



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACION PROLONGADA DE INSULINA
SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR Y LA TASA
OVULATORIA EN CABRAS**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A
DANIEL PADILLA MONTEÓN**

**TUTOR:
HECTOR VERA AVILA**

**COMITÉ TUTORAL:
HECTOR JIMENEZ SEVERIANO
ALEJANDRO VILLA GODOY**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres Ruben Padilla Lomeli, Martha Elena Monteón Hernández, a mis hermanos Belen Padilla Monteón, Ruben Arturo Padilla Monteon, Marcela Padilla Monteon, Juan Pedro Padilla Monteon, Alina Padilla Monteon, Rafael Padilla Monteon y tíos quienes me han apoyado a lo largo de mi formación y me han dado cariño y apoyo incondicional, muchas gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

Al INIFAP por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar el experimento que sirvió como tesis de maestría.

A mis padres, hermanos, tíos, primos por su apoyo total.

Al Dr. Héctor Vera Avila por su apoyo, paciencia y consejos valiosos durante mis estudios de maestría.

A los doctores Héctor Jiménez Severiano, Alejandro Villa Godoy y Eugenio Villagomez por brindarme su apoyo y cooperación.

A los doctores Andrés Ducoing, Jaime Gallegos, José Alfredo Medrano y Héctor Andrade por sus comentarios valiosos y oportunos para la mejoría de la tesis.

A Leticia Jiménez por ayudarme siempre, sobrepasando sus deberes y por su gran paciencia.

A mis amigos Vicente Castañeda, Mario Espinosa, Eliab Estrada, Gerardo Domínguez, Alejandro Castellanos, Miriam Plata, Adriana García, Denisse Montoya, Guadalupe Martín del Campo, por su ayuda invaluable durante estos años y el cariño que me profesaron.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

EFECTO DE LA ADMINISTRACION PROLONGADA DE INSULINA SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR Y LA TASA OVULATORIA EN CABRAS.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la exposición prolongada a insulina y en diferentes periodos de desarrollo folicular sobre las poblaciones foliculares y la tasa ovulatoria en cabras en ciclos estrales consecutivos. Se utilizaron 32 cabras criollas, que fueron divididas en 3 grupos, dos tratados con insulina de acción prolongada (glargina) cada 48 horas durante 60 días, dosis baja (DB n=9; 0.30 UI/kg) y dosis alta (DA n=11; 0.40 UI/kg) y uno testigo que no recibió tratamiento (T n=12). Se obtuvo el peso vivo de los animales (N= 32) al inicio del trabajo y posteriormente cada 15 días hasta el día 45. Asimismo se estimó la condición corporal (CC) al inicio y al día 45. A los 0, 20, 40 y 60 días de iniciados los tratamientos se determinaron las concentraciones promedio de glucosa, insulina y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) por ventana de muestreo. Se indujeron 6 ciclos estrales cortos consecutivos, se realizaron ultrasonografías transrectales (DB n=6, DA n=6 y T n=6) para determinar el número total de folículos antrales ≥ 2 mm y el diámetro de los folículos ováricos mayores. Se realizaron laparoscopias, para estimar la tasa de ovulación. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza para observaciones repetidas mediante el software JMP4. Se encontró efecto de tratamiento ($P < 0.05$) sobre las concentraciones promedio de glucosa, así mismo se encontró efecto ($P < 0.05$) de tratamiento y de tiempo sobre las concentraciones promedio de insulina. Las concentraciones promedio de IGF-I no fueron afectadas por el tratamiento ($P = 0.74$), pero sí por el periodo ($P = 0.0009$). La condición corporal y el peso vivo no fueron afectados por el tratamiento ($P > 0.50$), se observó efecto de periodo en el peso vivo ($P = 0.0001$). El número de ovulaciones por estro varió a través del periodo experimental (1.59, 1.63, 1.84, 1.88, 1.75, 1.69; $P = 0.07$) y la tasa ovulatoria fue similar entre grupos ($P = 0.87$). Se encontró efecto de tratamiento en el número total de folículos antrales iguales o mayores a 2 mm ($P = 0.04$). El diámetro de los folículos ováricos mayores no fue afectado por el tratamiento ($P = 0.76$) aunque sí por el periodo de evaluación ($P = 0.04$; 7.2 mm en el estro 5 vs 6.0 mm en los 4 primeros y el último). En base a los resultados se puede concluir que la hormona insulina tiene la capacidad de regular el desarrollo folicular en cabras criollas. Así mismo, la insulina afecta los estadios avanzados del desarrollo folicular y no las etapas tempranas de desarrollo folicular. Por otro lado, independientemente del estadio de desarrollo folicular al que los folículos son expuestos a la insulina esta no incrementa el número de ovulaciones.

