. (2004)	Vacas de leite lactantes	5	62,3% (43/69)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (inverno)	6 ou 7	51,6% (16/31)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (verão)	6 ou 7	58,5% (24/41)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (inverno)	13 ou 14	59,5% (25/42)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (verão)	13 ou 14	27,1% (13/48)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite lactantes (inverno)	6	52,8% (19/36)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite lactantes (verão)	6	33,3% (7/21)
Wiebold (1988)	Vacas de leite lactantes	7	48,0% (12/25)
Média	Todos	3 a 14	50,8% (159/313)

Estudos que avaliaram mortalidade embrionária em bovinos entre os dias 25-28 e 42 com auxílio de ultrasonografia transretal e mortalidade fetal precoce entre os dias 42 e 60-70 observaram resultados muito distintos, que em geral estavam associados à raça, idade, lactação, ou procedência dos embriões (Tabela 5). Quando mortalidade embrionária tardia foi comparada à mortalidade fetal precoce, a maioria das perdas ocorreu antes do estágio fetal (Beal et al., 1992; Vasconcelos et al., 1997; Tabela 5). Os poucos estudos que avaliaram mortalidade embrionária tardia/fetal precoce em bovinos de corte, ou novilhas de leite descreveram incidências baixas ($\leq 10\%$) de perda (Tabela 5), com exceção de novilhas e vacas de corte receptoras de embriões produzidos *in vitro* (Reis et al., 2004). Contrastando com a baixa perda embrionária/fetal em bovinos de corte e novilhas de leite, trabalhos recentes em vacas de leite lactantes têm demonstrado uma incidência mais elevada de mortalidade embrionária tardia/fetal precoce. Valores entre 15 e 30% de mortalidade foram os mais comumente observados na maioria dos estudos (Tabela 5), mesmo quando embriões congelados produzidos em novilhas superovuladas e de esperada fertilidade alta foram transferidos em vacas lactantes (Sartori et al., 2003a). Após exaustiva pesquisa na literatura, encontramos apenas um estudo recente em vacas leiteiras lactantes que descreveu baixas taxas de mortalidade entre os dias 28 e 42 de gestação (Silke et al., 2002; Tabela 5). Uma peculiaridade desse estudo, entretanto, foi que as vacas eram manejadas a pasto, diferentemente dos demais estudos descritos na Tabela 5. Esses resultados conflitantes sugerem que níveis de produção de leite, e especialmente fatores nutricionais e de manejo (conforto animal) possam estar influenciando direta ou indiretamente na sobrevivência embrionária/fetal em bovinos.

Nos embriões produzidos *in vitro*, seja a partir de ovócitos maturados e fecundados *in vitro* e/ou por TN, o desenvolvimento ocorre em ambiente artificial fora do organismo materno. Portanto, além dos fatores já mencionados, a sobrevivência desses embriões também está influenciada por condições ambientais durante o cultivo. O zigoto recém formado depende de transcritos e proteínas estocados no ovócito até o estágio de 8 a 16 células, quando ocorre a transição materno-zigótica (TMZ) e o genoma do embrião é ativado. Muitos embriões PIV não chegam ao estágio de blastocisto e são bloqueados nesse período, sugerindo que a falha em ativar o genoma do embrião se deve, na maioria das vezes, à incompetência dos

ovócitos utilizados. Entretanto, outros fatores tais como a composição do meio e atmosfera gasosa também afetam a capacidade de desenvolvimento *in vitro* dos embriões. Atualmente, com sistemas de cultivo estabelecidos existe um limite consistente de produção de blastocisto de 30 a 50% (Hasler et al., 2000; Farin et al., 2001; Pereira et al., 2005; Corrêa et al., 2008). Apesar dos inúmeros problemas decorrentes da TN no desenvolvimento embrionário pós-eclosão, as taxas de produção de blastocisto de embriões clones são semelhantes (Kato et al., 2000; Iguma et al., 2005; Moura et al., 2007) às observadas em embriões PIV.

A mortalidade embrionária precoce, como mencionado acima, é uma causa reconhecida de falha reprodutiva em bovinos provocando grandes perdas econômicas. Essa, pode resultar de um defeito intrínseco do embrião, de um ambiente materno inadequado, da assincronia entre o embrião e o útero ou da falha da mãe em responder apropriadamente aos sinais do embrião (Hansen, 2002). Com o advento das novas biotecnologias essas falhas se tornaram mais evidentes, principalmente devido a defeitos intrínsecos do embrião, sendo que quanto maior o grau de artifícios da técnica utilizada maiores são as perdas embrionárias.

