

Tasas de Concepción en Respuesta a Dosis Reducidas de Somatotropina en Vacas Holstein, Durante la Sincronización del Estro

Francisco García Sandoval³, Ramón Hernández Salgado¹, Joel Hernández Cerón², Carlos Elizondo Vázquez³, Ilda Graciela Fernández García^{3*}

¹Departamento de Producción Animal, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Carretera Gómez Palacio-Cd. Juárez, Bermejillo, Durango. ²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 04510. Ciudad de México, D.F. ³Departamento de Ciencias Médico Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Periférico Raúl López Sánchez y Carretera a Santa Fe, C.P. 27054, Torreón, Coahuila, México. Tel. y Fax: 871 7 29 76 10. E-mail: ilda_fernandez_garcia@yahoo.com.mx (*Autor responsable).

Abstract

The objective of this research was to determine the effect on the conception rates of Holstein cows, when served 2 reduced doses of recombinant bovine somatotropin (STbr) (250 mgs, each, sc) in day 56 postpartum, and at the artificial insemination time. The experiment took place in a stable of the Comarca Lagunera, Mexico, from August 2004 to April 2005. A group of multíparas cows (n=264) of first service were used with a number 3 corporal condition. All of them were put under a prostaglandin F2á (days 28 and 42 PP) and GnRH (day 56 PP) estro synchronization protocol. They were divided in two groups; Witness Group (GTES, n=156) with cows to which a placebo was administered; and STbr Group (GSTbr, n=108), with cows to which one first dose of 250 mgs of STbr in postpartal day 56 was injected. The second 250 mgs to STbr dose was applied at the artificial insemination time (67 ± 2 days postpartum). Blood samples in 10 cows of each group, were taken every two days, during 12 days. The concentrations of IGF-I by means of a inmunoradiométrico test were determined. The gestation diagnosis was performed by rectal palpation at 45 ± 3 days post-insemination. The conception rates between groups were compared by means of logistic concentration and regression analysis of IGF-I. A completely randomized experimental design with repeated measurements was applied. The conception rates in the group of cows under STbr treatment ($65,77 \pm 4,57\%$) were higher ($P<0.05$) that those in the witness group ($56,49 \pm 3,97\%$). The IGF-I concentrations were higher ($P<0.05$) in GSTbr than in GTES in 58 and 66 days postpartum. The results of this study allow to conclude that with the administration of 2 reduced doses of STbr, in postpartal day 56, and at the time of the artificial insemination, the rates of conception of Holstein cows of first service were increased.

Key words: STbr, conception rates, Holstein cows, fertility, IGF-I, oestrus synchronization.

Resumen

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto sobre las tasas de concepción en vacas Holstein, al administrarles 2 dosis reducidas de somatotropina bovina recombinante (STbr) (250 mg, cada una, sc) en el día 56 posparto, y al momento de la inseminación artificial. El experimento se realizó en un establo de la Comarca Lagunera, México, de agosto de 2004 a abril de 2005. Se utilizaron vacas multíparas de primer servicio (n=264), con condición corporal de 3. Todas fueron sometidas al protocolo de sincronización del estro con prostaglandina F2á (días 28 y 42 PP) y GnRH (día 56 PP). Fueron divididas en dos grupos; Grupo Testigo (GTES, n=156) con vacas a las que se les administró un placebo; y Grupo STbr (GSTbr, n=108), con vacas a las que se les inyectó una primera dosis de 250 mg de STbr en el día 56 postparto. La segunda dosis de 250 mg a STbr se aplicó al momento de la inseminación artificial (67 ± 2 días postparto). Se tomaron muestras de sangre en 10 vacas de cada grupo, cada dos días, durante 12 días. Se determinaron las concentraciones de IGF-I mediante un ensayo inmunoradiométrico. El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación rectal a los 45 ± 3 días postinseminación. Las tasas de concepción se compararon, entre grupos, mediante análisis de regresión logística y las concentraciones de IGF-I. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con mediciones repetidas.

Las tasas de concepción fueron más elevadas ($P < 0.05$) en el grupo de vacas tratadas con STbr (65.77 ± 4.57 %) que en las del grupo testigo (56.49 ± 3.97 %). Las concentraciones de IGF-I fueron más altas ($P < 0.05$) en GSTbr que en GTES en los días 58 y 66 postparto. Los resultados de este estudio permiten concluir que en la administración de 2 dosis reducidas de STbr, en el día 56 postparto, y al momento de la inseminación artificial, se incrementaron las tasas de concepción de vacas Holstein de primer servicio.

