
LARGE CALF SYNDROME ASSOCIATED TO THE TRANSFER OF IN VITRO PRODUCED EMBRYOS

A. E. M. Horta

Estação Zootécnica Nacional-INIA, Vale de Santarém 2000

aemhorta@mail.telepac.pt

ABSTRACT

The birth of calves weighting significantly above the average, associated to the technique of in vitro embryo production (IVP) is reviewed. From recent published papers on ovine and bovine we can now conclude to exist a direct influence of the IVP technique on fetal intrauterine growth during pregnancy and on birthweight. However, not all results are coincident concerning the degree of deviation from normal parameters. If the first published data could not separate the effects of genotype and the IVP technique, more recent publications clearly show that an interaction between both effects seems to exist. In breeds with heavier adult animals and in uncontrolled beef crossed animals we may find average increases on calf birthweights above 9 kg, while in smaler adult bovine breeds the increase in birthweight provoked by the IVP technique is lower than 2 kg in average. On the practical point of view this is an important information because dystocia and calf survival early after birth, which are positively correlated, are both influenced by birthweight

SÍNDROME DE VITELOS GRANDES ASSOCIADO À TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO.

RESUMO

É analisada a ocorrência do nascimento de vitelos significativamente mais pesados do que a média, associada à técnica de produção *in vitro* de embriões (IVP). Dos trabalhos publicados em bovinos e ovinos pode-se inferir que existe influência da técnica IVP sobre o crescimento do feto durante a gestação e consequente peso ao nascimento. Contudo, nem todos os resultados são coincidentes relativamente à quantificação do problema em termos de desvio à normalidade. Se os primeiros trabalhos não conseguiram separar o efeito do genótipo da técnica, trabalhos mais recentes levam-nos a concluir que parece existir uma interacção entre aqueles dois factores. Assim, nas raças grandes e nos cruzamentos indiscriminados em bovinos, podem aparecer desvios à média superiores a 9 kg, enquanto que em raças pequenas esse desvio se situa à volta de 2 kg. Em termos práticos esta informação é importante visto que as distócias e a sobrevivência dos recém-nascidos, além de estarem altamente correlacionadas entre si, são ambas influenciadas pelo peso ao parto.

INTRODUÇÃO

Os sistemas de cultura *in vitro* de embriões bovinos já fazem parte da indústria de transferência de embriões. Estes sistemas são utilizados para produzir com sucesso um

grande número de embriões para a transferência comercial e para trabalhos de investigação. A aplicação prática da técnica de transferência de embriões produzidos *in vitro* depende do grau de sucesso da operação relativamente aos objectivos pretendidos.

Em 1992 foi pela primeira vez apresentado publicamente o problema do nascimento de vitelos pesados em associação com a técnica de transferência de embriões IVP utilizando cruzamentos não controlados (Horta *et al.*, 1992). Neste trabalho foi patente uma elevada mortalidade ao parto (26,7%) à qual estiveram associados o peso ao nascimento e gestações mais prolongadas.

Na raça Simental e utilizando a fertilização *in vivo*, verificou-se que por cada dia acima da média da gestação para a raça os vitelos nascem mais pesados 0,5 kg e que a taxa de assistência ao parto aumenta 1% (Figura 1, Burfening *et al.*, 1978). Com os embriões IVP resultantes de cruzamentos indiscriminados, verificou-se que por cada dia de gestação entre os 265 e 298 dias os vitelos nasceram mais pesados 0,764 kg (Figura 2, Horta *et al.*, 1992, 1993). Neste trabalho conseguiu-se contrariar o aumento do peso através da indução dos partos entre os 265 e 270 dias de gestação.

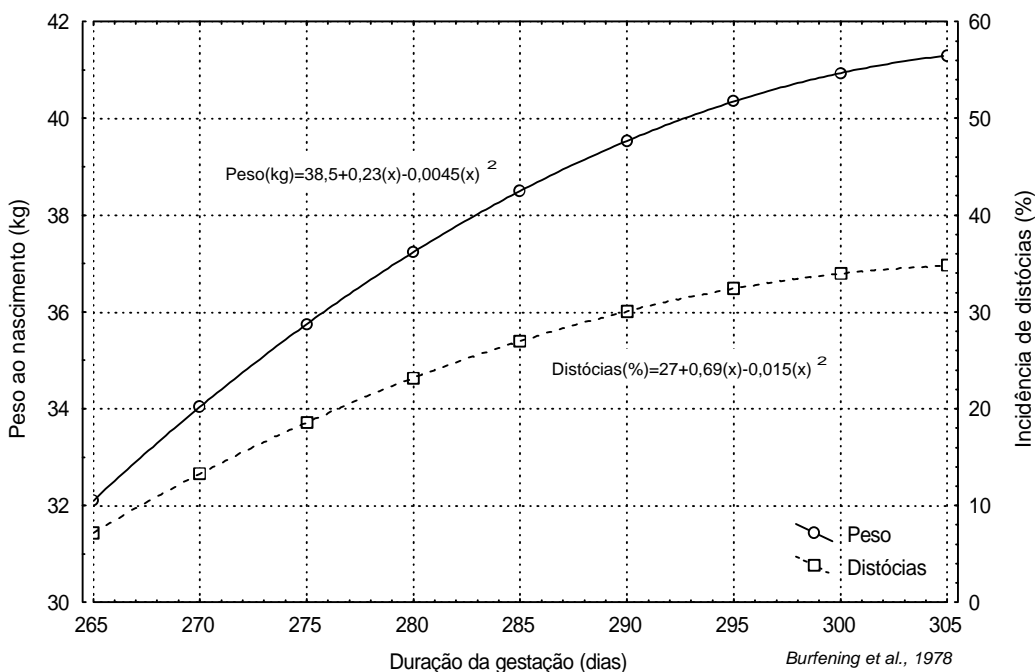


Figura 1. Incidência de distócias e pesos ao nascimento em função da duração da gestação na raça Simental (adaptado de Burfening *et al.*, 1978).