Existem vários relatos na literatura de taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos em diferentes sistemas de cultivo, com médias variando de 30 a 50% (Hasler et al., 2000; van Wagtenonk et al., 2000; Farin et al., 2001; Lane et al., 2003; Schmidt, 2007), que são mais baixas do que as taxas obtidas com embriões produzidos *in vivo*. Semelhante ao que ocorre nos *in vivo*, a perda dos embriões *in vitro* é mais alta nos primeiros 21 dias de gestação, sendo que a maioria ocorre nos dias 14 e 15 ou uma semana após a transferência (Farin et al., 1995; McMillan et al., 1997). Farin e colaboradores (2001) relataram que no dia 17 da gestação 19% dos embriões produzidos *in vitro* estavam degenerados, sugerindo que os embriões PIV podem ser deficientes em iniciar os mecanismos essenciais para o reconhecimento materno da prenhez. As perdas em estágios mais tardios da gestação (dia 42 a 280), são menores do que no período inicial, mas ainda são mais altas do que as observadas para embriões *in vivo*, podendo variar de 7% a 13% (Hasler et al., 2000; van Wagtenonk et al., 2000).

Entretanto, quando embriões clones são transferidos, as perdas são significativamente superiores. Cerca de 60% ou mais das prenhez são perdidas no primeiro trimestre da gestação (Heyman et al., 2002). O que é seguido por uma menor, mas constante perda na prenhez até o oitavo mês de gestação (Schmidt, 2007). Essas observações foram confirmadas em estudo recente que mostrou resultados de cinco anos de produção comercial de clones em três países distintos avaliando um total de 3374 embriões transferidos. Nesse estudo, a taxa média de prenhez aos 30 dias foi de 37%, aos 60 dias de 22%, aos 90 dias de 17% e somente 11% chegaram a termo (Panarace et al., 2007). A hipótese mais aceita para explicar esses resultados é que o desenvolvimento anormal do trofoblasto levando a placentação anormal, é a maior causa de mortalidade no primeiro trimestre da gestação (Hill et al., 2000; De Sousa et al., 2001; Arnold et al., 2006; Yang et al., 2007). Além disso, alterações na reprogramação do núcleo doador podem afetar o desenvolvimento da placenta e do feto causando problemas como hidropsia e síndrome do bezerro grande.

Tabela 5. Mortalidade embrionária tardia/fetal precoce em bovinos.

Referência	Animal	Dias de gestação	de Perda embr./fetal; % (n/n)
Beal et al. (1992)	Vacas de corte	25 a 45	6,5% (9/138)
Beal et al. (1992)	Vacas de corte	45 a 65	1,6% (2/129)
Chebel et al. (2003)	Vacas holandesas lactantes (IA)	28 a 42	19,5% (38/195)
Fricke et al. (2003)	Vacas holandesas lactantes (IA)	26-33 a 68	23,4% (67/286)
Lamb et al. (1997)	Novilhas de corte	30-35 a 60-75	4,0% (17/420)
Panarace et al. (2007)	Novilhas/vacas de corte (TE – Embr. prod. por TN)	30 a 60	40,5% (506/1248)
Reis et al. (2004)	Novilhas/vacas de corte (TE – Embr. prod. <i>in vitro</i>)	30 a 60	15,5% (37/238)
Rivera et al. (Com. pes.)	Novilhas de leite (IA)	30 a 65-75	9,3% (19/205)
Rodrigues (1995)	Novilhas de corte (TE – Embr. prod. <i>in vivo</i>)	28-32 a 55-65	5,5% (32/582)
Sartori et al. (2003a)	Vacas holandesas lactantes (IA)	25-32 a 60-66	18,6% (13/70)
Sartori et al. (2003a)	Vacas holandesas lactantes (TE – Embr. prod. <i>in vivo</i>)	25-32 a 60-66	26,2% (22/84)
Silke et al. (2002)	Novilhas de leite (IA)	28 a 42	1,5% (2/131)
Silke et al. (2002)	Novilhas de leite (IA)	42 a 56	2,3% (3/129)
Silke et al. (2002)	Vacas de leite lactantes a pasto (IA)	28 a 42	3,2% (23/705)
Silke et al. (2002)	Vacas de leite lactantes a pasto (IA)	42 a 56	2,0% (~14/682)
Stevenson et al. (2003)	Vacas de corte lactantes (IA)	29-33 a 54-61	10,8% (24/223)
Vasconcelos et al. (1997)	Vacas holandesas lactantes (IA)	28 a 42	10,9% (56/512)
Vasconcelos et al. (1997)	Vacas holandesas lactantes (IA)	42 a 56	6,4% (29/456)
Zanenga e Pedroso (1995)	Novilhas/vacas de corte (TE – Embr. prod. <i>in vivo</i>)	23-30 a 53-60	4,4% (10/229)