Palabras clave: STbr, tasas de concepción, vacas Holstein, fertilidad, IGF-I, sincronización de estros

Introducción

En las vacas lecheras una proporción elevada de los embriones mueren en los siguientes días después de la fertilización (Wilmot *et al.*, 1989). En las vacas repetidoras, la administración de somatotropina bovina recombinante (STbr), al momento de la inseminación, tiene un efecto favorable en las tasas de concepción (Morales-Roura *et al.*, 2001). Asimismo, en estudios con vacas bajo protocolos de sincronización de la ovulación, e inseminadas a tiempo fijo, la administración de STbr eleva las tasas de preñez (Moreira *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2001).

La administración de STbr induce un incremento en las concentraciones séricas y uterinas del factor de crecimiento insulinosímil tipo I (IGF-I) y esta hormona favorece el desarrollo embrionario temprano (Palma *et al.*, 1997; Rieger *et al.*, 1998). Además, el IGF-I actúa como un factor de sobrevivencia embrionaria, ya que disminuye el daño provocado por factores embriotóxicos (Jousan y Hansen, 2004). Por otra parte, el IGF-I puede favorecer la sobrevivencia embrionaria a través del efecto que tiene en el desarrollo del folículo ovulatorio, y en la maduración del ovocito (Hernández y Díaz, 2003).

La dosis de STbr que se ha utilizado para incrementar la producción de leche es de 500 mg (Bauman *et al.*, 1999, Gulay *et al.*, 2003). Dado que el tratamiento con fines reproductivos no busca un incremento en la producción de leche, cabe la posibilidad de utilizar dosis menores, aplicadas en las fases fisiológicas más importantes, tales como la maduración del folículo ovulatorio, y en el desarrollo embrionario temprano. Además, un tratamiento con 500 mg de STbr alrededor del día 60 puede tener un efecto negativo sobre las tasas de concepción, ya que tiene un efecto rápido en la producción de leche, el cual se acompaña de un incremento lento en el consumo de materia seca (Kirby *et al.*, 1997; Bilby *et al.*, 1999); de esta forma la vaca puede caer en un balance energético negativo aún mayor.

En este estudio se planteó la hipótesis de que dos administraciones de 250 mg de STbr, la primera en el día

56 postparto, y la segunda al momento de la inseminación artificial (IA), incrementan las tasas de concepción en vacas Holstein. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto sobre las tasas de concepción al administrar dos dosis reducidas de STbr (250 mg, cada una, sc) en el día 56 posparto y al momento de la inseminación artificial en vacas Holstein.

Materiales y Métodos

Animales y condiciones de mantenimiento

El experimento se realizó en un establo de la Comarca Lagunera de Coahuila (26° LN) que cuenta con 3,986 vacas. El experimento se llevó a cabo de agosto de 2004 a abril de 2005. Se utilizaron vacas Holstein multíparas ($n = 264$) de primer servicio, con una condición corporal de 3 en la escala de 1 a 5 (1 emaciada a 5 obesa; Ferguson *et al.*, 1994). Las vacas estuvieron en régimen de dos ordeños, con un promedio de producción de leche de 32 litros/día y recibieron una dieta integral de acuerdo a los requerimientos del NRC.

Sincronización del estro

Todas las vacas fueron sometidas al protocolo de sincronización del estro recibiendo en el día 28 y 42 postparto una dosis de PGF2 α (Prosolvlin C Intervet, 375 mg vía i.m.) y en el día 56 las vacas recibieron una dosis única de GnRH (Fertagyl, Intervet, 100 μ g por vía i.m.).

El grupo testigo (GTES $n = 156$), fue inyectado con 1.0 ml de solución salina fisiológica como placebo. El grupo STbr (GSTbr $n = 108$) recibió una primera dosis de 250 mg de STbr vía subcutánea en el día 56 posparto y la segunda dosis de 250 mg de STbr se aplicó al momento de la inseminación artificial (67 ± 2 días postparto).

Diagnóstico de gestación

El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación rectal a los 45 ± 3 días postinseminación.

Muestras sanguíneas

Se recolectaron 170 muestras de sangre de 10 vacas de cada grupo, obtenidas cada 2 días, durante 12 d, utilizando tubos al vacío con EDTA. El plasma se obtuvo mediante centrifugación a 1500 g durante 30 min y se conservó a -20 °C hasta su análisis. Se determinaron las concentraciones de IGF-I mediante un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) descrita por Miles *et al.* (1974) con un coeficiente de variación intraensayo de 3.7 %.