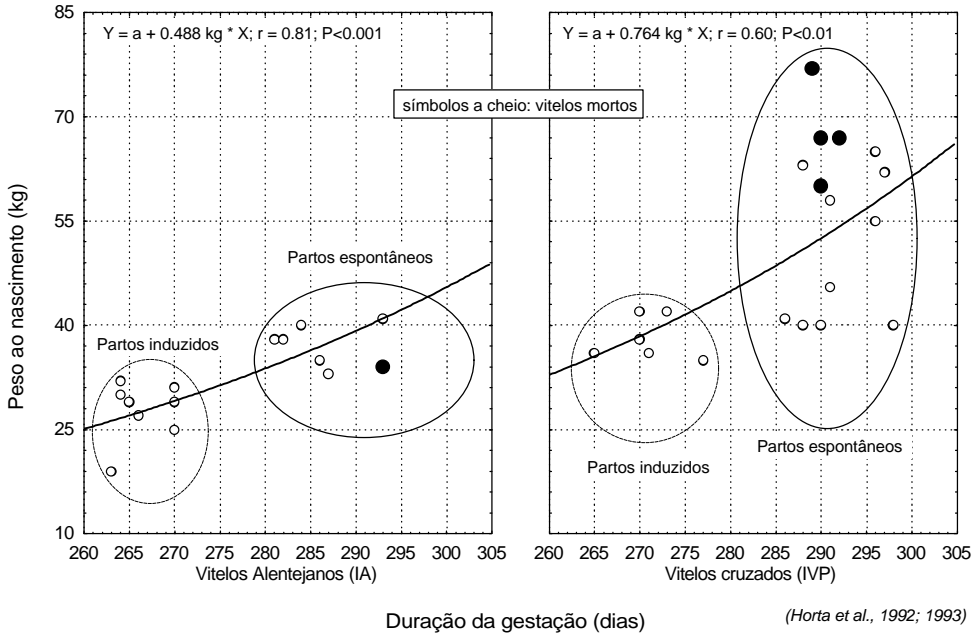


Figura 2. Peso ao nascimento de vitelos singulares Alentejanos (IA) ou cruzados (IVP) em função da duração da gestação. Efeito da indução dos partos (adaptado de Horta *et al.*, 1992; 1993).

CARACTERÍSTICAS DO CRESCIMENTO FETAL

De acordo com o trabalho de Eley *et al.* (1978) realizado em 254 fetos (4 raças puras e fetos cruzados), verifica-se o seguinte padrão de crescimento do feto bovino:

- Nos primeiros 100 dias de gestação os aumentos do volume do líquido alantoideo e do peso da membrana cório-alantoide precedem os do peso fetal, peso da membrana amnio-alantoide, e volume do líquido amniótico. Diferentes taxas de crescimento relativo das diversas estruturas fetais sugerem que a expansão da membrana cório-alantoide é um pré-requisito para o futuro crescimento fetal (Figura 3).
- Os fetos masculinos são significativamente mais pesados que os femininos a partir dos 100 dias de gestação (Figura 4).
- A taxa máxima de crescimento em todos os fetos verifica-se aos 230 dias de gestação atingindo valores superiores a 200 g/dia. Este crescimento declina para menos de 100 g/dia por ocasião do parto.

Para Prior e Laster (1979), o crescimento dos fetos bovinos obedece a um padrão sigmóide com uma taxa de crescimento máxima aos 232 dias de gestação (350 g/dia). Este crescimento contrasta com o observado antes dos 120 dias, onde a taxa de crescimento fetal é aproximadamente igual a 25 g/dia.

Por outro lado, Gore *et al.* (1994) concluem que o desenvolvimento do músculo fetal nos primeiros 100 dias de gestação está relacionado com os padrões de

desenvolvimento pós-natal, e que esta relação passa por características hiperplásicas musculares fetais. Estes autores verificaram que as características fenotípicas do crescimento muscular fetal dependem do genótipo, e que esta relação varia de acordo com o estadio de gestação. Estes resultados são importantes pois alertam para o problema da influência do genótipo sempre que se pretendam realizar estudos que examinem os mecanismos de crescimento e desenvolvimento embrionário.

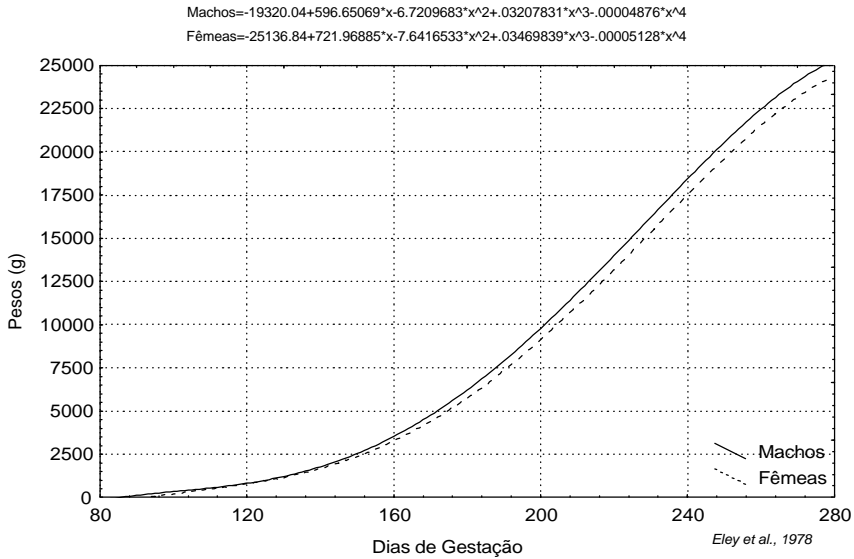


Figura 3. Evolução ponderal do feto e da placenta até aos 100 dias de gestação (adaptado de Eley et al., 1978).