Discussão

Como mencionado anteriormente, há diversos fatores que podem estar envolvidos com a falha na fecundação ou mortalidade embrionária/fetal em bovinos. Problemas de fecundação ou abortamentos podem ser causados por doenças infecciosas (Bearden e Fuquay, 2000; Vanroose et al., 2000), ou infecções localizadas e restritas a órgãos específicos tais como útero (Nakao et al., 1992; Loeffler et al., 1999a,b; Gröhn e Rajala-Schultz; 2000), ou glândula mamária (Moore et al., 1991; Loeffler et al., 1999a,b; Schrick et al., 2001; Santos et al., 2004). Causas não infecciosas, entretanto, provavelmente contribuem para a maioria das perdas (Christianson, 1992; Thatcher et al., 1994; Labèrnia et al., 1996; Vanroose et al., 2000). Algumas dessas causas são anormalidades cromossômicas, fatores externos (por exemplo, estresse, produtos tóxicos, teratogênicos ou abortivos, e nutrição) e fatores maternos (por exemplo, desbalanços hormonais, lactação e idade). Aspectos técnicos ou relacionados à anatomia e fisiologia que estão associados à fertilidade reduzida em bovinos também foram estudados e incluem: ambiente tubárico e/ou uterino inapropriados (Wiebold, 1988; Binelli et al., 1999), fertilidade ovocitária reduzida devido a anormalidades foliculares (Eicker et al., 1996; Emanuelson e Oltenacu, 1998), técnica de IA inapropriada em relação ao momento do estro (Senger et al., 1988; López-Gatius, 2000; Dalton et al., 2001a,b), e problemas espermáticos ou de fecundação (López-Gatius, 2000; Dalton et al., 2001a,b; López-Gatius et al., 2002).

A maior incidência de mortalidade embrionária/fetal, e conseqüentemente, baixa fertilidade em vacas de alta produção leiteira quando comparadas às demais fêmeas bovinas, tem estimulado pesquisadores a

investigar com maiores detalhes os aspectos fisiológicos que possam estar associados à subfertilidade neste grupo distinto de animais. Raça não parece ser o fator mais relevante associado à baixa fertilidade de bovinos leiteiros, porque estudos sobre associações genéticas com fertilidade têm demonstrado que a hereditariedade para caracteres de fertilidade é baixa (Weller e Ezra, 1997; Dematawewa e Berger, 1998). Além disso, a continuada fertilidade elevada em novilhas de leite sugere que qualquer componente genético relacionado à fertilidade reduzida nas vacas lactantes teria interações com lactação, manejo, ou idade. Diversos estudos avaliaram possíveis causas nutricionais da baixa fertilidade em gado leiteiro, incluindo: balanço energético negativo evidenciado pela perda de escore de condição corporal (Nebel e McGilliard, 1993; Ruegg e Milton, 1995; Domecq et al., 1997; Loeffler et al., 1999a,b; Moreira et al., 2000; Butler, 2001; López-Gatius et al., 2002), efeitos detrimenais de níveis elevados de energia na dieta (Dunne et al., 1999), efeitos tóxicos da uréia e nitrogênio (Ferguson e Chalupa, 1989; Butler, 1998; Sinclair et al., 2000; Dawuda et al., 2002), e deficiências de vitamina e/ou minerais (Ingraham et al., 1987; Arechiga et al., 1994; 1998). Alguns peptídeos, tais como a leptina e fatores de crescimento (IGF-1 e IGF-2), cujas concentrações variam na circulação em função do estado metabólico do animal, especialmente durante o período pós parto em vacas leiteiras, aparentemente estão envolvidos na mediação dos efeitos da nutrição na função reprodutiva (O'Callaghan e Boland, 1999; Boland et al., 2001; Lucy, 2001).

Vacas leiteiras em lactação têm capacidade reduzida de responder a aumentos de temperatura ambiente ou outras formas de estresse (Lucy et al., 1986; Sartori et al., 2002b). Estresse térmico reduz a eficiência reprodutiva, particularmente em vacas lactantes, através da redução da expressão/detecção de estro e pela diminuição nas taxas de concepção (Stevenson et al., 1984; Ryan et al., 1993). O efeito do estresse térmico na fertilidade parece estar associado a quedas na taxas de fecundação e elevação na perda embrionária (Al-Katanani et al., 1999, 2002; Hansen et al., 2001; Rivera e Hansen, 2001; Sartori et al., 2002b).

Muitos dos mecanismos envolvidos no transporte de gametas, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial sofrem influência dos hormônios esteróides ovarianos E₂ e P₄. Alterações nas concentrações séricas de esteróides, que ocorrem em vacas de alta produção leiteira podem comprometer a eficiência reprodutiva. Pesquisadores relataram que o crescimento prolongado do folículo ovariano em vacas com baixos níveis circulantes de P₄ resultou em fertilidade reduzida (Mihm et al., 1994; Ahmad et al., 1995). Por exemplo, em um experimento (Ahmad et al., 1996), a produção de um folículo persistente dramaticamente reduziu a taxa de concepção de 54% para 15% em vacas lactantes. Essa persistência do folículo dominante (que talvez ocorra naturalmente na vaca de alta produção leiteira) está associada à exposição prolongada de elevadas concentrações de E₂ antes da ovulação (Ahmad et al., 1996; Bigelow e Fortune, 1998), porém, ainda está por ser determinado se essa elevação prolongada de E₂ circulante ou intra-folicular antes da ovulação compromete a fertilidade. O E₂ também está associado à retenção do ovócito no oviduto, enquanto que a P₄ acelera o transporte (Bearden e Fuquay, 2000). Alteração nas concentrações séricas dos esteróides pode afetar fecundação ou transporte do embrião/óvulo. Além disso, proteínas secretórias dependentes de E₂ parecem ser parte essencial de um ambiente tubárico de suporte para capacitação espermática, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (King et al., 1994; DeSouza e Murray, 1995; Binelli et al., 1999). Binelli et al. (1999) observaram alterações no ambiente tubárico em vacas com folículos dominantes persistentes e sugeriram que esse microambiente inapropriado contribui com a fertilidade reduzida em vacas com folículos persistentes. É esperado que vacas de alta produção leiteira tenham concentrações séricas de P₄ mais baixas do que novilhas (Sartori et al., 2002a; 2004a). Reduzidas concentrações séricas de P₄ no período periovulatório poderiam ser responsáveis, pelo menos em parte, pela redução na fertilidade de vacas leiteiras. Vacas com concentrações mais baixas de P₄ antes da IA tiveram fertilidade reduzida (Folman et al., 1973; Fonseca et al., 1983) e suplementação de P₄ antes da IA aumentou a taxa de concepção (Folman et al., 1990; Wehrman et al., 1993; Xu et al., 1997). Baixas concentrações séricas de P₄ permitem um aumento na frequência de pulsos de LH (Roberson et al., 1989; Bergfelt et al., 1991; Adams et al., 1992), causando maturação prematura dos ovócitos (Revah e Butler, 1996), queda na qualidade ovocitária no momento da ovulação e conseqüente qualidade embrionária inferior após a fecundação (Ahmad et al., 1995). Concentrações reduzidas de P₄ após a IA também estão associadas à fertilidade reduzida (Lukaszewska e

