



Human Chorionic Gonadotropin and body condition in the *in vitro* maturation of oocytes from Creole cows for the preservation of livestock biodiversity

Gonadotropina Coriónica Humana y la condición corporal en la maduración *in vitro* de ovocitos de vacas criollas para la preservación de la biodiversidad ganadera

Zea-Gonzales Delmer¹ y Alva-Villavicencio Gizely²

<https://orcid.org/0000-0003-1188-799X>¹ y <https://orcid.org/0000-0002-8971-0302>²

¹ Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – dzea@unamba.edu.pe

² Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú – galva@unamba.edu.pe

(Recepción: 05/03/2023 - Aceptación 21/06/2023)

Abstract. The objective is to evaluate the *in vitro* maturation of oocytes supplemented with Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and the relationship with body condition in Creole cows in the preservation of livestock biodiversity. The body condition of Creole cows was evaluated at the Abancay slaughterhouse, and then the sampled ovaries were transported to the FMVZ-UNAMBA laboratory, and the oocytes were recovered by follicular aspiration, then quantified and classified, in categories -gorías A, B and C, were then matured *in vitro* in TCM-199 medium supplemented with 0, 5, 10 and 15 IU/mL of hCG. Oocyte maturation was evaluated according to degrees of expansion of the oocyte cluster. The body condition of the cow was measured on a scale from 1 to 5 that it is obese. hCG concentrations of 0, 5, 10, 15 IU/ml if there is an association with body condition (1.5, 2, 3) after oocyte maturation in a strong and moderately mature state. Cows with body condition 1.5, 2 and 3 have an average of 2.06, 2.47 and 2.74 oocytes per ovary respectively. Regarding the quality of the oocytes obtained from Creole cows in the present study, good quality was 21.48% (A), intermediate quality 43.49% (B), followed by rejected quality 35.03% (C). It is concluded that in order to have a greater number of matured oocytes, it is necessary to have a good body condition and high levels of hCG in the maturation media of the oocytes.

Keywords: Keywords. body condition, hCG, oocyte

Resumen. El objetivo es evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos suplementados con Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) y la relación con la condición corporal en vacas criollas en la preservación de la biodiversidad ganadera. Se evaluó la condición corporal de las vacas criollas en el matadero de Abancay, posteriormente se transportó los ovarios muestreados al laboratorio de FMVZ-UNAMBA, y se recuperó los ovocitos por aspiración folicular, después se cuantificó y clasificó en categorías A, B y C, seguidamente se maduraron *in vitro* en medio TCM-199 suplementados con 0, 5, 10 y 15 UI/mL de hCG. La maduración de ovocitos se evaluó de acuerdo a grados de expansión del cúmulo del ovocito. La condición corporal de la vaca fue medida en escala de 1 a 5. Se observó que existe una asociación entre la concentración de hCG de 0, 5, 10, 15 UI/ml con la condición corporal (1.5, 2, 3) de ovocitos fuerte y medianamente madurados. Las vacas con condición corporal 1.5, 2 y 3 tienen en promedio 2.06, 2.47 y 2.74 ovocitos por ovario respectivamente. En el presente estudio, la calidad de los ovocitos obtenidos de las vacas criollas fue: calidad buena 21.48% (A), calidad intermedia 43.49% (B), y calidad rechazada 35.03% (C). Se concluye que para conseguir mayor número de ovocitos madurados se tiene que tener buena condición corporal y niveles alto de hCG en los medios de maduración de los ovocitos.

Palabras Clave. condición corporal hCG, ovocito

1 Introducción

En los andes del sur del Perú, cuya altura mayor de 3800 msnm, la población de bovinos criollos predominan en relación a bovinos de razas especializadas, respecto a la producción de leche o carne, estos últimos enfrentan serias limitaciones para su sobrevivencia debido a muchos factores, entre ellos, la altitud (mal de altura), la precariedad de los