Palabras clave: Función ovárica, tasa ovulatoria, insulina, cabras.

EFFECT OF PROLONGED INSULIN ADMINISTRATION ON FOLLICULAR DEVELOPMENT AND OVULATION RATE IN GOATS.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of prolonged insulin exposure and in different stages of follicular development on follicular populations and ovulation rate in goats in consecutive oestrus cycles. 32 creole goats were divided in three groups, two treated with long acting insulin (glargine) every 48 hours for 60 days, low dose (LD n= 9; 0.30 IU/ kg) and high dose (HD n= 11; 0.40 IU/kg) and a control group which received no treatment (C n=12). Body weight (Bw) was determined (N= 32) at the beginning and every 15 days until day 45 of the experiment, body condition score (BCS) was also established at the beginning and on day 45 of the study. The average glucose, insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) concentrations was determined at 0, 20, 40 and 60 days. Six short consecutive oestrus cycles were synchronized and transrectal ovarian ultrasonographic studies (LD n=6, HD n=6, C n=6) were performed to establish the total number of antral ovarian follicles ≥ 2 mm and the diameter of larger ovarian follicles. Ovulation rate was estimated through laparoscopies. Data were analyzed for repeated measures using JMP4 software. Glucose average concentrations was affected by treatment ($P < 0.05$) also insulin average concentration was affected by treatment and time ($P < 0.05$). IGF-I average concentrations were not affected by treatment ($P = 0.74$) but by time ($P = 0.0009$). BCS and Bw were not affected by treatment ($P > 0.50$) although weight was affected by time ($P = 0.0001$). Ovulation number varied throughout experimental period (1.59, 1.63, 1.84, 1.88, 1.75, 1.69; $P = 0.07$) and ovulation rate was similar between groups ($P = 0.87$). Insulin treatment affected total antral follicle number equal or larger than 2mm ($P = 0.04$). Diameter of larger ovarian follicles was not affected by treatment ($P = 0.76$) and there was a time effect ($P = 0.04$; 7.2 mm on fifth oestrus versus 6.0 mm in the other oestrus cycles) It is concluded that insulin hormone has the capability to regulate follicular development in creole goats. Insulin also affects advanced follicular development states and not the early follicular development states. On the other hand, independently development state which follicles are exposed to insulin it cannot increase ovulation rate.

Key words: Ovarian function, ovulation rate, insulin, goats.

CONTENIDO

Índice	Página
DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VI
I.INTRODUCCION.....	1
II.HIPOTESIS.....	4
III. OBJETIVO.....	4
IV. REVISION DE LITERATURA.....	5
4.1 Desarrollo folicular.....	5
4.1.1 Desarrollo folicular preantral.....	6
4.1.2 Desarrollo folicular antral.....	8
4.1.2.1 Control del desarrollo folicular.....	9
4.1.2.2 Etapas del desarrollo folicular antral.....	10
4.2 Dinámica folicular.....	14
4.3 Sistema insulina, IGF-1 en el ovario.....	16
4.3.1 Efectos de la insulina en el ovario.....	16
4.3.2 Efectos de IGF-1 en el ovario.....	20
4.4 Tasa de ovulación.....	22
4.4.1 Factores que afectan la tasa de ovulación.....	22
4.4.2 Genética.....	23
4.4.3 Nutrición.....	26
4.4.4 Edad y época del año.....	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
VI. RESULTADOS.....	37
VII. DISCUSION.....	45
VIII. CONCLUSIONES.....	55
IX. BIBLIOGRAFIA.....	56