Análisis estadístico

En este trabajo se definió la tasa de concepción como la proporción de hembras que quedaron gestantes de aquellas que mostraron signos de estro y que fueron

Cuadro 1. Tasas de concepción en vacas Holstein con dos dosis reducidas de STbr, GSTbr(*) en el día 56 postparto y al momento de la inseminación artificial, el GTES no recibió STbr(*).

Grupos	n	Gestantes/vacías	Tasas de concepción % (± Error estándar)
GTES	154	87/67	56.49 (± 3.97)*
GSTbr	108	71/37	65.77 (± 4.57)*

*P<0.05 (chi-cuadrada de Wald = 3.017)

inseminadas durante el periodo de sincronización (Patterson *et al.*, 2003), esas tasas se compararon entre los dos grupos mediante un análisis de regresión logística (PROC LOGISTIC de SAS, 1996) y las concentraciones de IGF-I se evaluaron con un diseño experimental completamente al azar con mediciones repetidas en el tiempo empleando el PROC GLM (SAS, 1996).

Resultados y Discusión

En este estudio se encontró que las tasas de concepción fueron más elevadas (P<0.05) en el grupo de las vacas tratadas con STbr (Cuadro 1).

Como se puede observar en la Figura 1 la administración de la primera dosis reducida de STbr se manifestó con elevación de las concentraciones de IGF-I en el día 58 postparto (P<0.01) también se encontraron diferencias

(P<0.05) en el día 62 postparto para GSTbr y las concentraciones se mantuvieron sin elevaciones en el GTES.

Se han reportado efectos negativos, relacionados con la dosis de la STbr, en vacas, con el tiempo de inicio del tratamiento, con el desempeño reproductivo, con factores nutricionales y con la producción de leche. Asimismo, se ha señalado que la STbr afecta la fertilidad de las vacas lactantes reduciendo la expresión del estro e incrementando la frecuencia de ovulaciones no detectadas (Kirby *et al.*, 1997). Otros autores han encontrado, también, que, con la administración de 500 mg de STbr, disminuyeron las tasas de preñez (Bilby *et al.*, 2004). Sin embargo, Izadyar *et al.* (1996) reportan que, con la adición de STbr a las células del *cumulus* en ovocitos cultivados *in vitro*, se acelera la maduración del núcleo y del citoplasma, que resulta en

