

Porcentaje de concepción en vacas Holstein repetidoras tratadas con somatotropina bovina al momento de la inseminación

Conception rate in repeat-breeding Holstein cows treated with bovine somatotropin at the time of insemination

Gabriel Mendoza Medel^a, Joel Hernández Cerón^b, Luis A. Zarco Quintero^b, Carlos G. Gutiérrez^b

RESUMEN

Se probó si una sola inyección de la hormona bovina del crecimiento (bST) al momento de la inseminación aumenta el porcentaje de concepción en vacas Holstein repetidoras. Se utilizaron 316 vacas repetidoras (vacas con > 3 servicios infértiles); al momento de la inseminación se dividieron aleatoriamente en dos grupos: grupo bST (n=175), recibió 500 mg sc de bST al momento de la inseminación. El grupo testigo (n=141), no recibió bST. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación rectal 45 ± 3 días después de la IA. Para conocer el efecto de la bST en las concentraciones plasmáticas de IGF-1 y progesterona, se obtuvieron muestras sanguíneas diariamente a partir de la inseminación hasta el día 10 posinseminación en siete vacas tratadas con bST y siete testigos. El tratamiento con bST incrementó el porcentaje de concepción [81/175 (46 %) vs 49/141 (35 %)]; $P<0.01$. Las concentraciones de IGF-1 fueron mayores ($P<0.001$) en las vacas que recibieron bST que en las testigo. Las concentraciones de progesterona fueron similares entre los grupos ($P=0.68$). Se concluye que una sola inyección de la hormona bovina del crecimiento al momento de la inseminación incrementa el porcentaje de concepción en vacas Holstein repetidoras.

PALABRAS CLAVE: bST, Fertilidad, Holstein, Vacas repetidoras.

ABSTRACT

A single treatment with bovine somatotropin (bST) was administered at the time of insemination to repeat-breeding Holstein cows to test its effect on conception rate. A total of 316 cows with at least three unsuccessful previous services were used and were randomly assigned to be treated (bST; n=175) or not (control; n=141) with 500 mg of bST administered subcutaneously at the time of artificial insemination. Pregnancy was confirmed by transrectal palpation 45 ± 3 d after insemination. The effect of bST treatment on serum IGF-I and progesterone concentrations was determined in daily blood samples from the day of insemination to d 10 post-insemination, in seven cows per group. Treatment with bST increased conception rate [81/175 (46 %) vs 49/141 (35 %)]; $P<0.01$. Treatment with bST increased IGF-1 concentrations ($P<0.001$). Serum progesterone concentrations did not differ ($P=0.68$) between groups. In conclusion, a single bST treatment at the time of insemination increased conception rate in repeat-breeding Holstein cows.

KEY WORDS: bST, Fertility, Repeat-breeding, Holstein cows.

La muerte embrionaria temprana es la principal causa de pérdidas de gestaciones en el bovino, y es particularmente alta en las vacas lecheras bajo sistemas de producción intensiva^(1,2).

Early embryonic death is the leading cause of pregnancy losses in cattle, and is particularly high in dairy cows under intensive production systems^(1,2). Morales-Roura *et al*⁽³⁾ suggested

Recibido el 28 de noviembre de 2011. Aceptado el 20 de abril de 2012.

^a Unidad Académica Medicina Veterinaria y Zootecnia. Extensión Regional Costa Chica. Universidad Autónoma de Guerrero. México.

^b Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D.F. Tel. 56225860, fax 56225935. jhc@servidor.unam.mx. Correspondencia al segundo autor.

Morales-Roura *et al.*⁽³⁾ propusieron que la administración de la hormona bovina del crecimiento (bST) en vacas repetidoras el día del estro podría favorecer el desarrollo del embrión, lo cual se reflejaría en un incremento del porcentaje de concepción. En ese estudio, una inyección de 500 mg de bST el día del servicio y una segunda inyección 10 días después incrementó la proporción de vacas gestantes. También se han obtenido resultados similares en vacas de primer servicio sujetas a protocolos de inseminación a tiempo fijo, las cuales recibieron una inyección de bST al momento de la primera administración de GnRH o en la inseminación, seguida de la aplicación periódica de dicha hormona cada 14 días⁽⁴⁻⁶⁾. Sin embargo, en otros estudios hechos por nuestro grupo, una sola inyección al momento de la inseminación no mejoró el porcentaje de concepción en vacas de primer servicio^(7,8).