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Composición de la dieta experimental (Base húmeda).....	31
Cuadro 2. Solución para disminuir adherencias.....	33
Cuadro 3. Tasa ovulatoria, peso y condición corporal promedio en cabras con o sin administración prolongada de insulina.....	37
Cuadro 4. Diámetro promedio de los folículos mayores y número total promedio de folículos antrales ≥ 2 mm en cabras con o sin administración prolongada de insulina.....	38
Cuadro 5. Concentraciones promedio de insulina, glucosa e IGF-I en cabras con o sin administración prolongada de insulina.....	42
Figura 1. Peso vivo promedio por periodo de evaluación (\pm error estándar) en cabras.....	39
Figura 2. Diámetro promedio de los folículos mayores (mm) por periodo de evaluación en cabras (\pm error estándar).....	40
Figura 3. Número promedio de folículos antrales ≥ 2 mm por periodo de evaluación en cabras (\pm error estándar).....	41
Figura 4. Concentraciones promedio de insulina por ventana de muestreo en cabras (\pm error estándar)	43
Figura 5. Concentraciones promedio de IGF-1 por ventana de muestreo en cabras (\pm error estándar)	44

I. INTRODUCCION

Uno de los factores que determinan la viabilidad de las empresas caprinas es el número de animales producidos, que es determinado por la fertilidad y prolificidad de sus hembras, entre otros factores; estos componentes de la eficiencia reproductiva dependen de la tasa ovulatoria, de la tasa de fertilización y de la retención embrionaria y fetal. Sin embargo en México en los últimos años se ha presentado un rezago en el aumento del número de caprinos, (Santos y Lucas, 2001) que contrasta con otras regiones del mundo, Asia, África, donde la población caprina ha ido en aumento (Boyazoglu *et al.*, 2005).

Para lograr una mayor productividad se han desarrollado varias estrategias las cuales buscan incrementar el número de cabritos nacidos por parto mediante un aumento en la tasa de ovulación, el cual se ha logrado de manera práctica utilizando tratamientos hormonales y manipulando la alimentación (Aguilar, 2006).

El estado nutricional es un factor importante que controla la fertilidad en el ganado mostrando efectos directos sobre la función ovárica (Armstrong *et al.*, 2002). En ese sentido el aumento en el aporte energético de la dieta en periodos breves antes y durante el empadre (*flushing*), mejora la prolificidad de los pequeños rumiantes, en las cabras se observa buena respuesta, al aumentar significativamente el número de partos dobles o triples (Santos y Lucas, 2001; Rodríguez-Castillo *et al.*, 2004), de igual forma en ovejas las poblaciones foliculares son muy sensibles al aporte nutricional puesto que la foliculogenesis y la tasa de ovulación pueden ser incrementadas por la manipulación nutricional (Scaramuzzi *et al.*, 2006).

El mecanismo por el cual el *flushing* estimula la función ovárica no se conoce del todo, sin embargo los estudios no han revelado una relación consistente entre el estado nutricional/perfiles metabólicos y la secreción de gonadotropinas en el ganado (Gong, 2002; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004). Existe evidencia de que las hormonas metabólicas como la hormona del crecimiento (GH), insulina, leptina y el factor de crecimiento parecido a la

insulina (IGF-I) tienen papeles importantes en el control del desarrollo folicular ovárico y son mediadores de los efectos del consumo alimentario (Robinson, 1996, Diskin *et al.*, 2003, Suguna *et al.*, 2009).

Las concentraciones de insulina e IGF-I aumentan después de una suplementación alimenticia corta (Viñoles *et al.*, 2005) adicionalmente se ha reportado que el ovario es un sitio de acción de la insulina e IGF-I en varias especies (Sarath *et al.*, 2008) por lo que esta hormona podría ser un factor clave en la mediación de los efectos de la ingesta alimentaria sobre la función ovárica (Armstrong *et al.*, 2002).

La insulina ha sido implicada en procesos relacionados a la reproducción aparte de su acción regulatoria sobre las concentraciones circulantes de glucosa, tiene un papel importante en el desarrollo y función folicular (Sarath *et al.*, 2008). La insulina estimula la proliferación de las células de la granulosa, la producción de progesterona, aumenta la esteroidogénesis de las células lúteas, (Spicer y Echterkamp, 1995) incrementa la respuesta a las gonadotropinas y disminuye la atresia folicular (Viñoles *et al.*, 2005).

Varios estudios evidencian la acción regulatoria de la insulina en la función folicular en diferentes etapas del desarrollo folicular. Kezele *et al.* (2002) reportaron que en cultivos de ovarios de rata, la insulina promueve la transición de folículo primordial a folículo primario, así mismo Itoh *et al.*, (2002) reportaron que en cultivos de folículos preantrales bovinos, concentraciones fisiológicas de insulina estimularon el crecimiento del folículo, del ovocito y la producción de estradiol. La insulina estimula la producción de estradiol en las células de la granulosa, adicionalmente el estradiol secretado por el folículo también estimula la secreción de insulina del páncreas, estos datos indican que la insulina plasmática y el estradiol de los folículos interactúan positivamente uno con otro durante el desarrollo del folículo dominante (Kawashima *et al.*, 2007).