Hansen, 1980; Mann et al., 1995; Ahmad et al., 1996; Larson et al., 1997). Essa redução na fertilidade pode ser devido às baixas concentrações séricas de P4 que talvez atrasem o desenvolvimento embrionário (Mann et al., 1998; Mann e Lamming, 2001), e/ou permitam uma indução precoce da luteólise (Mann e Lamming, 1995; Mann et al., 1995).

Com relação aos embriões PIV e TN, além das situações já mencionadas acima, outros fatores devem ser considerados como envolvidos nas perdas embrionárias, visto que o cultivo e a TN não somente afetam o desenvolvimento pré-implantação como também o desenvolvimento fetal.

A mais alta taxa de mortalidade em embriões PIV ocorre nas primeiras 2 a 3 semanas após a fecundação (Farin et al., 2001) e cerca de 60% ou mais das prenhez de embriões TN são perdidas no primeiro trimestre da gestação (Heyman et al., 2002). A explicação para essa alta taxa de falha no desenvolvimento com relação a defeitos intrínsecos dos embriões ainda não está esclarecida. Entretanto, a extensão e a regulação da expressão alterada de genes durante o desenvolvimento pré-implantação parece ser crítica para o desenvolvimento posterior do conceito (Rodríguez-Zas, 2008). Isso tem sido demonstrado em vários estudos usando a técnica de microarranjos para avaliar a expressão de milhares de genes simultaneamente em embriões PIV e TN (Cocoran et al., 2006; El-Sayed et al., 2006; Cui et al., 2007).

O efeito das condições de cultivo no padrão de expressão de genes tem sido amplamente reconhecido e pode ser responsável por alterações epigenéticas que são prejudiciais ao desenvolvimento do embrião e do feto (Kang et al., 2001). Existem inúmeras evidências de que o ambiente de cultivo que os embriões são expostos *in vitro* pode afetar a expressão de genes e causar as diferenças encontradas entre os embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (Wrenzycki et al., 2005; Lonergan et al., 2006). Isso se refere não só à composição do meio mas também às condições de cultivo como, por exemplo, a tensão de oxigênio. Os defeitos em embriões clones se manifestam de forma mais severa do que nos PIV pois além dos efeitos do cultivo *in vitro*, podem ocorrer falhas na reprogramação do núcleo doador que afetam o desenvolvimento e diferenciação resultando em anormalidades na placenta, principal responsável pelas perdas de embriões TN.

Além da alteração na expressão gênica, é importante mencionar que as anormalidades cromossômicas também são causas comuns de falhas na prenhez. Células com anormalidades cromossômicas são comumente encontradas em embriões PIV e clones (Schmidt, 2007). A anormalidade mais frequente é a mixoploidia, resultante de divisões celulares anormais causando poliploidia em uma proporção variável de células do embrião (Viuff et al., 1999).

Considerações finais

A elevada morte embrionária durante os primeiros dias de gestação é considerada a principal causa da baixa eficiência reprodutiva, especialmente em vacas de alta produção de leite. A utilização de biotecnologias reprodutivas tais como tratamentos hormonais e transferência de embriões provenientes de animais com elevada fertilidade tem se mostrado alternativas viáveis para o incremento da eficiência reprodutiva. Além disso, o uso de técnicas adequadas de IA e a redução de problemas sanitários, nutricionais e ambientais são condições essenciais para a obtenção de elevados índices de fecundação e manutenção da gestação, culminando no sucesso dos programas reprodutivos em bovinos. Entretanto, quando tecnologias com maior grau de artificios são utilizadas, as perdas embrionárias são mais acentuadas. O embrião pré-implantação é altamente influenciado por fatores do ambiente externo e, em situações extremas tais como as que podem ocorrer no cultivo *in vitro* e na TN, a capacidade do embrião de se adaptar às condições ambientais ou à reprogramação da cromatina, pode exceder sua própria capacidade adaptativa e resultar em perdas ou em desenvolvimento anormal.