El mecanismo por el cual la bST incrementa la fertilidad puede estar determinado por sus efectos directos e indirectos [mediados por el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1)], en el desarrollo embrionario. Existen dos ventanas fisiológicas en las cuales la bST puede estar influyendo; una sería durante los primeros siete días de vida del embrión, periodo en el cual se presenta la mayor proporción de anomalías del desarrollo⁽⁹⁾. El embrión bovino tiene receptores de la hormona del crecimiento y del IGF-1^(10,11), y en condiciones *in vitro* e *in vivo* estas hormonas incrementan la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto^(12,13). Por otra parte, se ha observado que la bST incrementa las concentraciones séricas de progesterona⁽¹⁴⁾, lo cual también podría favorecer el desarrollo embrionario temprano^(15,16).

La otra ventana fisiológica podría ser durante el reconocimiento materno de la gestación, ya que una de las causas propuestas de pérdidas de gestaciones es la incapacidad del embrión para establecer este mecanismo⁽¹⁷⁾. Así, es posible que la bST aumente la capacidad del embrión para dar la señal de reconocimiento

that the administration of bovine somatotropin (bST) in repeat-breeding cows the day of estrus could favor the development of the embryo, which would be reflected in an increase of conception rate. In that study, 500 mg of bST injected the day of service and a second injection 10 d later increased the proportion of pregnant cows. Similar results were obtained when first service cows subject to fixed-time insemination protocols, received an injection of bST at the time of the first GnRH administration or insemination, followed by a second application 14 d later⁽⁴⁻⁶⁾. However, in other studies using first service cows, a single injection at the time of insemination did not improved the conception rate^(7,8).

There are two physiological periods where bST can be affecting, the first one during the first seven days of embryo development, where the greatest proportion of abnormalities are presented⁽⁹⁾. The bovine embryo has both the IGF-1 and somatotropin receptors^(10,11), and *in vitro* and *in vivo* studies have shown that these hormones increase the proportion of embryos reaching the blastocyst stage^(12,13). On the other hand, in some instances bST increased serum concentrations of progesterone⁽¹⁴⁾, which might also favor early embryonic development^(15,16).

The other physiological period might be during maternal recognition of pregnancy, since one of the proposed causes of pregnancy losses is the inability of the embryo to adequately signal its presence in the uterus⁽¹⁷⁾. Thus, it is possible that bST increases the ability of the embryo to produce interferon t⁽¹⁸⁾.

In the study of Morales-Roura *et al.*⁽³⁾, repeat-breeding cows received two injections of bST 10 d apart starting at the time of insemination. Since the most critical stage for embryo survival is in the first 7 d post-insemination^(1,2) and bST treatment causes an increase in IGF-1 within 14 d, we propose that a single treatment with bST at the time of insemination may suffice

materno de la gestación, mediante la estimulación de la síntesis de interferón t⁽¹⁸⁾.

En el estudio hecho en vacas repetidoras⁽³⁾, las vacas recibieron una inyección de bST en la inseminación y una segunda inyección 10 días después. Debido a que la etapa más crítica para la sobrevivencia embrionaria es en los primeros siete días posinseminación^(1,2) y a que la inyección de bST provoca un incremento de IGF-1 durante los siguientes 14 días, es posible que un sólo tratamiento con bST al momento de la inseminación tenga un efecto favorable en la fertilidad, similar al observado con dos inyecciones. En este contexto, en el presente estudio se probó si una sola inyección de bST al momento de la inseminación mejora el porcentaje de concepción en vacas repetidoras.

Se utilizaron 316 vacas Holstein repetidoras (vacas con más de tres servicios infértiles), de 17 establos con manejo y alimentación similares. Las vacas tuvieron 245 ± 3.7 días posparto, 5 ± 0.05 servicios, 3 ± 0.07 partos previos y condición corporal mínima de 2 en la escala del 1 a 5. En cada hato, las vacas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: el grupo bST (n= 175), recibió 500 mg por vía subcutánea de bST (Lactotropina, Elanco, México) al momento de la inseminación. El grupo testigo (n=141) no recibió bST.