recursos alimenticios que restringen la expansión de sus verdaderas potencialidades bioproductivas (carne o leche). Sin embargo el bovino criollo, bajo la diversidad de condiciones ambientales de la crianza, se caracteriza por su rusticidad, sobriedad, multipropósito, facilidad de parto y alta capacidad maternal. Su baja productividad, está ocasionando su erosión genética, por cruza mal planificadas con razas exóticas. [1]. Los factores que contribuyen al proceso de maduración in vitro se han estudiado a lo largo de los años; en este sentido, el medio de maduración se complementa con hormonas o compuestos séricos. El primero se usa porque las gonadotropinas y algunas hormonas esteroides juegan un papel importante en el desarrollo folicular y la maduración de los ovocitos. La suplementación con suero también se usa rutinariamente en medios de maduración in vitro para proporcionar a los ovocitos una fuente de proteína y energía durante la maduración [2]. Por otro lado, la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) son ampliamente reconocidas por su papel en el apoyo a la ovulación y el embarazo temprano. Sin embargo, excepto por el tiempo de expresión, las diferencias entre LH y hCG se han ignorado en gran medida en el entorno clínico debido a sus estructuras moleculares similares y receptores compartidos. Gracias a los avances tecnológicos, incluido el desarrollo de gonadotropinas recombinantes altamente purificadas, los investigadores ahora se dan cuenta de que estas hormonas no son tan intercambiables como se pensaba anteriormente. A pesar de su unión a receptores comunes, la evidencia emergente sugiere que la LH y la hCG tienen efectos distintos en las cascadas de señalización. Una mejor comprensión de las diferencias esenciales entre la LH y la hCG facilitará un análisis de diagnóstico y pronóstico más eficiente [3].

Muchos de estos trabajos de investigación se ha hecho en animales cuyas condiciones ambientales no son similares a las nuestras, y sobre todo en ganado criollo de nuestra región. Se busca realizar investigación básica que permitan lograr la fecundación in vitro en óvulos de vaca criolla para su conservación en protocolos de fecundación in vitro. Para la preservación ex situ de ovocitos de bovinos criollos. Por las consideraciones antes mencionadas, se plantea la presente investigación con el objetivo de evaluar la maduración in vitro de ovocitos suplementados con Gonadotropina Coriónica Humana y la relación con condición corporal en vacas criollas en la preservación de la biodiversidad ganadera.

2 Método

2.1 Ovarios y ovocitos

Los ovarios fueron colectados de vacas criollas faenadas, en el matadero Municipal de Abancay. Estos ovarios fueron colocados en una bolsa de polietileno que contenía NaCl al 0.9%, suplementados con gentamicina 50 UI/L; las muestras fueron mantenidas entre 35 a 37 °C y transportados en una caja de tecnopor después de 2 a 3 horas al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron colocados en un vaso precipitado de 500 mL en NaCl mantenidos en baño María a 37 °C. Seguidamente, se realizó el lavado de los ovarios con solución salina de dos a tres veces. Se hizo la recuperación mediante la técnica de aspiración folicular de los ovocitos cuyos folículos aspirados con jeringa de 10 mL y aguja de 21 G eran de 2 a 8 mm de diámetro aproximadamente,. El contenido aspirado se colocó en tubos cónicos de plástico de 15 mL de capacidad, que estuvieron a 37°C. Luego se dejó decantar por 10 minutos, el cual con una micropipeta se sacó el sedimento y los ovocitos a una placa Petri estéril para su clasificación, los cuales fueron colocados en cinco gotas de 50 µL de fosfato buffer salino (PBS) sobre placas Petri mantenidas en platina térmica a 37 °C. La evaluación de los ovocitos se realizó, según características morfológicas de acuerdo a la descripción de Hawk & Wall, clasificando en tres tipos de ovocitos con la ayuda de un estereoscopio (Meiji, Japon) con platina térmica incorporada a 37°C (Minitube HT 50, Alemania); categoría A: calidad buena; categoría B: calidad intermedia; categoría C: rechazados. Los ovocitos de tipo A y B fueron seleccionados como aptos para la maduración con hCG.