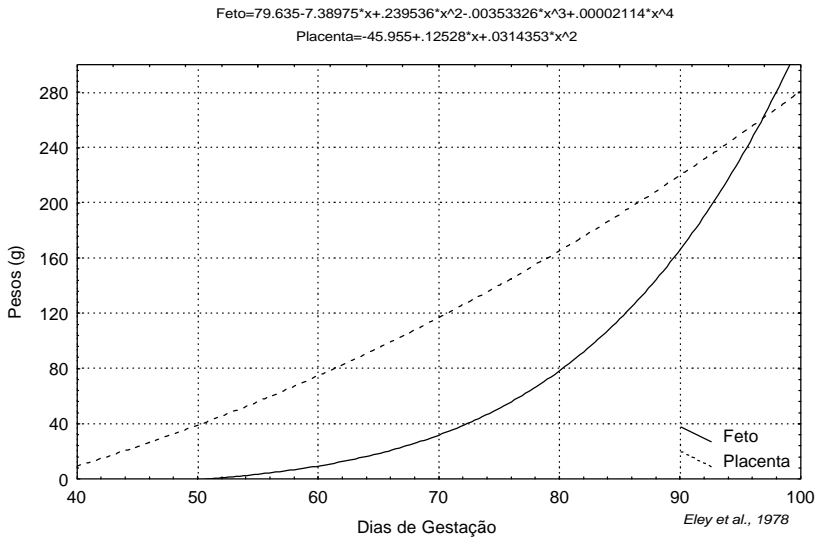


Figura 4. Evolução de fetos masculinos e femininos acima dos 100 dias de gestação (adaptado de Eley et al., 1978).

FACTORES HORMONAIIS E CRESCIMENTO DO FETO

A placenta desempenha um papel muito crítico ao fornecer um ambiente que permita o crescimento do feto em condições óptimas. Ela fá-lo por se constituir como o local de trocas de nutrientes da mãe para o feto, por ser o local onde os produtos resultantes do metabolismo fetal são excretados para a circulação materna, por actuar como uma barreira contra os agentes patogénicos e o próprio sistema imunitário materno, e por ser um órgão endócrino activo capaz de segregar hormonas, factores de crescimento, citoquinas e outros produtos bioactivos.

Entre as hormonas produzidas pela placenta encontram-se as pertencentes à família genética da hormona do crescimento/prolactina como os lactogénios placentários (**PL**) e as proteínas relacionadas com a prolactina. Embora as funções exactas dos membros placentários da família deste gene não tenham sido inteiramente elucidadas, os conhecimentos disponíveis atribuem um papel para alguns deles na modulação do metabolismo materno e fetal.

Os lactogénios placentários que são segregados para as circulações materna e fetal, pelo menos nos ruminantes, parecem mediar os seus efeitos através de receptores específicos, embora este aspecto permaneça ainda controverso. Além de afinidades aos seus próprios receptores (endométrio), o **bPL** liga-se e compete com os receptores da **bGH** e da **bPRL** (fígado e corpo lúteo) (Anthony *et al.*, 1995).

Uma das acções do **PL** parece prender-se com a modulação da produção de **IGF** (*Insulin-like growth factors*) fetal. Experiências em ratinhos, utilizando técnicas de ablação de genes, demonstram a importância das **IGF** na manutenção crescimento normal do feto (DeChiara *et al.*, 1990, 1991; Baker *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1993). No seu conjunto, estas experiências demonstram a importância da **IGF-I** e **IGF-II** para o normal crescimento do feto e a cronologia relativa das suas influências. Elas indicam que parece existir um terceiro receptor celular (além do **IGF1R** e **IGF2R**) através do qual actua a **IGF-II**. Em várias espécies foi igualmente confirmada uma acção luteotrófica para o **PL** (roedores, ruminantes).

O crescimento exagerado do feto no útero parece estar igualmente associado com uma mutação do gene **H19**, segundo estudos realizados no rato (Leighton *et al.*, 1995). Este gene não codifica nenhuma proteína funcional, mas está adjacente ao gene que codifica a **IGF-II**. A expressão do **H19** ocorre coincidentemente com a eliminação da transcrição de **IGF-II**, reduzindo em consequência a produção de **mRNA** da **IGF-II** (Leighton *et al.*, 1996). O “knockout” genético do *locus* materno **H19** no rato está associado com um aumento de 27% no peso dos fetos ao nascimento.

Embora os elementos placentários da família do gene da hormona do crescimento/

prolactina não tenham sido identificados em todas as espécies domésticas, nos ruminantes eles desempenham sem dúvida um papel importante na manutenção da gestação. Estudos que esclareçam a forma como os lactogénios placentários e outras hormonas placentárias influenciam o crescimento e desenvolvimento fetais são essenciais para clarificar este aspecto nas espécies pecuárias. Esta informação é necessária para compreendermos melhor a etiologia das distócias, mortalidade perinatal, e problemas de crescimento e desenvolvimento pós-natal.

Os estudos do efeito da técnica IVP sobre o crescimento fetal e consequente peso ao parto deverão ter em conta os factores ligados ao genótipo. O crescimento do feto no útero é primariamente controlado pelo genótipo fetal (Ferrell, 1991) sendo influenciado por outros factores que incluem a raça, o sexo do feto, o número de fetos no útero, e o ambiente materno uterino (Eley *et al.*, 1978; Anthony *et al.*, 1986; Echternkamp, 1992; Gore *et al.*, 1994). O peso da placenta é influenciado pela raça da fêmea incubadora e do feto (Ferrell, 1991) e pelo número de fetos presentes no útero (Echternkamp, 1992).