La detección de estros se realizó mediante observación visual dos veces al día (mañana y tarde) durante una hora y la inseminación artificial la practicó un mismo inseminador 12 h después del inicio del estro. El semen utilizado fue de toros de fertilidad probada, distribuidos en los tratamientos de acuerdo con el programa genético de cada hato. El diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación rectal 45 ± 3 días posinseminación.

Se seleccionaron aleatoriamente siete vacas tratadas con bST y siete vacas testigos. Se tomaron muestras de sangre diariamente en tubos al vacío con EDTA durante 10 días a

to increase conception rate in repeat-breeding cows.

Three hundred sixteen repeat-breeding Holstein cows (with more than three infertile services), from 17 herds with similar management and feeding regimes were used. Cows had 245 ± 3.7 d postpartum, 5 ± 0.05 services, 3 ± 0.07 previous calvings and minimal body condition of 2 on a scale of 1 to 5. In each herd, cows were randomly assigned to two groups: the bST group (n= 175), received 500 mg of bST subcutaneously (Lactotropina, Elanco, Mexico) at the time of insemination. The control group (n= 141) received no bST.

Cows were observed for estrus twice daily for one hour periods 12 h apart. Cows in heat were inseminated 12 h after estrus, with semen from bulls of proven fertility. Pregnancy diagnosis was performed by rectal palpation 45 ± 3 d post-insemination.

Seven cows treated with bST and seven control cows were bled daily with EDTA vacuum vials during 10 d since the day of insemination (d 0). Samples were centrifuged at 1,500 xg for 15 min. Plasma was separated and frozen at -20 °C. IGF-1 concentrations in samples taken every other day were determined by immunoradiometric assay (IRMA) with a sensitivity of 2.0 ng/ml. The intra-assay coefficient of variation from quality control (QCs) samples measured in duplicate were 4.3 % (B/Bo= 30 % approximately; 352 ng/ml) and 1.6 % (B/Bo= 70 % approximately; 945 ng/ml), for the high and low QCs respectively⁽¹⁹⁾. Progesterone concentrations were measured by radioimmunoassay (Coat-A-Count, DPC; USA) with a sensitivity of 0.1 ng/ml and an intra-assay coefficient of variation of 6.1 % (B/Bo= 30 % approximately; 4.9 ng/ml) and 3.2 % (B/Bo= 70 % approximately; 0.43 ng/ml), for the high and low QCs respectively.

The conception rate was compared using the chi-squared test. Progesterone and IGF-I concentrations were compared between groups

partir del día de la inseminación (día 0). Las muestras se centrifugaron a 1,500 xg durante 15 min. El plasma fue separado y congelado a -20 °C. Se determinaron las concentraciones de IGF-1 en muestras obtenidas cada dos días mediante un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) con una sensibilidad de 2.0 ng/ml. Los coeficientes de variación intraensayo obtenidos a partir de los controles de calidad (QCs) medidos por duplicado fueron 4.3 % (B/Bo= 30 % aproximadamente; 352 ng/ml) y 1.6 % (B/Bo= 70 % aproximadamente; 945 ng/ml), para los QCs altos y bajos respectivamente⁽¹⁹⁾. Las concentraciones de progesterona fueron medidas por radioinmunoanálisis (Coat-A-Count, DPC; USA) con una sensibilidad de 0.1 ng/ml y un coeficiente de variación intraensayo de 6.1 % (B/Bo= 30 % aproximadamente; 4.9 ng/ml) y 3.2 % (B/Bo= 70 % aproximadamente; 0.43 ng/ml), para los QCs altos y bajos respectivamente.

El porcentaje de concepción se comparó mediante una prueba de Ji-cuadrada. Las concentraciones de progesterona e IGF-I fueron comparadas entre grupos mediante un análisis de varianza para mediciones repetidas ANOVA⁽²⁰⁾.