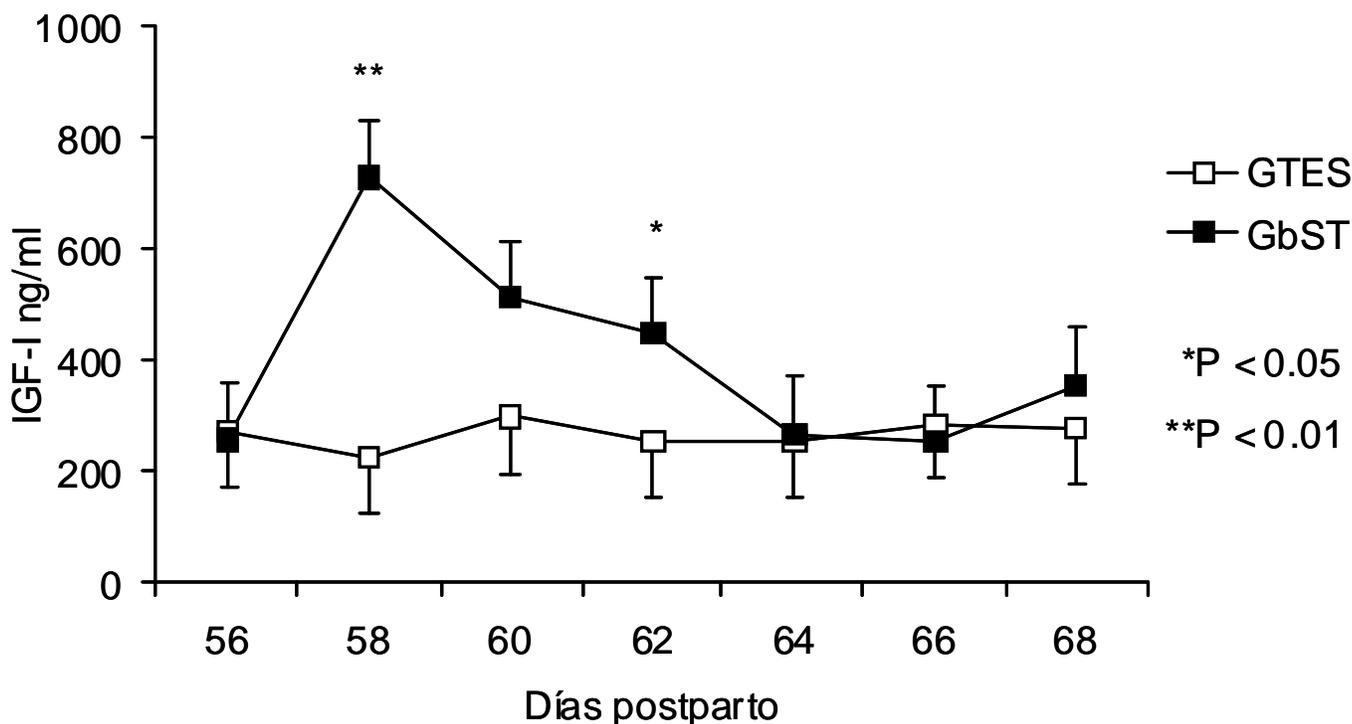


Figura 1. Niveles plasmáticos de IGF-I de las vacas que se muestrearon durante los días 56 al 68 postparto, GTES (□) y GSTbr (■).

aumentos subsecuentes en el desarrollo embrionario y que ese efecto pudiera ocurrir también *in vivo* debido a que las concentraciones de IGF-I en el líquido folicular se elevan después de la administración de STbr, por lo que sería válido suponer que la hormona del crecimiento puede afectar directamente al folículo preovulatorio, así como la maduración del ovocito y- de esa manera- mejorar la fertilidad. Otro argumento es que la STbr afecta localmente la producción de IGF-I, regulando mediante mecanismos autocrinos o paracinos las células de la granulosa, por lo que el IGF-I liberado del hígado después de la aplicación con STbr, estimula el funcionamiento ovárico (Peel y Bauman, 1987). En lo que se refiere a la dinámica folicular en respuesta a la STbr y a la lactación, así como su contribución en los cambios del comportamiento reproductivo asociados a un incremento en la producción de leche, algunos autores indican que se debe a que la STbr restaura la concentración de IGF-I, que previamente había sido reducida por el balance energético negativo y la lactación (Badinga *et al.*, 1992). El efecto de la STbr sobre la fertilidad en vacas lactantes se ha demostrado por la respuesta positiva de la hormona de crecimiento y el IGF-I sobre la fertilización y el desarrollo embrionario (Moreira *et al.*, 2002). En el ganado bovino de carne una deficiencia en los receptores de la hormona de crecimiento se ha manifestado con una reducción del nivel plasmático de IGF-I, afectando al folículo, y al desarrollo del cuerpo lúteo, y en consecuencia, las concentraciones plasmáticas de progesterona (Hull y Harvey, 2001).

Después de la fertilización, el desarrollo embrionario puede estar influido por la STbr y por el IGF-I, ya que se han sido identificados receptores para estas sustancias en diferentes etapas del desarrollo embrionario (Palma *et al.*, 1997). Es posible que, después de la administración de la STbr, el desarrollo embrionario sea modulado en el útero y en el oviducto, ya que se han encontrado sus receptores en esos epitelios. El IGF-I y otros factores de crecimiento han sido implicados en la secreción de la fosfolipasa A₂ y de la enzima ciclooxigenasa-2 que regulan la síntesis de PG (Berebaum *et al.*, 1994). Además la hormona de crecimiento en cultivos celulares del endometrio inhibe la expresión de ciclooxigenasa-2 y la secreción de PG (Badinga *et al.*, 2000), por lo que, la aplicación de STbr puede atenuar la producción de PG por el endometrio uterino, durante el reconocimiento materno incrementando la sobrevivencia del embrión (Moreira *et al.*, 2001).