La insulina también puede tener un efecto positivo sobre la tasa de ovulación, el mecanismo por el cual lo realiza puede ser por un mayor reclutamiento de folículos y por la disminución de la atresia folicular, por

consecuencia aportando un mayor número de folículos. En cerdas se han realizado estudios, en los cuales se ha observado que la aplicación de insulina durante el desarrollo folicular aumenta la tasa ovulatoria (Cox *et al.*, 1987). De igual manera Ramírez *et al.* (1997) encontraron que la aplicación de insulina durante los primeros cuatro días post-destete, incremento el tamaño de la camada al siguiente parto.

En contraste diversos estudios en relación a la respuesta del ovario a la administración de insulina en pequeños rumiantes aportan información menos consistente; en ovejas se han empleado inyecciones de insulina para medir los efectos de esta sobre la fertilidad y prolificidad, Kirkwood *et al.* (1991), administraron insulina durante 3 días consecutivos, pero no logro estimular la función reproductiva.

Por otro lado, Sarath *et al.* (2008) aplicaron insulina en cabras acíclicas por 5 días consecutivos, los resultados indicaron un efecto favorable de la insulina sobre la función ovárica, mejora en el desarrollo folicular, la esteroidogénesis e inducción de estro en cabras acíclicas. En otro estudio similar en cabras cíclicas, Suguna *et al.* (2009) administraron insulina por 3 días consecutivos a partir del día 7 del ciclo estral, los resultados mostraron efectos positivos en la función ovárica, aumento de la tasa de ovulación, la esteroidogénesis y el porcentaje de partos dobles.

Los estudios que han probado los efectos de la insulina exógena sobre la tasa de ovulación en diferentes especies arrojan resultados contrastantes, probablemente debido a que estos estudios utilizaron protocolos con periodos breves de tiempo de administración de insulina que pueden estar asociados a una exposición de los folículos ováricos en estadios avanzados de desarrollo al estímulo de la hormona. Por lo que el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la exposición prolongada a insulina y en diferentes estadios de desarrollo folicular sobre las poblaciones foliculares y la tasa ovulatoria en cabras en ciclos estrales consecutivos.

II. HIPOTESIS

La exposición prolongada a insulina y en diferentes estadios de desarrollo folicular tiene un efecto positivo y diferente sobre las poblaciones foliculares y la tasa ovulatoria en cabras, que se expresa en mayor grado conforme avanza el tiempo de exposición.

III. OBJETIVO

Determinar el efecto de la exposición prolongada a insulina y en diferentes periodos de desarrollo folicular sobre las poblaciones foliculares y la tasa ovulatoria en cabras en ciclos estrales consecutivos.

IV. REVISION DE LITERATURA.

4.1 Desarrollo folicular.

El desarrollo folicular comienza cuando los folículos dejan el grupo de folículos en reposo e inician un proceso de crecimiento, división celular y diferenciación celular que termina en la ovulación (Bradley y Voorhis, 1999); un folículo es la unidad funcional del ovario y está formado por ambas, células germinales y células endocrinas (Ariyaratna y Gunawardana, 1997), el folículo sirve para proteger y alimentar al ovocito desde la formación del mismo hasta la ovulación (Britt et al., 2004).

Cuando un folículo entra al grupo de crecimiento será conducido a uno de dos hechos, la degeneración por atresia sufrida por el 99 % o más de los folículos o la ovulación alcanzada por muy pocos de ellos (Murphy y Pescador, 1997; Webb et al., 2004).

En borregas se han realizado estudios, los cuales indican que desde la activación de un folículo primordial hasta que este llega al estado preovulatorio transcurre un tiempo de aproximadamente 4 a 6 meses (Cahill y Mauleon, 1981; Hunter et al., 2004), 45 de ellos corresponden al desarrollo posterior a la aparición del antro folicular (Turnbull et al., 1977).