2.2 Cultivo in vitro

Los ovocitos colectados fueron de (n=1704) y distribuidos para ser cultivados en 4 tratamientos de acuerdo a su condición corporal (1.5, 2 y 3): **Tratamiento 1** - Medio de maduración más 0 hCG UI/mL; **Tratamiento 2** - Medio de maduración más 5 hCG UI/mL; **Tratamiento 3** - Medio de maduración más 10 hCG UI/mL y **Tratamiento 4** - Medio de maduración más 15 hCG UI/mL. Los ovocitos aptos luego de la recuperación y evaluación fueron cultivados en grupos de 10 por gota y llevados a la maduración en una incubadora de CO₂ (MMM Group, Alemania) a 38 °C, 5% de CO₂, y 90% de humedad relativa por 24 h.

2.3 Evaluación nuclear del ovocito

Los ovocitos después de 24 horas de maduración fueron evaluados según la metodología de [4] y los seleccionados se transfirieron a viales de 0.5 mL con contenido de fosfato buffer salino (PBS), inmediatamente fueron vorteados a 2500 g por 5 minutos (Iso Lab Laborgerate GmbH), con la finalidad de retirar las capas de los cúmulos del ovocito para ser lavados. Posteriormente los ovocitos se colocaron en viales con contenido de solución fijadora compuesta por ácido acético / etanol (1: 3) por 48 h. La fijación de ovocitos se realizó según técnica descrita por [2], a continuación se realizó la tinción por capilaridad con una gota de Lacmoid al 2%. Los ovocitos se pipetearon y se colocaron sobre láminas portaobjetos (5 a 10 ovocitos), luego cubiertos con cubreobjetos que previamente fueron colocados en las esquinas con pegamento de barra. Luego de 10 a 20 min aproximadamente de la tinción se evaluó utilizando microscopio a 40x (ZEISS, Alemania). Las evaluaciones de los ovocitos fueron clasificados como vesícula germinal (VG), vesícula germinal rota (VGBD), metafase I (MI), metafase II (MII) y degenerados (D).

2.4 Condición corporal

Se utilizó la escala de evaluación de Ferguson, por medio de la observación de las vértebras desde la parte posterior del animal, el aspecto del hueso pélvico, aspecto lateral de la línea entre las caderas, aspecto posterior y lateral de la cavidad entre la cola y la tuberosidad isquiática utilizando una escala del 1 al 5 [5].

3 Resultados

En la evaluación de la maduración *in vitro* de ovocitos después de 24 horas y suplementados con 0, 5, 10 y 15 UI/mL de Gonadotropina Coriónica Humana y la condición corporal de 1.5, 2 y 3 en vacas criollas, se observó que existe asociación ($P < 0.05$), aplicando la prueba estadística de Chi Cuadrado de Pearson. De acuerdo a la tabla 1, mediante la técnica de aspiración folicular se obtuvo 1704 ovocitos estimándose un promedio de 2.25 ovocitos de 759 ovarios. También se observa que en las vacas con condición corporal 1.5 tuvo 890 ovocitos de 433 ovarios, lo que hace un promedio de 2.06 ovocitos/ovario. Las vacas de condición corporal 2 se obtuvo 729 ovocitos de 295 ovarios lo que hace que tenga un promedio de 2.47 ovocitos/ovario y finalmente las vacas de condición corporal 3 tienen 85 ovocitos de 31 ovarios lo que indica que en promedio tendrán 2.74 ovocitos/ovario.

Tabla 1. Número de ovocitos, calidad que fueron recuperados, según condición corporal

Con- dición corporal	Ovarios N	Ovocitos recuperados			por	Calidad (%)		
		Total	Por ovario	Viabiles ovario ¹		A	B	C
						Buena	Intermedia	Rechazada
1.5	433	890	2.06	1,36	23.37	42.58	34.05	
2	295	729	2,47	1,56	19.20	44.03	36.77	
3	31	85	2.74	1.90	21.18	48.24	30.58	
Total	759	1704	2.25	1.46	21.48	43.49	35.03	

¹ Ovocitos de categoría A y B considerados aptos para maduración *in vitro*

Respecto a la condición corporal 1.5 se obtuvo ovocitos de calidad buena (A) 23.37%, calidad intermedia (B) 42.58% y calidad rechazada (C) 34.05%. Respecto a la condición corporal 2 se obtuvo ovocitos de calidad buena (A) 19.20%, calidad intermedia (B) 44.03% y calidad rechazada (C) 36.77%. En los vacunos con condición corporal 3 se obtuvo ovocitos de calidad buena (A) 21.18%, calidad intermedia (B) 48.24% y calidad rechazada (C) 30.58%.