EMBRIÕES IVP E CRESCIMENTO FETAL INTRAUTERINO

Inicialmente pensou-se que o nascimento de vitelos mais pesados estava associado somente a técnicas de manipulação nuclear utilizadas nalguns procedimentos de produção de embriões *in vitro* (Willadsen *et al.*, 1991; Seidel, 1992; Keefer *et al.*, 1994; Behboodi *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1995).

Hoje reconhece-se que um maior crescimento do feto durante a gestação acontece com embriões IVP não manipulados, quer nos bovinos (Horta *et al.*, 1992; Farin e Farin, 1995; Sinclair *et al.*, 1995; Hasler *et al.*, 1995; Kruij e den Daas, 1997; Stacchezzini *et al.*, 1997; Numabe *et al.*, 1997), quer em ovinos (Walker *et al.*, 1992).

Com excepção dos trabalhos em que os embriões foram produzidos por transferência nuclear, até 1997 nunca surgiram na literatura resultados que conseguissem separar os efeitos da heterose e da técnica IVP em relação ao nascimento de vitelos mais pesados. Com efeito, em todos eles havia um grau de cruzamento de raças ou de utilização de touros diferentes, que não permitiam inequivocamente implicar a técnica IVP por si só no aumento de peso dos vitelos.

Em 1997, são publicados os primeiros três trabalhos utilizando um delineamento susceptível de poder responder a esta questão (Stacchezzini *et al.*, 1997; Numabe *et al.*, 1997; Farin *et al.*, 1997a;b). Assim, trabalhando com a raça *Piedmontesa* em Itália, Stacchezzini *et al.* (1997) compararam os pesos de vitelos após transferência de embriões produzidos *in vivo* (MO) com os produzidos *in vitro* (IVP) e fertilizados com um touro da mesma raça. Neste trabalho verificou-se que os embriões IVP nasceram 9 kg mais pesados

que os produzidos *in vivo* (54 vs 45 kg, $P < 0,05$), tendo resultado em consequência disso um aumento da incidência de distócias de 20 para 60%. Trabalhando com a raça *Preta Japonesa*, Numabe *et al.* (1997), comparando vitelos IVP com os oriundos de inseminação artificial e utilizando 2 touros da mesma raça, chegaram a conclusões semelhantes. Contudo, neste último trabalho a diferença dos pesos de vitelos IVP e IA ao nascimento foi somente de 1,9 kg (29,8 vs 27,9 kg, $P < 0,05$) não tendo resultado um aumento dos partos distócicos.

Destes dois trabalhos podemos então concluir que existe um efeito directo da técnica IVP no aumento do peso dos vitelos ao nascimento, o qual parece igualmente interagir com o genótipo dos embriões: incremento de peso muito elevado nas raças grandes e quase desprezível nas raças pequenas. Do ponto de vista prático, a ausência de distócias nas raças pequenas indica que a técnica IVP pode ser utilizada sem inconvenientes relativamente ao bem estar dos animais.

Um efeito directo da clonagem é evidente quando embriões clonados que não passaram por processos de maturação ou cultura *in vitro* (produzidos a partir de oócitos maturados *in vivo*, utilizando núcleos de blastómeros retirados de embriões produzidos *in vivo* e posteriormente cultivados no oviducto de ovelhas), originam vitelos mais pesados ao nascimento (machos: 48,6 vs 40,2 kg, fêmeas: 47,8 vs 37,8 kg; Wilson *et al.*, 1995).

Resta saber ainda, além do genótipo, que factores associados à técnica IVP ou à clonagem induzem tão precocemente no embrião alterações que aceleram o seu crescimento no útero. Farin *et al.* (1997b), embora utilizando um pequeno número de animais mas anulando o efeito do genótipo (raça holstein e usando o mesmo touro na FIV), não encontraram diferenças no peso e dimensões da placenta e dos fetos produzidos *in vivo* ou *in vitro*.

a) Progesterona (P4)

A progesterona parece estar implicada num efeito precoce sobre o embrião, levando-o a crescer mais rapidamente durante a gestação. Embriões ovinos (MO) de 3 dias de idade transferidos assincronamente para ovelhas no 6º dia do ciclo e retransferidos depois para ovelhas síncronas com a idade do embrião, resultaram em fetos significativamente maiores ao dia 37 de gestação (Wilmot e Sales, 1981). Num estudo comparável (Young *et al.*, 1995), foi observado que logo aos 21 dias de idade, existe um aumento de 42% no peso dos embriões sujeitos àquela metodologia.

Quando a transferência assíncrona anteriormente referida é substituída pela administração de progesterona às receptoras, verifica-se igualmente um aumento do crescimento fetal na ovelha. A administração de P4 a ovelhas entre os dias 1-6 após a ovulação provocou um aumento de 12% no crescimento fetal ao 74º dia de gestação (Kleemann *et al.*, 1994). Na vaca, a administração de progesterona 1-6 dias após a

inseminação artificial provoca um aumento significativo no comprimento do embrião ao 14º dia de idade (Garrett *et al.*, 1988). O mecanismo preciso pelo qual a suplementação com progesterona às fêmeas no início da gestação influencia o crescimento embrionário e fetal não é claro, mas é provável que envolva uma acção indirecta através de alterações provocadas nas secreções do oviducto e/ou uterinas maternas (Garrett *et al.*, 1988).

De acordo com estudos não publicados e citados por Walker *et al.* (1996) o efeito da progesterona parece estar associado a uma alteração da distribuição das células no embrião, favorecendo um aumento das da trofoectoderme (placenta) em relação às da massa celular interior (feto).