Durante el desarrollo embrionario el ovario está provisionado con un número finito de células germinales. Las células germinales primordiales se originan en tejidos extraembrionarios, en el saco vitelino, migran entre la quinta y sexta semana hacia las crestas gonadales, en humanos, estas células germinales premeioticas se denominan oogonias, las oogonias proliferan por mitosis y no se asocian con células somáticas (Bradley y Voorhis, 1999; Skinner, 2005), posteriormente las oogonias dejan el ciclo mitótico y comienzan la meiosis, quedando detenidas en la profase de la primera división meiotica. Los ovocitos en esta etapa se nombran ovocitos primarios y permanecen detenidos en la profase de la primera división meiotica durante el desarrollo folicular hasta el tiempo de la ovulación. Después en el desarrollo fetal en humano y vaca y postnatal temprano en el roedor, el

folículo primordial se forma. En los animales domésticos los folículos se forman en un periodo mayor de tiempo que en los roedores y en forma menos sincronizada, ya que algunos folículos comienzan a dejar la etapa de reposo, mientras que otros aun están siendo formados (Fortune, 2003), el folículo primordial consiste en un ovocito y generalmente una capa incompleta de células de la pregranulosa escamosas (Bradley y Voorhis, 1999; Skinner, 2005).

El número de folículos que comprende el grupo primordial varía de miles en el ratón a cientos de miles en animales de granja y humanos. Estos folículos primordiales habitan en un ambiente celular estromal-intersticial sin capas de células de la teca aparentes o tejido mesenquimal organizado rodeando los folículos (Hurk *et al.*, 1997; Skinner, 2005).

El desarrollo folicular, se puede dividir en dos etapas para su estudio; una etapa que es independiente de gonadotropinas (Preantral) y otra que es dependiente de gonadotropinas (Antral) (Erickson y Shimasaki, 2001).

4.1.1 Desarrollo folicular preantral.

El crecimiento folicular temprano se refiere al desarrollo de un folículo ovárico desde la fase primordial hasta la formación del antro. Se sabe que las etapas más tempranas de desarrollo, incluyendo la transición de folículo primordial a primario, son independientes de gonadotropinas y son reguladas principalmente por factores intraovaricos (McNatty *et al.*, 1999).

Aunque las gonadotropinas no son un requisito para el crecimiento de los folículos preantrales, estas pueden estimular la tasa de desarrollo de los folículos preantrales en especies monovulatorias grandes con periodo de desarrollo folicular preantral prolongado y estas acciones están moduladas por factores de crecimiento local (Campbell *et al.*, 2004; Campbell, 2009).

Los factores intraovarios, sus receptores y receptores para gonadotropinas se expresan durante el crecimiento folicular temprano de forma específica en células y etapas del desarrollo (McNatty *et al.*, 1999). Estos factores de crecimiento producidos localmente incluyen a factor C-Kit, Factor de crecimiento epidermal, (EGF) Factor de crecimiento fibroblástico (FGF), folistatina, miembros de la superfamilia TGF- β , con al menos 35 miembros, los cuales han sido clasificados en diversas subfamilias, como la subfamilia TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), una extensa subfamilia de Proteína Morfogénica Ósea (BMP, con cerca de 20 miembros), la subfamilia Factor de crecimiento diferenciante (GDF, al menos 9 miembros), la subfamilia activina/inhibina, la subfamilia Factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) así como otros miembros adicionales como la hormona antimülleriana (AMH), (Elvin *et al.*, 1999; Knight y Glister, 2006). Además de hormonas metabólicas como la insulina y factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I).

Durante la etapa de crecimiento preantral, el ovocito crece rápidamente y casi alcanza su volumen máximo cuando se observa la primera acumulación de fluido dentro de la granulosa. La primera activación de la iniciación del crecimiento no ha sido caracterizada y puede provenir del ovocito o de las células circundantes (Smits y Cortvrindt, 2002).

Un factor que se relaciona con la activación de los folículos primordiales es el ligando Kit (también llamado factor de crecimiento troncal). El ligando Kit (KL) es un factor de crecimiento con formas solubles y unidas a la membrana producido por las células de la granulosa, mientras que las células germinales primordiales, los ovocitos y las células de la teca expresan el receptor para ligando Kit, C-Kit (Fortune *et al.*, 2000; Skinner, 2005). La interacción de C-Kit y ligando Kit parece ser uno de los reguladores clave del inicio del crecimiento de los folículos primordiales y la transición más allá de la etapa primaria (Parrot y Skinner, 1999; Driancourt *et al.*, 2000; Silva *et al.*,

2006), KL actúa en el ovocito lo estimula a crecer y a iniciar el desarrollo (Skinner, 2005).