En Las concentraciones de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) de 0, 5, 10, 15 UI/ml existe asociación ($P < 0.05$) con la condiciones corporales (1.5 , 2, 3) en las vacas criollas luego de la maduración de ovocitos en estado fuertemente madurado más medianamente madurado hasta metafase II.

Tabla 2. Estadios de maduración (%) de acuerdo a la condición corporal y las concentraciones de hCG en ovocitos de vacas criollas.

CC	[] hCG UI/mL	VG	VGBD	MI	MII	D
1.5	0	11.11	22.22	33.33	27.78	5.56
	5	21.74	41.30	19.57	2.174	15.22
	10	4.88	56.10	19.51	14.63	4.88
	15	16.67	33.33	16.67	8.33	25.00
2	0	11.11	44.44	38.89	0	5.56
	5	0	55.60	22.20	7.41	14.80
	10	16.67	55.56	11.11	8.33	8.33
	15	40.63	34.38	15.63	9.38	40.63
3	0	0	0	100	0	0
	5	0	50	0	0	50
	10	100	0	0	0	0
	15	11.11	33.33	22.22	11.11	22.22

4 Discusiones y Conclusiones

4.1 Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos suplementados con hCG y la condición corporal en vacas criollas

En una investigación se demostró que la adición de gonadotropinas al medio de cultivo permite un mayor porcentaje de maduración nuclear que con los tratamientos 1 y 2 que no tenían gonadotropina, siendo el valor máximo de MII (72%) obtenido en 26 a 28 h de cultivo [6]. La tasa de maduración global en presencia de hCG y benzoato de estradiol fue del 79,1 %, y una proporción sustancial 68.8 % de ovocitos parcialmente cubiertos alcanzó el estadio de metafase II. En ausencia de hCG y benzoato de estradiol el porcentaje de ovocitos en metafase II fue mucho menor (48.60 %). También se observa que los ovocitos cultivados sin hormonas mostraron poca expansión del cúmulo, una característica de la maduración del ovocito.[7]

En otra investigación ha demostrado una mejora de las tasas de maduración in vitro de ovocitos porcinos con concentraciones crecientes de hCG [3]. La tasa de maduración de los ovocitos fue del 54.80% con hCG y del 55.90% con LH; en conclusión la hCG o la LH recombinantes son igualmente eficaces para promover la maduración de los ovocitos [8]

4.2 Cuantificación de los ovocitos recuperados por aspiración folicular de ovarios de vacas criollas de matadero

En una investigación se obtuvo un total de 1029 ovocitos recuperados de 212 ovarios de los cuales se obtuvo en promedio 4.85 ovocitos por ovario. A su vez el número de los ovocitos recuperados por ovario entre vacas criollas de condición corporal baja, moderada y alta fueron similares ($P > 0,05$) fue de 4.14, 4.88, 5.46 ovocitos por ovarios respectivamente. Se encontró mayor número de ovocitos viables por ovario aptos para maduración in vitro en vacas de condición corporal alta seguida de moderada y baja ($P < 0,05$). También encontraron mayor ($P < 0,05$) cantidad de ovocitos tipo A en vacas de condición corporal alta seguida de moderada y baja [9]

Se realizó la aspiración de ovocitos de vacas criollas en Apurímac encontrándose 4.26 ovocitos por ovario ($P > 0.05$), así como 2.08 ovocitos de calidad buena por ovario ($P > 0.05$) [10]. En otro trabajo de investigación se obtuvo un promedio de recuperación de 6.11 ovocitos por ovario, de los cuales el 26.13% fueron categoría A, el 21.72% categoría B, el 47.30% categoría C y el 4.85% categoría D [11].