Uma acção directa sobre o embrião ainda não foi demonstrada, mas estudos realizados na EZN indicam que não é de excluir esta hipótese (Pereira *et al.*, 1997, Vasques *et al.*, 1998). Com efeito, a utilização de meios de cultura que aumentam por si só a produção de progesterona pelas células da granulosa co-cultivadas com embriões *in vitro*, provocam uma aceleração significativa no crescimento de embriões logo aos 7 dias de idade (Pereira *et al.*, 1997). Sistemas IVP de embriões utilizando diferentes tipos de células em co-cultura, não especializadas na produção de progesterona, aparecem associados ao nascimento de vitelos mais pesados (Behoodi *et al.*, 1995; Farin e Farin, 1995; Hasler *et al.*, 1995), excluindo assim a hipótese da progesterona ser um factor comum na expressão daquele efeito.

b) Lactogénio placentário (PL) e IGFs

A produção de **PL** nunca foi estudada em gestações associadas à técnica IVP. O único trabalho que abordou indirectamente a acção do **PL** através do doseamento da **IGF-I** fetal, não encontrou diferenças nas concentrações de **IGF-I mRNA** em fígados de fetos bovinos originados por técnicas *in vitro* ou *in vivo*, aos 70 dias de gestação (Farin *et al.*, 1997a). Estes autores encontraram uma elevada correlação entre o peso corporal e o peso hepático do feto. Não existem estudos referentes à produção de **IGF-II** por parte de fetos originados por técnicas IVP.

c) Insulina

Mulheres hipoinsulinémicas parem fetos mais leves que o normal, enquanto que as hiperinsulinémicas dão à luz crianças mais pesadas (Gluckman, 1986).

É interessante notar que à nascença, os níveis circulantes de insulina em vitelos originados a partir de embriões sujeitos a transferência nuclear, são três a seis vezes superiores às dos vitelos produzidos *in vivo*, situação que se mantém até 60 minutos após o parto (Garry *et al.*, 1996). Contudo, Reinders *et al.* (1998), não conseguiram evidenciar qualquer relação entre o síndrome de vitelos pesados e a viabilidade pós-natal com o

desenvolvimento da diabetes de gestação tipo II (pelo teste de tolerância à glicose - GTT - das vacas gestantes, Figura 5), quer em vacas receptoras de embriões IVP quer em vacas inseminadas. Neste trabalho a média dos pesos ao nascimento não foi estatisticamente diferente entre vitelos oriundos de IA ou de IVP (43,4 vs. 42,7 kg, respectivamente), o que pode explicar a semelhança da resposta ao GTT. Os níveis de glicose dos recém nascidos antes da ingestão do colostro não foi diferente entre os dois grupos de vitelos.

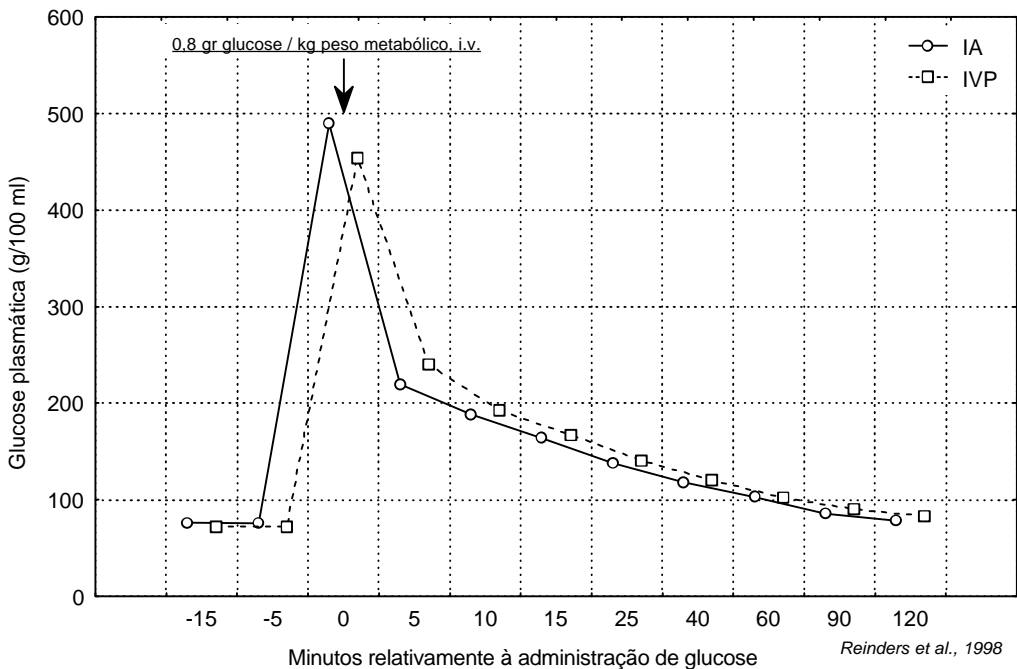


Figura 5. Teste de tolerância à glicose (GTT) em vacas gestantes com fetos originados de IA ou de embriões IVP. Concentrações de glicose corrigidas para o sexo do vitelo e o peso das vacas (Reinders *et al.*, 1998).

d) Proteínas placentárias

Em gestações originando vitelos singulares IVP mais pesados (cruzados) comparativamente a vitelos mais leves resultantes de inseminação artificial (*Alentejanos*), verifica-se um aumento significativo das concentrações de **bPSPB** ao longo da gestação (Figura 6, Vasques *et al.*, 1995). No mesmo ano, Patel *et al.* (1995) encontraram uma correlação significativa e positiva entre os teores de **bPSPB** em gestações singulares IVP com o peso dos vitelos ao nascimento. No ano seguinte, verificou-se que o aumento da **bPAG** antes do parto está significativamente correlacionada com o peso dos vitelos ao nascimento (Schmidt *et al.*, 1996).