Uno de los eventos iniciales en el desarrollo del folículo primordial (transición primordial a primario) es un cambio en la morfología de las células de la granulosa de escamosas a cuboidales. Esta transición resulta en un ovocito con diámetro aumentado y una capa de células granulosas cuboidales al que se le llama folículo primario (Skinner, 2005). La transformación de los folículos primordiales a primarios y el subsecuente crecimiento puede ocurrir en cualquier etapa de la vida de la vaca, desde los 7 meses de gestación en adelante, a través de la pubertad, durante la gestación hasta el fin del periodo reproductivo (Hurk *et al.*, 1997).

La etapa secundaria inicia con el desarrollo de una segunda capa de células de la granulosa (GC), (Fortune, 2003) la proliferación de las GC resulta en un ovocito rodeado por varias capas de células de la granulosa, convirtiéndolo en folículo secundario (Bradley y Voorhis, 1999). Durante la etapa temprana de desarrollo del folículo secundario, fibras de tejido conectivo se sitúan paralelas a la membrana basal debajo de la granulosa para formar la capa de la teca. Mientras tanto una cobertura glicoproteica, la zona pelucida, se forma entre el ovocito y la capa más cercana de las células de granulosa. Al final de esta etapa células epiteliales grandes productoras de hormonas y una red capilar forman la teca (Hurk *et al.*, 1997) y termina con el desarrollo gradual de una cavidad antral (Fortune, 2003).

4.1.2 Desarrollo folicular antral.

Las gonadotropinas no están involucradas en el inicio del desarrollo folicular, mas aun en las etapas tempranas del desarrollo folicular las gonadotropinas no son un requisito definitivo para el desarrollo folicular. Sin embargo, las etapas finales de desarrollo folicular son dependientes de las gonadotropinas LH y FSH (Hunter *et al.*, 2004).

4.1.2.1 Control del desarrollo folicular.

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un neuropeptido hipotalámico que controla la función del eje reproductivo. Es un péptido de 10 aminoácidos que es sintetizado como parte de un precursor más grande, que después es enzimáticamente reducido para remover una péptido señal del N-terminal y el péptido asociado a GnRH (GAP) del C-terminal (Cone *et al.*, 2003). La GnRH es sintetizada y almacenada en las neuronas GnRH, ubicadas en el hipotálamo medio basal y el área preoptica. La neurosecreción de GnRH es intermitente, consiste en pulsos de secreción que ocurren regularmente a intervalos de 20 minutos o más dependiendo de la especie y circunstancias fisiológicas. GnRH es liberada a través de los nervios terminales localizados en la eminencia media, entra a la circulación hipofisaria portal y llega a los gonadotropos en la pituitaria anterior, donde estimula la síntesis y secreción de gonadotropinas (Levine, 2003; Jeong y Kaiser, 2006). La sensibilidad de los gonadotropos, aparte de las concentraciones y patrón de liberación pulsátil de GnRH también está controlada por las concentraciones de esteroides ováricos y péptidos en la circulación periférica a través de mecanismos de retroalimentación endocrinos (Campbell, 2009).

La LH y FSH son dos glicoproteínas heterodiméricas unidas con unión no covalente que consisten de una subunidad alfa común y una subunidad beta específica de hormona. LH y FSH ejercen sus efectos en las células somáticas ováricas a través de receptores específicos unidos a la membrana, que muestran patrones alternos de expresión.

Los receptores de FSH se expresan exclusivamente en las células de la granulosa desde las etapas primarias hasta la preovulatoria del desarrollo folicular. De forma similar los receptores de LH primero se desarrollan en las células de la teca interna en la etapa terciaria de desarrollo hasta la preovulatoria, además las células de la granulosa de los folículos antrales

estrogenicos grandes también desarrollan receptores de LH (Campbell, 2009).

Las gonadotropinas secretadas son almacenadas en gránulos secretorios dentro del citoplasma, y son secretadas diferencialmente por exocitosis. La secreción de FSH no tiene un carácter pulsátil y generalmente no coincide con la de LH. Durante el ciclo estral ovino, los patrones de secreción de LH y FSH son diferentes, con un aumento en la frecuencia pulsátil de LH de uno por hora en el proestro, mientras que hay una disminución coincidente de FSH debido al aumento de estradiol e inhibina. Hay una gran depleción de LH después de la oleada preovulatoria por lo que la liberación de LH es una vía regulada por la acción de GnRH, mientras que la liberación de FSH es más una vía constitutiva, en la cual la síntesis es seguida de una liberación en lugar de un almacenaje (Roche, 1996).