Existen reportes que indican que las vacas lecheras a las que se les administró STbr en dosis reducidas presentaron tasas de concepción y de preñez más elevadas (Stanisiewski *et al.*, 1992). Por eso, en este trabajo, se pensó que, con dosis reducidas de STbr, se puede evitar

que esta hormona tenga un efecto rápido en la producción de leche que se acompaña de un incremento lento en el consumo de materia seca, por lo que la vaca puede caer en un balance energético negativo mayor al que se presenta normalmente durante los dos primeros meses de la lactación y, de esa manera, tener tasas de concepción más altas (Kirby *et al.*, 1997; Bilby *et al.*, 1999).

La hipótesis de este estudio fue que dos administraciones de 250 mg de STbr, la primera en el día 56 posparto, y la segunda al momento de la inseminación, pueden resultar en una elevación de las tasas de concepción en vacas Holstein. Efectivamente, en esta investigación las tasas de concepción en GSTbr fueron más elevadas, lo que está en concordancia con los reportes de Moreira *et al.* (2000, 2001); Hernández y Díaz (2003) y Santos *et al.* (2004), posiblemente porque la somatotropina a dosis reducidas incrementó las concentraciones plasmáticas de IGF-I, tal como indican Gulay *et al.* (2003), con lo que se pudo favorecer la selección y dominancia del folículo. Otros autores reportan que, con la aplicación de STbr a vacas sometidas a programas de inseminación a tiempo fijo, o a vacas detectadas en estro, se incrementan las tasas de preñez porque hay mayor desarrollo embrionario y sobrevivencia ya que la presencia del *conceptus* altera la expresión endometrial de genes y proteínas, así como de sustancias conocidas como nutracéuticas, que son ácidos grasos insaturados, especialmente los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico en lípidos de paso (Thatcher *et al.*, 2006).

En nuestro estudio (Figura 1) una posible explicación del incremento en las tasas de concepción, se debió muy probablemente a que se incrementó el desarrollo embrionario temprano postinseminación, dando como resultado que se desarrollaran más embriones y éstos tuvieron la capacidad de secretar más interferón-t (Mann y Lamming, 2001) bloqueando la cascada luteolítica (Binelli *et al.*, 2001). Es interesante que los resultados de este trabajo se debieron probablemente a la combinación en el programa de sincronización del estro, la GnRH y las PGF_{2α}, que culminaron con el aumento en las tasas de concepción. De igual manera los resultados concuerdan con Santos *et al.* (2004) quienes indican que las vacas inseminadas a estro detectado experimentan menos pérdidas embrionarias.

En lo que se refiere a las dosis de STbr, Kirby *et al.* (1997) argumentan que al aplicar 500 mg de STbr cada 14 d se reduce la observación visual del estro en las vacas lecheras lactantes, mientras que Morbeck *et al.* (1991) encontraron que al aplicar 16.5 mg de STbr/d iniciando en la quinta semana postparto, se extiende el intervalo del parto al primer estro observado postparto e inseminación.

En este estudio con las dos aplicaciones de 250 mg de STbr, se redujeron los días en la presentación de estro, por lo que probablemente la STbr afectó los centros de la conducta del cerebro que controlan la expresión del estro, lo que está en concordancia con Santos *et al.* (2004).

Conclusiones

Se encontró un efecto positivo de la STbr en el protocolo de sincronización del estro, ya que los resultados de este trabajo indican que la administración de dos dosis de 250 mg de STbr, en el día 56 y al momento de la IA, incrementa las tasas de concepción de vacas Holstein de primer servicio.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ing. Carlos Valdés Berlanga, propietario del establo El Compás, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo el experimento.