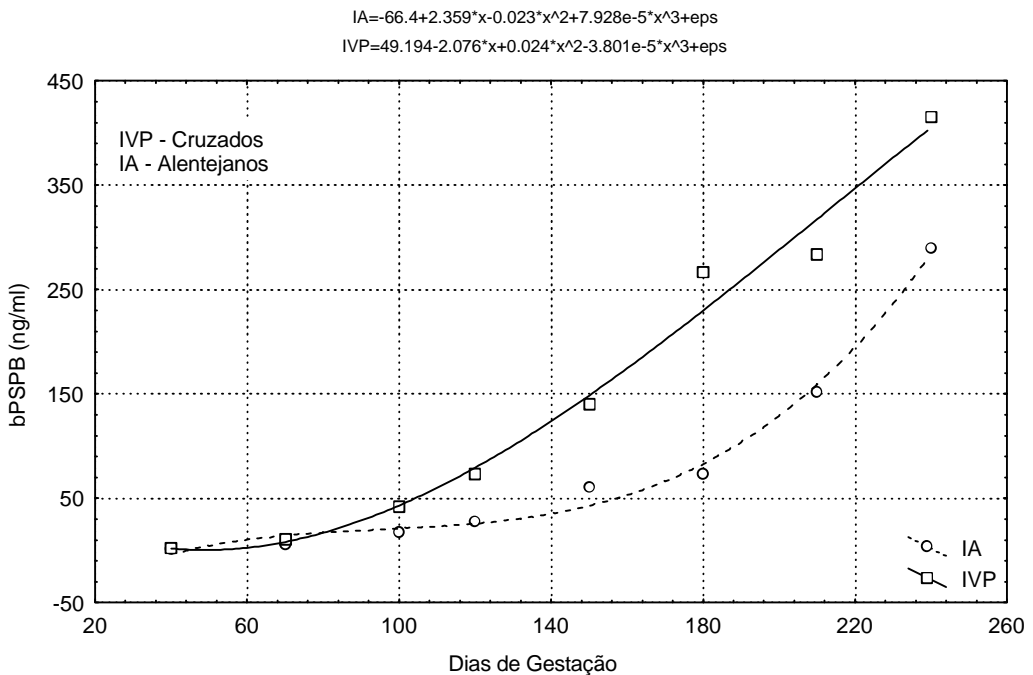


Figura 6. Concentrações periféricas de bPSPB em vacas *Alentejanas* durante gestações singulares de fetos IVP cruzados e fetos IA *Alentejanos* (adaptado de Vasques *et al.*, 1995).

É provável que esta relação entre produção da **bPSPB** e da **bPAG** pelas células binucleadas da placenta e o peso dos vitelos seja somente um reflexo do aumento da actividade metabólica da placenta associada ao maior crescimento do feto e massas fetais, visto não se lhes conhecer até ao presente nenhuma actividade fisiológica identificada com a dos factores de crescimento.

FACTORES ASSOCIADOS AO AUMENTO DO PESO AO NASCIMENTO DE VITELOS IVP

A transferência de embriões IVP em ovinos, resultou em aumentos significativos do peso ao nascimento, duração da gestação, incidência de distócias e nado-mortalidade quando comparada com grupos controlo (Walker *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1992; Holm *et al.*, 1994). Na vaca, existe também evidência de um aumento da duração da gestação e do peso dos vitelos associados à transferência de embriões IVP (Horta *et al.*, 1992, 1993; Sinclair *et al.*, 1995; Merton *et al.*, 1988). O único relato em bovinos em que não foi observado aumento da duração da gestação associado a pesos ao nascimento mais elevados aparece no trabalho de Behboodi *et al.* (1992). Neste trabalho os embriões foram

manipulados (transferência nuclear), contrariamente aos anteriores.

A prova evidente de que existe esta relação do aumento do peso ao nascimento/aumento da duração da gestação é evidenciada por Horta *et al.* (1992, 1993), em que foi possível prevenir o nascimento de fetos mais pesados através da indução do parto cerca dos 268 dias de gestação (Figura 2), assim como anular a mortalidade dos vitelos ao parto.

Merton *et al.* (1998) estudaram os **factores que influenciam** o peso ao nascimento em 607 vitelos produzidos pela técnica IVP. Entre eles, a pluriparidade da receptora, o sexo do vitelo, os embriões de inferior qualidade, a congelação/dcongelação do embrião, gestações superiores a 275 dias, e os nados-mortos ou inviáveis até às 24 horas, foram factores que contribuíram para um aumento significativo do peso (Quadro I). Além destes factores, a exploração pecuária, a fêmea dadora de oócitos e o touro utilizado na fertilização *in vitro*, afectaram significativamente o peso dos vitelos. Entre os factores directamente associados com a técnica de produção dos embriões, conclui-se deste trabalho que embriões frescos e de elevada qualidade originam vitelos menos pesados ao nascimento.

Quadro I. Factores significativamente associados ao aumento do peso de vitelos IVP ao nascimento (Merton *et al.*, 1998).