El tratamiento con bST incrementó ($P<0.01$) el porcentaje de concepción (46 vs 35 %; Cuadro 1). El mejoramiento de la fertilidad en las vacas repetidoras se puede explicar por los efectos directos e indirectos de la bST en la maduración

Cuadro 1. Porcentaje de concepción en vacas repetidoras tratadas con la hormona bovina del crecimiento al momento de la inseminación

Table 1. Conception rate in repeat-breeding cows treated with bovine somatotropin at the time of insemination

Groups	Number of cows	Number of pregnant cows	Conception rate
bST	175	81	46 ^a
Control	141	49	35 ^b

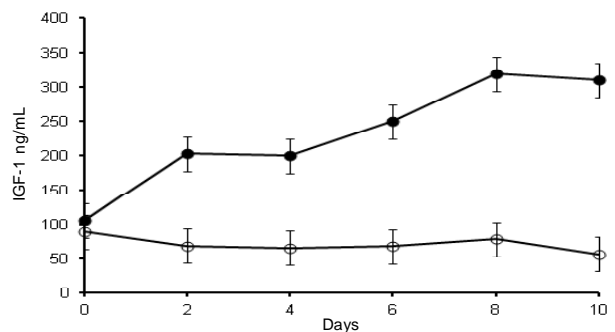
^{ab} ($P<0.01$).

using an analysis of variance for repeated measurements⁽²⁰⁾.

Treatment with bST increased ($P<0.01$) conception rate (46 vs 35 %; Table 1). The improved fertility in repeat-breeding cows can be explained by the direct and indirect effects of bST in the maturation of the oocyte, fertilization and early embryonic development. In the present study, IGF-1 concentrations increased after treatment and remained high until the last day of sampling (treatment by day interaction $P<0.001$; Figure 1). Although somatotropin concentrations were not measured, it is assumed that these were high because cows received it exogenous; in addition, the increase of IGF-I blood concentrations is a consequence of bST treatment and begins to increase 5 to 7 h after its injection⁽²¹⁾. The addition of somatotropin or IGF-1 to the *in vitro* culture promotes maturation of the oocyte and increases the proportion of cleaved embryos⁽²²⁻²³⁾. In *in vivo* studies, administration of bST at the time of insemination in dairy cows⁽¹²⁾ also increased the proportion of fertilized oocytes. In this study, treatment with

Figura 1. Concentraciones de IGF-1 (media ± error estándar) en vacas repetidoras tratadas con la hormona bovina del crecimiento al momento de la inseminación (-●-), y testigos (-○-)

Figure 1. IGF-1 concentrations (mean ± standard error) in repeat-breeding cows treated with bovine somatotropin at the time of insemination (-●-), and control (-○-)



Day 0 corresponds to the day of insemination. There was effect of the treatment ($P<0.001$) and the interaction treatment by day ($P<0.001$).

del ovocito, fertilización y desarrollo embrionario temprano. En el presente estudio, las concentraciones de IGF-1 se incrementaron después del tratamiento y se mantuvieron elevadas hasta el último día del muestreo (interacción tratamiento x día $P < 0.001$; Figura 1). Aunque no se midieron las concentraciones de somatotropina, se asume que éstas fueron elevadas debido a que las vacas la recibieron exógenamente; además, hay evidencia de que las concentraciones sanguíneas de IGF-1 comienzan a incrementarse de 5 a 7 h después de la inyección de bST⁽²¹⁾, por lo cual la inyección de bST pudo favorecer la maduración final del ovocito. La adición de GH o IGF-1 al medio de cultivo *in vitro*, favorece la maduración del ovocito e incrementa la proporción de embriones que llegan a dividirse⁽²²⁻²³⁾. En estudios *in vivo*, también la administración de bST al momento de la inseminación en vacas lecheras⁽¹²⁾ incrementa la proporción de ovocitos fertilizados. En el presente estudio, el tratamiento con bST pudo influir en la maduración del ovocito, dando como resultado un ovocito con mayor potencial para ser fertilizado y para desarrollar un embrión viable.

La bST y el IGF-1 pudieron influir, también, en el desarrollo embrionario temprano. El efecto de la bST en el embrión puede ser directo o mediado por IGF-1, ya que el embrión posee receptores para ambas hormonas^(10,11). Se ha observado que el tratamiento con bST en vacas superovuladas incrementa la proporción de embriones transferibles⁽¹²⁾, y en *in vitro* la adición de la somatotropina o IGF-1 aumenta la proporción de embriones que alcanzan la etapa de blastocisto⁽¹³⁾.