Referências bibliográficas

- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 177-188.
- Ahmad N, Beam W, Butler WR, Deaver DR, Duby RT, Elder DR, Fortune JE, Griel LC, Jones LS, Milvae RA, Pate JL, Revah I, Schreiber DT, Townson DH, Tsang PCW, Inskeep EK. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. Cooperative Regional Research Project. *J Anim Sci* 1996; 74: 1943-1952.
- Ahmad N, Schrick FN, Butcher RL, Inskeep EK. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol Reprod* 1995; 52: 1129-1135.
- Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci* 2002; 85: 390-396.
- Al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci* 1999; 82: 2611-2616.
- Almeida LAP. Early embryonic mortality in "repeat-breeder" cows. *ARS Veterinaria* 1995; 11: 18-34.
- Alomar M, Mahieu J, Verhaeghe B, Defoin L, Donnay I. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 395-402.
- Alomar M, Tasiaux H, Remacle S, George F, Paul D, Donnay I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Anim Reprod Sci* 2008; 107 :48-61.
- Arechiga CF, Ortiz O, Hansen PJ. Effect of prepartum injection of vitamin-E and selenium on postpartum reproductive function of dairy-cattle. *Theriogenology* 1994; 41: 1251-1258.
- Arechiga CF, Vazquez-Flores S, Ortiz O, Hernandez-Ceron J, Porras A, McDowell LR, Hansen PJ. Effect of injection of beta-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 1998; 50: 65-76.
- Arnold DR, Bordignon V, Lefebvre R, Murphy BD, Smith L. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction* 2006; 132: 279-290.
- Ayalon N. Review of embryonic mortality in cattle. *J Reprod Fertil* 1978; 54: 483-493.
- Beal WE, Perry RC, Corah LR. The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef-cattle. *J Anim Sci* 1992; 70: 924-929.
- Bearden HJ, Fuquay JW. Applied animal reproduction. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 2000.
- Berger T. Fertilization in ungulates. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 351-360.
- Bergfelt DR, Kastelic JP, Ginther OJ. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. *Anim Reprod Sci* 1991; 24: 193-204.
- Bigelow KL, Fortune JE. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities, and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. *Biol Reprod* 1998; 58: 1241-1249.

Binelli M, Hampton J, Buhi WC, Thatcher WW. Persistent dominant follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrus. *Biol Reprod* 1999; 61: 127-134.

Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 2001; 55: 1323-1340.

Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 1999; 51: 59-70.

Boyd H, Bacsich P, Young A, McCracken JA. Fertilization and embryonic survival in dairy cattle. *Br Vet J* 1969; 125: 87-97.

Breuel KF, Lewis PE, Schrick FN, Lishman AW, Inskeep EK, Butcher RL. Factors affecting fertility in the postpartum cow - Role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol Reprod* 1993; 48: 655-661.

Butler WR. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. In: 26 Occ Publ Br Soc Anim Sci (ed.) Fertility in the high producing dairy cow. 2001; 133-145.

Butler WR. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2533-2539.

Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW, Alberio RH. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology* 2006; 66:1185-93.

Cerri RLA, Bruno R, Chebel RC, Galvão KN, Rutigliano H, Thatcher WW, Luchini D, Santos JEP. Effect of source of fatty acids on fertilization rate and embryo quality in early postpartum high producing dairy cows. *J Dairy Sci* 2004; 87(Suppl 1):297. (Abstract).

Chebel RC, Santos JEP, Cerri RLA, Galvao KN, Juchem SO, Thatcher WW. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2003; 60: 1389-1399.

Christianson WT. Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death. *Vet Clin North Am* 1992; 8: 623-639.

Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel OV, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ, Boland MP, Evans AC, Lonergan P. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* 2006; 131: 651-660.

Corrêa GA, Rumpf R, Mundim TC, Franco MM, Dode MA. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci* 2008; 104: 132-142.

Cui XS, Li XY, Shen XH, Bae YJ, Kang JJ, Kim NH. Transcription profile in mouse four-cell, morula, and blastocyst: Genes implicated in compaction and blastocoel formation. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 133-143.

Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Nebel RL, Saacke RG. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 2001a; 84: 2413-2418.

Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Saacke RG. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J Anim Sci* 2000; 78: 2081-2085.

- Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Saacke RG. Towards the enhancement of pregnancy rate: The effect of insemination time on sperm transport, fertilization rate and embryo quality in dairy cattle. In: Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occ Publ Br Soc Anim Sci; 2001b: 161-174.
- Dawuda PM, Scaramuzzi RJ, Leese HJ, Hall CJ, Peters AR, Drew SB, Wathes DC. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2002; 58: 1443-1455.
- Dematawewa CMB, Berger PJ. Genetic and phenotypic parameters for 305-day yield, fertility, and survival in Holsteins. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2700-2709.
- DeSouza MM, Murray MK. An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology* 1995; 136: 2485-2496.
- DeSouza PA, Walker S, King TJ, Young LE, Harkness L, Ritchie WA. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol Reprod* 2001; 65:23-30.
- Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and embryonic mortality-rates in beef heifers after artificial-insemination. *J Reprod Fertil* 1980; 59: 463-468.
- Dode MA, Rodovalho NC, Ueno VG, Fernandes CE. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Sci.* 2002; 69:15-23.
- Dode, MAN. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae.* 2006; 4 (Supl 1): 115-130.
- Domecq JJ, Skidmore AL, Lloyd JW, Kaneene JB. Relationship between body condition scores and conception at first artificial insemination in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. *J Dairy Sci* 1997; 80: 113-120.
- Dunne LD, Diskin MG, Boland MP, O'Farrell KJ, Sreenan JM. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. *Anim Sci* 1999; 69: 411-417.
- Dunne LD, Diskin MG, Sreenan JM. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci* 2000; 58: 39-44.
- Eicker SW, Grohn YT, Hertl JA. The association between cumulative milk yield, days open, and days to first breeding in New York Holstein cows. *J Dairy Sci* 1996; 79: 235-241.
- Elsden RP, Hasler JF, Seidel GE, Jr. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology* 1976; 6: 523-532.
- El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics* 2006; 28: 84-96.
- Emanuelson U, Oltenacu PA. Incidences and effects of diseases on the performance of Swedish dairy herds stratified by production. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2376-2382.
- Farin PW, Farin CE. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 1995; 52: 676-682.
- Farin PW, Crosier AE, Farin CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 2001; 55: 151-170.

Ferguson JD, Chalupa W. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy-cows. *J Dairy Sci* 1989; 72: 746-766.

Folman Y, Kaim M, Herz Z, Rosenberg M. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. *J Dairy Sci* 1990; 73: 2817-2825.

Folman Y, Rosenberg M, Herz Z, Davidson M. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J Reprod Fertil* 1973; 34: 267-278.

Fonseca FA, Britt JH, McDaniel BT, Wilk JC, Rakes AH. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J Dairy Sci* 1983; 66: 1128-1147.

Fricke PM, Caraviello DZ, Weigel KA, Welle ML. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J Dairy Sci* 2003; 86: 3941-3950.

Geisert RD, Short EC, Morgan GL. Establishment of pregnancy in domestic species. In: Geisert RD, Zavy MT (eds.), *Embryonic mortality in domestic species*. Florida: CRC Press; 1994: 23-53.

Gordon I. Laboratory Production of Cattle Embryos. In: Gordon I (eds). *Oxon: CABI Publishing*; 2003, 548p.

Grealy M, Diskin MG, Sreenan JM. Protein content of cattle oocytes and embryos from the two-cell to the elongated blastocyst stage at day 16. *J Reprod Fertil* 1996; 107: 229-233.

Grohn YT, Rajala-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2000; 60: 605-614.

Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, al-Katanani YM, Krininger CE, 3rd, Chase CC, Jr. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 2001; 55: 91-103.

Hansen PJ. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *J Anim Sci* 2002; 80: 33-44.

Harper MJK. Sperm and egg transport. In: Austin CR, Short RV (eds.), *Reproduction in mammals: 1. Germ Cells and Fertilization*. Cambridge: Cambridge University Press; 1982: 102-127.

Hasler JF. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 81-91.

Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 2001; 56: 1401-1415.

Hawk HW, Tanabe TY. Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. *J Anim Sci* 1986; 63: 551-560.

Heyman Y, Chesné P, Lebourhis D, Peynot N, Renard JP. Developmental ability of bovine embryos after nuclear transfer based on the nuclear source: In vivo versus in vitro. *Theriogenology*. 1994; 42:695-702.

Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod*. 2002; 66: 6-13.

- Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. Evidence for placental abnormalities as the major cause of mortality in first trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 2000; 63:1787-94.
- Hosseini SM, Hajian M, Moulavi F, Shahverdi AH, Nasr-Esfahani MH. Optimized combined electrical-chemical parthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* 2007; Aug 6. [Epub ahead of print].
- Hyttel P, Callesen H, Greve T, Schmidt M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology* 1991; 35: 91-108.
- Iguma LT, Lisauskas SF, Melo EO, Franco MM, Pivato I, Vianna GR, Sousa RV, Dode MA, Aragão FJ, Rech EL, Rumpf R. Development of bovine embryos reconstructed by nuclear transfer of transfected and non-transfected adult fibroblast cells. *Genet Mol Res.* 2005; 4: 55-66.
- Ingraham RH, Kappel LC, Morgan EB, Srikandakumar A. Correction of subnormal fertility with copper and magnesium supplementation. *J Dairy Sci* 1987; 70: 167-180.
- Kafi M, McGowan MR. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci* 1997; 48: 137-157.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM. Aberrant methylation of donors genome in cloned bovine embryos. *Nature Genetics* 2001; 28: 173-177.
- Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* 2000; 120: 231-237.
- Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP. Superovulation in cattle: Effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim Reprod Sci* 1997; 46: 1-14.
- King RS, Anderson SH, Killian GJ. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* 1994; 15: 468-478.
- Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 2003; 77: 33-49.
- Labernia J, López-Gatius F, Santolaria P, López-Bejar M, Rutllant J. Influence of management factors on pregnancy attrition in dairy cattle. *Theriogenology* 1996; 45: 1247-1253.
- Lamb GC, Miller BL, Traffas V, Corah LR. Estrus detection, first service conception, and embryonic death in beef heifers synchronized with MGA and prostaglandin. *Kansas AES Report of progress.* 1997; 783:97.
- Lane M, Gardner DK, Hasler MJ, Hasler JF. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 2003; 60: 407-419.
- Larson SF, Butler WR, Currie WB. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1288-1295.
- Loeffler SH, de Vries MJ, Schukken YH, de Zeeuw AC, Dijkhuizen AA, de Graaf FM, Brand A. Use of AI technician scores for body condition, uterine tone and uterine discharge in a model with disease and milk production parameters to predict pregnancy risk at first AI in holstein dairy cows. *Theriogenology* 1999a; 51: 1267-1284.