Factor	Aumento de peso (kg)
Vacas vs. Novilhas	+ 2,6
Machos vs. Fêmeas	+ 1,2
Embriões grau 2 vs. grau 1	+ 1,2
Embriões congelados vs. frescos	+ 1,2
Duração da gestação superior a 275d	+ 2.4 a 10,7
Vitelos nados-mortos ou inviáveis às 24h pp vs. viáveis	+ 3.0
Dadoras, touro, modo de exploração das receptoras	(P<0,05)

No mesmo estudo, entre os **factores não correlacionados** com o peso ao nascimento encontram-se o sincronismo receptora/embrião (± 1 dia), a idade da receptora, a repetibilidade e intervalo entre as sessões de colheita de oócitos (OPU), a percentagem de cumulus-oócitos de boa qualidade, a utilização de células BRL em co-cultura, o estadio do embrião, o mês de parição, a raça da receptora, a equipa de transferência dos embriões, a qualidade da receptora e a duração do transporte do embrião entre o laboratório e o local de transferência.

Neste estudo foram assim identificados factores ao nível do oócito (dadora), do embrião (touro, qualidade, criopreservação), do vitelo (duração da gestação, sexo e viabilidade perinatal), bem como factores externos (exploração) que afectam significativamente o peso ao nascimento de vitelos IVP.

CONCLUSÕES

A produção de embriões *in vitro* e a clonagem por transferência nuclear, são dois procedimentos tecnológicos susceptíveis de induzir alterações ao nível do jovem embrião que aceleram o seu crescimento no útero. Estudos realizados com o controlo do genótipo sugerem a existência de uma interação entre a técnica e a raça no aparecimento de vitelos mais pesados ao nascimento. Em raças de pequeno porte o aumento de peso ao nascimento não chega a comprometer a viabilidade dos recém-nascidos. Nos cruzamentos indiscriminados e nas raças de grande porte, os existe um aumento da incidência de distócias e mortalidade neo-natal associada ao aumento do peso dos vitelos e da duração da gestação. Nestes casos podem nascer vitelos com valores extremos da ordem dos 78 kg. Embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*, sujeitos a altas concentrações de progesterona no início do seu desenvolvimento, dão origem a placentas e fetos mais pesados, desconhecendo-se o seu mecanismo de acção. É postulado que este síndrome resulta de alterações provocadas no meio durante o desenvolvimento embrionário conduzindo a alterações da regulação precoce da expressão dos genes implicados na síntese dos factores tróficos. A produção de nascituros mais pesados pela utilização de técnicas de produção *in vitro* de embriões levanta novas questões e desafios sobre o papel destas tecnologias na reprodução animal e humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anthony, R.V., Bellows, R.A., Short, R.E., Staigmiller, R.B., Kaltenbach, C.C. e Dunn, T.G. 1986. Fetal growth of beef calves: II. Effects of sire on prenatal development of the calf and related placental characteristics. *J. Anim. Sci.*, 62: 1375-1387.
- Anthony, R.V., Pratt, S.L., Liang, R. e Holland, M.D. 1995. Placental-Fetal Hormonal Interactions: Impact on Fetal Growth. *J. Anim. Sci.*, 73:1861-1971.
- Baker, J., Liu, J.-P., Robertson, E.J. e Efstratiadis, A. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75: 73-82.
- Behboodi, E., Anderson, G.B., BonDurant, R.H., Cargill, S.L., Kreuzscher, B.R., Medrano, J.F. e Murray, J.D. 1995. Birth of large calves that developed from *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 44: 227-232.
- Burfening, P.J., Kress, D.D., Friedrich, R.L., e Vaniman, D.D. 1978. Phenotypic and genetic relationships between calving ease, gestation length, birthweight and preweaning growth. *J. Anim. Sci.*, 47: 595- 600.
- DeChiara, T.M., Efstratiadis, A. e Robertson, E.J. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature (Lond.)*, 345: 78-80.

- DeChiara, T.M., Robertson, E.J. e Efstratiadis, A. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64: 849-859.
- Echternkamp, S.E. 1992. Fetal development in cattle with multiple ovulations. *J. Anim. Sci.*, 70: 2309-2321.
- Eley, R.M., Thatcher, W.W., Bazer, F.W., Wilcox, C.J., Becker, R.B., Head, H.H. e Adkinson, R.W. 1978. Development of the conceptus in the bovine. *J. Dairy Sci.* 61: 467-473.
- Farin, P.W. e Farin, C.E. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol. Reprod.*, 52: 676-682.
- Farin, C.E., Farin, P.W. e Mungal, S.A. 1997a. Maternal insulin-like growth factor-I (IGF-I) and development of in vivo- and in vitro-derived bovine fetuses. *Theriogenology*, 47:318.
- Farin, P.W., Farin, C.E. e Mungal, S.A. 1997b. Measurements of bovine fetuses and placentas at 63 days after transfer of embryos produce in vivo or in vitro. *Theriogenology*, 47: 319.
- Ferrel, C.L. 1991. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. *J. Anim. Sci.*, 69: 1945-1953.
- Garrett, J.E., Geisert, R.D., Zavy, M.T. e Morgan, G.L. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 84: 437-447.
- Garry, F.B., Adams, R., McCann, J.P. e Odde, K.G. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*, 45: 141-152.
- Gluckman, P.D. 1986. The role of pituitary hormones, growth factors and insulin in the regulation of fetal growth. In: *Oxford Review of Reproductive Biology*, J.R. Clarke (ed), Clarendon Press, Oxxford, UK, pp. 1-60.
- Gore, M.T., Young, R.B., Claeys, M.C., Chromiak, J.A., Rahe, C.H., Marple, D.N., Hough, J.D., Griffin, J.L. e Mulvaney, D.R. 1994. Growth and development of bovine fetuses and neonates representing three genotypes. *J. Anim. Sci.*, 72: 2307-2318.
- Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes, J.E. e Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43: 141-152.
- Horta, A.E.M., Marques, C.M., Vasques, M.I. e Leitão, R.M. 1992. Effect of inducing calvings on calf birth weight. *Proceedings do 12th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION*, The Hague, The Netherlands, 23-27 Aug, poster 267, pp. 895-897.
- Horta, A.E.M., Marques, C.C., Vasques, M.I., Leitão, R.M. e Vaz Portugal, A. 1993. Indução de gestações gemelares em vacas de carne por transferência de embriões produzidos *in vitro*. *Proceedings do 5º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL*, Sociedade Portuguesa de Reprodução Animal (Ed.), Luso-Portugal, II Vol., pp. 163-172.