El porcentaje de concepción obtenido en el presente trabajo coincide con lo observado por Morales-Roura *et al*⁽³⁾, quienes lograron un incremento del porcentaje de concepción con dos inyecciones de bST. El haber obtenido un efecto positivo con una sola inyección de bST al momento de la inseminación permite suponer que la ventana fisiológica más importante, en la cual influye esta hormona, es durante los

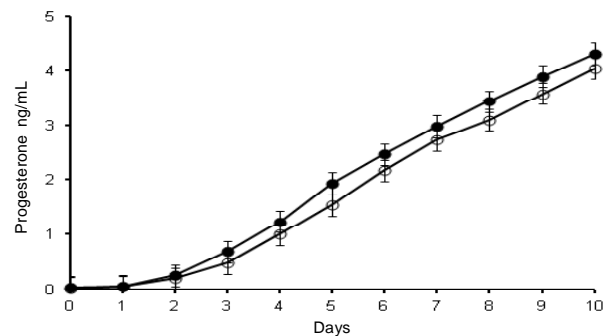
bST could influence oocyte maturation, resulting in an oocyte with the greatest potential to be fertilized and develop a viable embryo.

Both bST and IGF-1 could also influence early embryonic development. The effect of bST in the embryo can be direct or mediated by IGF-1, since the embryo has receptors for both hormones^(10,11). Treatment with bST in superovulated cows increased the proportion of transferable embryos⁽¹²⁾, and the addition of somatotropin or IGF-1 increases the proportion of embryos reaching blastocyst stage *in vitro*⁽¹³⁾.

The conception rate obtained in the present work agrees with Morales-Roura *et al*⁽³⁾, who obtained an increase in pregnancy rate with two injections of bST. Having obtained a positive effect with a single injection of bST at the time of insemination allows proposing that the most important physiological window to influence embryo survival is during the first days post-insemination. The above is supported by the results obtained in another study conducted by our group, in which the injection of bST in

Figura 2. Concentraciones de progesterona (media \pm error estándar) en vacas repetidoras tratadas con la hormona bovina del crecimiento al momento de la inseminación (-●-) y testigos (-○-)

Figure 2. Progesterone concentrations (mean \pm standard error) in repeat-breeding cows treated with bovine somatotropin at the time of insemination (-●-) and control (-○-)



Day 0 corresponds to the day of insemination. There was no treatment effect ($P = 0.68$) nor the interaction treatment by day ($P = 0.98$).

primeros días posinseminación. Lo anterior es apoyado por los resultados obtenidos en otro estudio realizado por nuestro grupo, en el cual la inyección de bST el día 3 posinseminación en vacas repetidoras y una segunda inyección el día 17 no mejoró el porcentaje de concepción⁽²⁴⁾.

Se ha sugerido^(3,4) que otra forma en que la bST puede favorecer la sobrevivencia embrionaria podría ser por medio del mejoramiento de la función del cuerpo lúteo. En condiciones *in vitro*, el IGF-1 incrementa la producción de progesterona en el tejido lúteo⁽²⁵⁾. Además, se ha encontrado que las vacas tratadas con bST tienen concentraciones más elevadas de progesterona⁽¹⁴⁾. No obstante, en el presente trabajo el tratamiento con bST no aumentó ($P=0.68$) las concentraciones sanguíneas de progesterona (Figura 2), por lo cual el mecanismo de acción de la bST puede ser independiente a la estimulación de la función del cuerpo lúteo.

Se concluye que una sola inyección de bST al momento de la inseminación incrementa el porcentaje de concepción en vacas Holstein repetidoras.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de los ganaderos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAITSA).

LITERATURA CITADA

1. Sreenan JM, Diskin MG, Morris DG. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. In: Diskin MG editor. Fertility in the high-producing dairy cows. Edinburgh: British Society of Animal Science. Occasional Publication 1, 2001(26):93-104.
2. Thatcher WW, Santos JEP. Characterization of early embryonic death and prevention of pregnancy wastage. The AABP Proc 2003;36:100-108.
3. Morales-Roura JS, Zarco L, Hernández-Cerón J, Rodríguez G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at

repeat-breeding cows on d 3 and a second injection on d 17 did not improve the conception rate⁽²⁴⁾.

It has been suggested^(3,4) that another way by which bST may favor embryo survival is by improving the corpus luteum function. *In vitro*, IGF-1 increased the progesterone production of luteal tissue⁽²⁵⁾. In addition, cows treated with bST had higher concentrations of progesterone⁽¹⁴⁾. However in the present work, treatment with bST did not increase ($P=0.68$) progesterone blood concentrations (Figure 2), thus our results suggest a bST effect through a mechanism independent of the stimulation of the corpus luteum function.