Literatura Citada

- Badinga, L, A Guzeloglu, M. Binelli y W. Thatcher. 2000. Bovine somatotropin attenuates phorbol ester-induced PGF_{2a} release in bovine endometrial cells. *Biol. Reprod.* 62: 150.
- Badinga, L., M. A. Driancourt, J. D. Savio, D. Wolfenson, M. Drost, R. L. De La Sota, y W.W.Thatcher. 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 47: 871.**
- Bauman, D.E. 1999. Bovine somatotropin and lactation: From basic science to commercial application. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17 (2-3):101-116.
- Berebaum, F, G Thomas, S. Poiraudau, G. Bereziat, M. T. Corvol y J. Masliah. 1994. Insulin-like growth factors counteract the effect of interleukin 1 β on type II phospholipase A₂ expression and arachidonic acid release by rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett.* 340: 51-55.
- Bilby, C.R, J. F.Bader, B.E. Salfen, R. S. Youngquist, C. N. Murphy, H.A.Garverick, B.A. Crooker y M. C. Lucy. 1999. Plasma GH, IGF-I and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. *Theriogenol.* 51:1285-1296.
- Bilby, T.R., A. Guzeloglu, S. Kamimura, S.M. Pancarci, F. Michel, H. H. Head y W.W. Thatcher. 2004. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and insulin-like growth factor system responses. *J. Dairy Sci.* 87 (10):3256-3267.
- Binelli, M., P. Subramaniam, T. Diaz, G. A. Johnson, T. R. Hansen, L. Badinga, y W. W. Thatcher. 2001. Bovine interferon- τ stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. *Biol. Reprod.* 64: 654.
- Ferguson, D.J., D. T. Galligan y N. Thomsen. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 77:2695-2703.
- Gulay, M.S., M.J. Hayen, L.C.Teixeira, C.J. Wilcox y H. H. Head. 2003. Responses of Holstein cows to a low dose of somatotropin (STbr) prepartum and postpartum. *J. Dairy Sci.* 86:3195-3205.
- Hernández, C. J. y B. R. Díaz. 2003. La somatotropina bovina como una herramienta para incrementar la fertilidad en la vaca lechera. pp:123-134. *In: II Simposio Nacional de infertilidad en la vaca lechera y III Congreso Internacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas Especialistas en Bovinos de la Comarca Lagunera. Torreón Coah., México.*
- Hull, K. L. y S. Harvey. 2001. Growth hormone: roles in female reproduction. *J Endocrinol.* 168 (1):1-23.
- Izadyar, F. B. Colenbrander y M.M. Brevers.1996. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.* 45:372--377.
- Jousan, F.D. y P. J. Hansen. 2004. Insulin-like growth factor-1 as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol. Reprod.* 71:1665-1670.
- Kirby, C. J., S. J. Wilson y M. C. Lucy. 1997. Response of dairy cows treated with bovine somatotropin to a luteolic dose of prostaglandin F₂. *J. Dairy Sci.* 80: 286-294.
- Miles, L., D. A. Lipschitz, C. P. Bieber, y J. D. Cook. 1974. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Analyt. Biochem.* 61:209-224.
- Morales-Roura, J.S., L. Zarco, J. Hernández-Cerón y G. Rodríguez. 2001. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenol.* 55:1831-1841.
- Morbeck, D. E., J. H. Britt, y B. T. McDaniel. 1991. Relationships among milk yield, metabolism, and reproductive performance of primiparous Holstein cows treated with somatotropin. *J. Dairy Sci.* 74: 2153 - 2164.
- Moreira, F., C. Orlandi, C. A. Risco, R. Mattos, F. Lopes y W. W. Thatcher. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:1646-1659.

- Moreira, F., C.A. Risco, M. F. Pires, J. D. Ambrose, M. Drost y W.W. Thatcher. 2000. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 83:1237-1247.
- Moreira, F., F. F. Paula-Lopes, P. J. Hansen, L. Badinga y W. W. Thatcher. 2002 Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenol.* 57(2):895-907.
- Palma, G.A., M. Muller y G. Brem. 1997. Effect of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 110:347-353.
- Patterson, D.J., F. N. Kojima y M. F. Smith. 2003. A review of methods to synchronize estrus in replacement beef heifers and postpartum cows. *J. Anim. Sci.* 81(e. Suppl. 2):166-177.
- Peel, C. J. y D. E. Bauman. 1987 Somatotropin and lactation. *J. Dairy Sci.* 70(2):474-486.
- Rieger, D., A. M. Luciano, S. Modina, P. Pocar, A. Lauria y F. Gandolfi. 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 112:123-130.
- Santos, J. E., S. O. Juchem, R. L. Cerri, K. N. Galvao, R. C. Chebel, W. W. Thatcher, C. S. Dei y R. Bilby R. 2004. Effect of STbr and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87 (4):868-881.
- Stanisiewski, E.P., L. F. Krabill y J. W. Lauderdale. 1992. Milk yield, health, and reproduction of dairy cows given somatotropin (Somavubove) beginning early postpartum. *J. Dairy Sci.* 75:2149-2164.
- Thatcher, W.W., T. R. Bilby, J. A. Bartolome, F. Silvestre, C. R. Staples y J. E. Santos. 2006. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenol.* 65 (1):30-44.
- Wilmut, I., D. I. Sales y C. J. Ashworth. 1986 Maternal and embryonic factors associated with prenatal loss in mammals. *J. Reprod. Fertil.* 76:851-864.
-