Loeffler SH, de Vries MJ, Schukken YH. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 1999b; 82: 2589-2604.

Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*. 2006; 65:137-52.

López-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Rutllant J, López-Bejar M. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology* 2002; 57: 1251-1261.

López-Gatius F. Site of semen deposition in cattle: A review. *Theriogenology* 2000; 53: 1407-1414.

Lucy MC, Stevenson JS, Call EP. Controlling 1st service and calving interval by prostaglandin-f2-alpha, gonadotropin-releasing-hormone, and timed insemination. *J Dairy Sci* 1986; 69: 2186-2194.

Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J Dairy Sci* 2001; 84: 1277-1293.

Lukaszewska J, Hansel W. Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. *J Reprod Fertil* 1980; 59: 485-493.

Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. The regulation of interferon-t production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fertil (Suppl.)* 1998; 317-328.

Mann GE, Lamming GE, Fray MD. Plasma estradiol and progesterone during early-pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. *Anim Reprod Sci* 1995; 37: 121-131.

Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 2001; 121: 175-180

Maurer RR, Chenault JR. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef-cattle. *J Anim Sci* 1983; 56: 1186-1189.

McMillan WH, Peterson AJ, Hall DRH, Donnison MJ. Embryo and recipient contributions to embryo loss to day 60 in heifers receiving either one or two in vitro-produced embryos. *Theriogenology* 1997; 47: 370.

Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil* 1999: 449-460.

Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J Reprod Fertil* 1994; 102: 123-130.

Moore DA, Cullor JS, Bondurant RH, Sisco WM. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy-cattle. *Theriogenology* 1991; 36: 257-265.

Moreira F, Risco C, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, DeLorenzo M, Thatcher WW. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology* 2000; 53: 1305-1319.

Moura MT, de Sousa RV, de Oliveira Leme L, Rumpf R. Analysis of actinomycin D treated cattle oocytes and their use for somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 2007; Nov 9 [Epub ahead of print].

Mullins KJ, Saacke RG. Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *Anat Rec* 1989; 225: 106-117.

- Nakao T, Moriyoshi M, Kawata K. The effect of postpartum ovarian dysfunction and endometritis on subsequent reproductive-performance in high and medium producing dairy-cows. *Theriogenology* 1992; 37: 341-349.
- Nebel RL, Mcgilliard ML. Interactions of high milk-yield and reproductive-performance in dairy-cows. *J Dairy Sci* 1993; 76: 3257-3268.
- O'Callaghan D, Boland MP. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim Sci* 1999; 68: 299-314.
- O'Farrell KJ, Langley OH, Hartigan PJ, Sreenan JM. Fertilization and embryonic survival rates in dairy-cows culled as repeat breeders. *Vet Rec* 1983; 112: 95-97.
- Okuda K, Miyamoto Y, Skarzynski DJ. Regulation of endometrial prostaglandin F(2alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 255-264.
- Palma GA, Sinowatz F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. *Anat Histol Embryol* 2004; 33: 257-62.
- Panarace M, Agüero JI, Garrote M, Jauregui G, Segovia A, Cané L, Gutiérrez J, Marfil M, Rigali F, Pugliese M, Young S, Lagioia J, Garnil C, Forte Pontes JE, Ereno Junio JC, Mower S, Medina M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology* 2007; 67: 142-151.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 1995; 44:859-69.
- Pereira DC, Dode MA, Rumpf R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 2005; 63: 1131-1141.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44: 915-923.
- Reis EL, Nasser LF, Nichi M, Baruselli PS. Embryonic mortality in recipients (*Bos indicus* x *Bos taurus*) superovulated with eCG. *Acta Sci Vet* 2004; 32: 198. (Abstract).
- Revah I, Butler WR. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1996; 106: 39-47.
- Rivera RM, Hansen PJ. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 2001; 121: 107-115.
- Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Kittok RJ, Kinder JE. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol Reprod* 1989; 41: 997-1003.
- Roche JF, Bolandl MP, Mcgeady TA. Reproductive wastage following artificial-insemination of heifers. *Vet Rec* 1981; 109: 401-404.
- Rodrigues CFM. Ocorrência de mortalidade embrionária em programa de transferência de embriões. *ARS Veterinaria* 1995; 11: 76-78.
- Rodriguez-Zas SL, Schellander K, Lewin HA. Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction* 2008; 135: 129-39.