También se hizo la toma de muestras en el matadero de Yerbateros en vacas criollas recién beneficiadas donde obtuvieron por aspiración folicular 1653 ovocitos de 166 ovarios, lo que produjo una cifra media de 10.26 folículos por ovario. En total se recuperaron 1,228 ovocitos, lo que equivale a 72.66 % respecto del número de folículos ováricos aspirados [12]. La mayoría de estas investigaciones indican que son superiores en número a los resultados encontrados en el presente trabajo, debido a que tienen diferentes procedencias, las estaciones del año son diversas, también la condición corporal de los animales y la nutrición. La menor cantidad de ovocitos de buena calidad por ovario, es posible que se deba a la baja calidad nutritiva de la dieta animal [13], ya que los animales en estudio proviene de zonas de pastoreo pobres en calidad nutritiva, cantidad y sobre pastoreo.

4.3 Calidad de ovocitos recuperados de ovarios de vacas criollas de acuerdo a la condición corporal.

Respecto a la condición corporal 1.5 se obtuvo calidad buena de ovocitos (A) 23.37%, calidad intermedia (B) 42.58% y calidad rechazada (C) 34.05%. Respecto a la condición corporal 2 se obtuvo calidad buena de ovocitos (A) 19.20%, calidad intermedia (B) 44.03% y calidad rechazada (C) 36.77%. Según Tinco [9], obtuvo los siguientes resultados calidad buena (A) 46,36%, calidad intermedia (B) 34.91% y calidad rechazada (C) 18.72%. Esta diferencia es por que los periodos de ejecución de los trabajos de investigación así como el número de animales beneficiados son diferentes.

En los vacunos con condición corporal 3 se obtuvo calidad buena de ovocitos (A) 21.18%, calidad intermedia (B) 48.24% y calidad rechazada (C) 30.58%. Según Tinco [9], obtuvo los siguientes resultados calidad buena (A) 59.50%, calidad intermedia (B) 31.74% y calidad rechazada (C) 8.76%. Con estos resultados claramente se puede ver que, tomó muestras de vacas criollas de condición corporal buenas en comparación de nuestro trabajo de investigación. Otros investigadores demostraron que el efecto del nivel de alimentación sobre la calidad de los ovocitos depende de la condición corporal del animal, siendo el alto nivel de alimentación beneficioso para los ovocitos de animales de baja condición corporal pero perjudicial para los ovocitos de animales de condición corporal moderadamente alta [14]

En otro trabajo de investigación recolectaron ovocitos de vacas de diferentes condiciones corporales faenados en un matadero encontrándose que en vacas en condición corporal alta, el 79% de sus ovocitos fueron de calidad, en contraste las vacas con condición corporal baja tuvieron bajo rendimiento en el número de ovocitos colectados, lo cual estuvo relacionado con el nivel de energía de la dieta [11].

4.4 Efecto de las concentraciones de hCG en la maduración *in vitro* en metafase II según condición corporal en vacas criollas

Respecto a la asociación en vacas de CC 3 y las concentraciones de hCG, se observa que hay asociación estadística entre las dos variables ($P < 0.05$), por lo tanto usar hCG para la maduración es recomendable en especial si las vacas tienen condición corporal favorable, en contraste los de CC 1.5 y 2 no presentaron maduración adecuada esto debido probablemente a la condición corporal que influye en la calidad del ovocito.

Este resultado es corroborado por Ruiz [12], donde permiten sugerir que el nivel de alimentación afecta a la calidad de los ovocitos, especialmente los del tipo A, debido a que las restricciones nutricionales, particularmente las del tipo energético, podrían afectar la actividad reproductiva, así como a la concentración de algunos metabolitos como es el caso de la glucosa, los cuales imprimen un efecto negativo sobre la actividad reproductiva [12]. De igual forma, las vacas con condición corporal alta que paren, son capaces de reiniciar su actividad reproductivas después del parto más eficientemente que aquellas vacas que paren con una baja reserva corporal. Es decir, las vacas alimentadas con alto nivel energético presentaron mayores números de ovocitos tipos A [13].