It was concluded that a single injection of bST at the time of insemination increases the conception rate in repeat-breeding Holstein cows.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the support of the farmers in the complex agriculture industry of Tizayuca, Hidalgo (CAITSA). This study was supported by PAPIIT (IN205296), Universidad Nacional Autónoma de México.

End of english version

estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. Theriogenology 2001;55:1831-1841.

4. Moreira F, Risco CA, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, Thatcher WW. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. J Dairy Sci 2000;83:1237-1247.
5. Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. J Dairy Sci 2001;84:1646-1659.
6. Santos JEP, Juchem SO, Cerri RLA, Galvão KN, Chebel RC, Thatcher WW, Dei CS, Bilby CR. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. J Dairy Sci 2004;87:868-881.

VACAS HOLSTEIN REPETIDORAS TRATADAS CON SOMATOTROPINA BOVINA AL MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN

7. Bell A, Rodríguez OA, De Castro e Paula LA, Padua MB, Hernández-Cerón J, Gutiérrez CG, De Vries A, Hansen PJ. Pregnancy success of lactating Holstein cows after a single administration of a sustained-release formulation of recombinant bovine somatotropin. *BMC Vet Res* 2008;4:22.
8. Rodríguez COA, Díaz BR, Ortiz GO, Gutiérrez CG, Montaldo H, García C, Hernández CJ. Porcentaje de concepción al primer servicio en vacas Holstein tratadas con hormona del crecimiento bovina en la inseminación. *Vet Méx* 2009;40:1-7.
9. Almeida AP. Early embryonic mortality in "repeat-breeder" cows. *Ars Vet* 1995;11:18-34.
10. Watson AJ, Hogan A, Hahnel A, Weimer KE, Schultz GA. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the pre-implantation bovine embryo. *Mol Reprod Dev* 1992;31:87-95.
11. Izadyar F, Van Tol HTA, Hage WG, Bevers MM. Pre-implantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during *in vitro* development. *Mol Reprod Dev* 2000;57:247-255.
12. Moreira F, Bandinga L, Burnley C, Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 2002;57:1371-1387.
13. Moreira F, Paula-Lopes, FF, Hansen PJ, Bandinga L, Thatcher WW. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor on development of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 2002;57:895-907.
14. Gallo GF, Block E. Effects of recombinant bovine somatotropin on hypophyseal and ovarian functions of lactating dairy cows. *Can J Anim Sci* 1991;71:343-353.
15. Kerbler TL, Burh MM, Jordan LT, Leslie KE, Walton JS. Relationships between maternal plasma progesterone concentration and interferon tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 1997;47:703-714.
16. Mann GE, Lamming GE. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Domes Anim* 1999;34:269-274.
17. Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 2001;56:1451-1463.
18. Bilby TR, Sozzi A, Lopez MM, Silvestre FT, Ealy AD, Staples CR, Thatcher WW. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and growth hormone-insulin-like growth factor system responses. *J Dairy Sci* 2006;89:3360-3374.
19. León H, Hernández-Cerón J, Keisler D, Gutiérrez CG. Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J Anim Sci* 2004;82:445-451.
20. SAS. Statistical Analysis System. In: SAS/STAT user's guide. Release 6.03. Cary, NC, SAS Institute Inc. 1988.
21. Cohick WS, Plaut K, Sechen SJ, Bauman DE. Temporal pattern of insulin-like growth factor-I response to exogenous bovine somatotropin in lactating cows. *Domest Anim Endocrinol* 1989;6:263-274.
22. Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J Reprod Fertil* 1994;101:697-701.
23. Izadyar F, Van Tol HTA, Colenbrander B, Bevers MM. Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocyte is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol Reprod Dev* 1997;47:175-180.
24. Gutierrez CG, Aguilera I, Leon H, Rodríguez A, Hernández-Cerón J. The metabolic challenge of milk production and the toll it takes on fertility. *Cattle Practice* 2005;13:5-11.
25. Sauerwein H, Miyamoto A, Gunther J, Meyer HHD, Schams D. Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1992;96:103-115.