- Holm, P., Walker, S.K., Peterson, B.A., Ashman, R.J. e Seamark, R.F. 1994. In vitro vs in vivo culture of ovine IVM/IVF ova: effect on lambing. *Theriogenology*, 41: 217.
- Keefer, C.L., Stice, S.L. e Matthews, D.L. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.* 50: 935-939.
- Kleemann, D.O., Walker, S.K. e Seamark, R.F. 1994. Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, 102: 411-417.
- Kruij, Th.A.M. e den Daas, J.H.G. 1997. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, 47: 43-52.
- Leighton, P.A., Ingram, R.S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A., e Tilghman, S.M. 1995. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent manose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Devel.*, 8: 2953-2963.
- Leighton, P.A., Saam, J.R., Ingram, R.S. e Tilghman, S.M. 1996. Genomic imprinting in mice: its function and mechanism. *Biol. Reprod.*, 54: 273-278.
- Liu, J.-P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J. e Efstratiadis, A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75: 59-72.
- Merton, J.S., van Wagtenonk-de Leeuw, A.M. e den Daas. 1998. Factors affecting Birthweight of IVP calves. *Theriogenology*, 49:293.
- Numabe, T., Oikawa, T., Satoh, H., Takada, N. e Horiuchi, T. 1997. Birthweights of calves conceived by transfer of Japanese Black Cow embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 47: 378.
- Patel, O.V., Domeki, I., Sasaki, N., Takahashi, T., Hirato, M., Sasser, R.G., e Humblot, P. 1995. Effect of fetal mass, number and stage of gestation on pregnancy-specific protein B concentrations in the bovine. *Theriogenology*, 44: 827-833.
- Pereira, R.M., Vasques, M.I., Marques, C.C., Baptista, M.C. e Horta, A.E.M. 1997. Efeito do soro de vacas em cio superovuladas, sobre a produção in vitro de embriões bovinos e a síntese de progesterona por monocamadas de células da granulosa. *PROCEEDINGS DO 1 CONGRESSO IBÉRICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Sociedade Portuguesa de Reprodução Animal (Ed.), Estoril-Portugal, Vol II, 128-135.*
- Prior, R.L. e Laster, D.B. 1979. Development of the bovine fetus. *J. Anim. Sci.*, 48: 1546-1553.
- Reinders, J.M.C., Paauw, M.J.G., Hazeleger, W., van Wagtenonk-de Leeuw, A.M. e Kemp, B. 1998. Is the large calf syndrome related to pregnancy diabetes? *Theriogenology*, 49: 297.
- Schmidt, M., Greve, T., Avery, B., Beckers, J.F., Sulon., J. e Hansen, H.B. 1996. Pregnancies, Calves and calf viability after the use of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, 46: 527-539.

- Seidel, G.E. Jr. 1992. Overview of cloning mammals by nuclear transplantation. In: Seidel, G.E. Jr. (ed), Proceedings, Symposium on cloning mammals by Nuclear Transplantation. Colorado State University, pp 1-4.
- Sinclair, K.D., Broadbent, P.J. e Dolman, D.F. 1995. In vitro produced embryos as a means of achieving pregnancy and improving productivity in beef cows. *Animal Science*, 60: 55-64.
- Stacchezzini, S., Fabaro, P., e Cremonesi, F. 1997. Field experiences with the transfer of in vitro or in vivo derived Piedmontese embryos in holstein recipients. *Theriogenology*, 47: 381.
- Thompson, J.G., Simpson, A.C., Pugh, P.A., McGowan, L.T., James, R.W., Berg, D.K., Payne, S.R., Tervit, H.R. 1992. Effects of glucose level in culture medium on survival of in vitro cultured sheep embryos following transfer to recipient ewes. *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.*, 52: 255-256.
- Vasques, M.I., Horta, A.E.M., Marques, C.C., Sasser, R.G. e Humblot, P. 1995. Levels of bPSPB throughout single and twin pregnancies after AI or transfer of IVM/IVF cattle embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 38: 279-289.
- Vasques, M.I., Marques, C.C., Pereira, R.M., Baptista, M.C. e Horta, A.E.M. 1998. Efeito luteotrófico de embriões bovinos e de diferentes tipos de soros sobre células da granulosa cultivadas in vitro. *Rev. Port. Ciênc. Veter.*, 93: 25-30.
- Walker, S.K., Heard, T.M. e Seamark, R.F. 1992. In vitro culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology*, 37: 111-126.
- Walker, S.K., Hartwich, K.M. e Seamark, R.F. 1996. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology*, 45: 111-120.
- Willadsen, S.K., Janzen, R.E., McAlister, R.J., Shea, B.F., Hamilton, G., e McDermand, D. 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology*, 36: 161-170.
- Wilson, J.M., Williams, J.D., Bondioli, K.R., Looney, C.R., Whesthusin, M.E. e McCalla, D.F. 1995. Comparison of birth weight and characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer and natural mating. *Anim. Reprod. Sci.*, 38: 73-83.
- Wilmot, I. e Sales, D.I. 1981. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 61: 179-184.
- Young, L.E., Tregaskes, L.D., Butterwith, S.C., Sinclair, K.D. e Wilmot, I. 1995. Advancing the uterine environment of early embryos by asynchronous transfer for 3 days affects foetal size at day 21. *J. Reprod. Fertil.*, 15: 18.