En conclusión las vacas con condición corporal 1.5 se obtuvo un promedio de 2.06 ovocitos/ovario. Las vacas con condición corporal 2 se obtuvo un promedio de 2.47 ovocitos/ovario y finalmente las vacas de condición corporal 3 se obtuvieron en promedio 2.74 ovocitos/ovario.

La calidad de los ovocitos obtenidos de las vacas criollas en el presente trabajo fue calidad buena 21.48% (A), calidad intermedia 43.49% (B), seguido de la calidad rechazada 35.03%(C).

Así mismo existe asociación entre las concentraciones de Gonadotropina Coriónica Humana de 0, 5, 10, 15 UI/mL con las condiciones corporales (1.5, 2, 3) en las vacas criollas luego de la maduración de ovocitos en estado fuertemente madurado, más medianamente madurado hasta metafase II, teniendo mayor efecto en la vacas de CC3.

5 Biografías

Delmer Zea Gonzales, Médico Veterinario y Zootecnista egresado de la Universidad Nacional del Altiplano, Magister becado por el CONCYTEC en Economía Agraria de la Universidad Agraria la Molina; en el ámbito laboral, Jefe de Práctica, luego Docente Auxiliar a tiempo completo y posteriormente Docente Asociado en la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac; pertenezco al Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; gané el “II Concurso de proyectos de investigación básica y aplicada para docentes con financiamiento de fondos de canon minero, 2018”, mi interés es incursionar en la fertilización, producción y transferencia in vitro de embriones en vacas.

6 Referencias

- [1] Y. N. Aquino *et al.*, “Variabilidad genética de bovinos criollos de Perú utilizando marcadores microsatélites”. *Archivos de Zootecnia*, 57(219), 337–340, 2008.
- [2] G. Lorenzo, “Maduración in vitro de oocitos de ganado vacuno”, tesis doctoral, Univ. Complutense de Madrid, 1992.
- [3] W. Sha *et al.*, Effect of gonadotropins on oocyte maturation in vitro: an animal model. *Fertility and Sterility*, 93(5), 1650–1661, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.003>
- [4] F. De Loos, T. Van Beneden y T.A.M. Kruip, “Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Mol Reprod Dev*, 31(3):208–, 1996. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080310308>
- [5] J.D. Ferguson *et al.*, Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. *J Dairy Sci* [Internet]. 77(9):2695–703, 1994 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77212-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77212-X)
- [6] S. Santos, *et al.*, “Cinética da maturação nuclear in vitro de oócitos bubalinos”. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39(5), 266–270, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962002000500009>
- [7] K.P. Xu, *et al.*, “Chronological Changes of Bovine Follicular Oocyte Maturation in Vitro”. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 27(4), 505–519, 1986. <https://doi.org/10.1186/BF03548130>
- [8] J. Hreinsson, *et al.*, Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in a clinical in-vitro maturation programme: A randomized study. *Human Reproduction*, 18(10), 2131–2136, 2003. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg422>
- [9] J.S. Tinco, U. Quispe y D. Zea “Asociación entre calidad de ovocitos recuperados y condición corporal en vacas criollas”. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 23(3), 133–138, 2021. <https://doi.org/10.18271/ria.2021.294>
- [10] O. Gómez, *et al.*, “Técnicas del slicing y aspiración folicular en la eficiencia de la recuperación de ovocitos bovinos criollos post-mortem en el camal”. *Spermova*, 2(1), 38–39, 2012.
- [11] G. Zárate. Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos. Tesis de Maestría Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz, Ver. Mexico, 2006
- [12] F. Delgado, “Maduración in vitro de ovocitos en metafase II de vacas post mortem a través de la técnica de fijación”. *Universidad Nacional Agraria La Molina*, 134. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3271>, 2019.
- [13] A. Z. Ruiz, *et al.*, “Efecto de la condición corporal y nivel de alimentación sobre la actividad ovárica, involución uterina y expresión del IGF-I en vacas mestizas durante el posparto”. *Interciencia*, 35(10), 752–758, 2010.
- [14] S. J. Adamiak, *et al.*, “Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle”. *Biology of Reproduction*, 73(5), 918–926, 2005. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041483>