- Ruegg PL, Milton RL. Body condition scores of Holstein cows on Prince-Edward-Island, Canada - Relationships with yield, reproductive-performance, and disease. *J Dairy Sci* 1995; 78: 552-564.
- Ryan DP, Prichard JF, Kopel E, Godke RA. Comparing early embryo mortality in dairy-cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology* 1993; 39: 719-737.
- Saacke RG, DeJarnette JM, Bame JH, Karabinus DS, Whitman SS. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology* 1998; 50: 117-128.
- Santos JEP, Cerri RLA, Ballou MA, Higginbotham GE, Kirk JH. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004; 80: 31-45.
- Sartori R, Gümen A, Guenther JN, Souza AH, Wiltbank MC. Comparison of artificial insemination (AI) versus embryo transfer (ET) in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2003a; 86: 238-239 (Abstract).
- Sartori R, Haughian, J. M., Shaver, R. D., Rosa, G. J. M., Wiltbank M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 2004a; 87: 905-920.
- Sartori R, Rosa GJM, Wiltbank MC. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002a; 85: 2813-2822.
- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002b; 85: 2803-2812.
- Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello D, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod* 2004b; 1: 86-90.
- Sartori R, Suárez-Fernández CA, Monson RL, Guenther JN, Rosa GJM, Wiltbank MC. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 2003b; 60: 1319-1330.
- Schmidt M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. *Acta Vet Scand* 2007; 49: 13.
- Schrack FN, Hockett ME, Saxton AM, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J Dairy Sci* 2001; 84: 1407-1412.
- Senger PL, Becker WC, Davidge ST, Hillers JK, Reeves JJ. Influence of cornual insemination on conception in dairy-cattle. *J Anim Sci* 1988; 66: 3010-3016.
- Silke V, Diskin MG, Kenny DA, Boland MP, Dillon P, Mee JF, Sreenan JM. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2002; 71: 1-12.
- Sinclair KD, Kuran M, Gebbie FE, Webb R, McEvoy TG. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci* 2000; 78: 2670-2680.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006; 65:126-36.

- Sreenan JM, Diskin MG, Morris DG. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. In: Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occ Publ Br Soc Anim Sci; 2001: 93-104.
- Stevenson JS, Johnson SK, Medina-Britos MA, Richardson-Adams AM, Lamb GC. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. J Anim Sci 2003; 81: 1681-1692.
- Stevenson JS, Schmidt MK, Call EP. Stage of estrous cycle, time of insemination, and seasonal effects on estrus and fertility of Holstein heifers after prostaglandin F2 alpha. J Dairy Sci 1984; 67: 1798-1805.
- Tanabe TY, Deaver DR, Hawk HW. Effect of gonadotropin-releasing-hormone on estrus, ovulation, and ovum cleavage rates of dairy-cows. J Anim Sci 1994; 72: 719-724.
- Thatcher WW, Binelli M, Arnold D, Mattos R, Badinga L, Moreira F, Staples CR, Guzeloglu A. Endocrine and physiological events from ovulation to establishment of pregnancy in cattle. In: Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occ Publ Br Soc Anim Sci; 2001: 81-91.
- Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt E-P. Embryo health and mortality in sheep and cattle. J Anim Sci 1994; 72 (Suppl. 3): 16-30.
- Vanroose G, de Kruif A, Van Soom A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. Anim Reprod Sci 2000; 60: 131-143.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos AP, Merton JS, den Daas JH, Kemp B, de Ruigh L. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. Theriogenology 2000; 53: 575-597.
- Vasconcelos JLM, Silcox RW, Lacerda JA, Pursley JR, Wiltbank MC. Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to head stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. Biol Reprod 1997; 56: 140 (Abstract).
- Viuff D, Rickords L, Offenbergh H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams JL, Callesen H, Thomsen PD. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. Biol Reprod 1999; 60: 1273-1278.
- Wathes DC. Embryonic mortality and the uterine environment. J Endocrinol 1992; 134: 321-325.
- Wehrman ME, Roberson MS, Cupp AS, Kojima FN, Stumpf TT, Werth LA, Wolfe MW, Kittok RJ, Kinder JE. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 beta-estradiol and increases conception in cows. Biol Reprod 1993; 49: 214-220.
- Weller JJ, Ezra E. Genetic analysis of somatic cell score and female fertility of Israeli Holsteins with an individual animal model. J Dairy Sci 1997; 80: 586-593.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. Reprod Fertil Dev. 2005; 17:23-35.
- Wiebold JL. Embryonic mortality and the uterine environment in 1st-service lactating dairy-cows. J Reprod Fertil 1988; 84: 393-399.
- Xu ZZ, Burton LJ, Macmillan KL. Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF2 alpha and progesterone. Theriogenology 1997; 47: 687-701.

Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* 2007; 39: 295-302.

Zanenga CA, Pedroso MF. Early pregnancy check by ultrasound scanning in bovine embryo transfer. *ARS Veterinaria* 1995; 11: 151 (Abstract).