Las gonadotropinas tienen funciones vitales para el desarrollo folicular, la FSH juega un papel fundamental en el crecimiento y diferenciación del folículo dominante a través de su habilidad de promover la formación del fluido folicular, proliferación celular, producción de estradiol y la expresión del receptor de LH (Erickson y Shimasaki, 2001; Hillier, 2001).

La hormona luteinizante participa en la regulación ovárica y testicular, juega un papel crítico en la maduración folicular, en la ovulación, en el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo, e interviene en la modificación de la síntesis de las hormonas esteroides, factores de crecimiento y citocinas (Perera-Marín *et al.*, 2007).

4.1.2.2 Etapas del desarrollo folicular antral.

En tanto el folículo continúa con su desarrollo y crecimiento, se comienzan a formar pequeñas cavidades llenas de fluido o lagunas entre las células de la granulosa (Bradley y Voorhis, 1999). A partir de este punto el folículo se denomina terciario, es decir cavitario o antral, en razón de la aparición de las pequeñas cavidades resultantes de la acumulación de un trasudado plasmático y de la secreción de las células de la granulosa, las cavidades

terminan por confluir y formar el antro (Hanzen *et al.*, 2000). La formación del antro ocurre alrededor de la misma talla folicular en la rata, vaca y humano (0.2-0.4 mm de diámetro folicular) (Fortune, 1994). El desarrollo progresivo del antro, provoca la separación de las células de la granulosa en células del cumulus, que se diferencian en corona radiada, en esta etapa y en todos los mamíferos el folículo se rodea de la teca interna formada de células intersticiales ricas en RNA y enzimas necesarias para la esteroidogenesis y por la teca externa formada de tejido conectivo del estroma ovárico (Hanzen *et al.*, 2000).

El folículo maduro o folículo de Graaf representa la fase terminal del desarrollo folicular, éste se caracteriza por una talla máxima de 10 mm en la oveja y 25 mm en la vaca, un número máximo de células de la granulosa y una actividad mitótica mínima (Hanzen *et al.*, 2000), pero con una alta expresión de aromatasa en las células de la granulosa, altas concentraciones de estradiol en el líquido folicular y la inducción de receptores de LH en las células de la granulosa (Hunter *et al.*, 2004), lleno de líquido, el folículo aflora sobre la superficie del ovario. Las tecas internas y externas están bien diferenciadas y la membrana basal es muy visible entre las células foliculares y la teca interna. La actividad mitótica se detiene progresivamente para ceder lugar a una diferenciación celular más importante, en la oveja el índice mitótico es 4 veces menor en los folículos de 1.1 mm que para aquellos de 0.4 o de 3.5 mm (Hanzen *et al.*, 2000).

Existen 4 etapas en el desarrollo folicular antral: reclutamiento, selección, dominancia y atresia.

Reclutamiento:

Las últimas etapas de desarrollo folicular antral están caracterizadas por 2 o 3 ondas de crecimiento folicular durante cada ciclo estral en los bovinos. El patrón de onda en el desarrollo folicular se refiere al crecimiento periódico y sincronizado de un grupo de folículos antrales. Cada onda de crecimiento está caracterizada por el reclutamiento de un grupo de folículos, que

continúan creciendo hasta aproximadamente 6 o 8 mm de diámetro (Adams, 1999; Webb *et al.*, 2004).

El reclutamiento folicular frecuentemente es utilizado como sinónimo de emergencia, pero es más correctamente definido como el crecimiento de los folículos que se han vuelto dependientes de gonadotropinas. Esto sucede cuando los folículos tienen de 4-6 mm de diámetro en las vacas y 2-4 mm en la borrega (Evans, 2003a). El reclutamiento no es un fenómeno aleatorio o aislado, por el contrario, los folículos son reclutados como grupos o cohortes (Fortune, 1994), (Cohorte: grupo de folículos en crecimiento cercanamente sincronizados) (Ireland *et al.*, 2000).

El reclutamiento de varios folículos es imputable a la hormona FSH ya que cada onda de desarrollo folicular está precedida por un aumento en la FSH (Fortune, 1994; Adams, 1999; Drion *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2004).

La selección es el proceso por el cual de entre el número de folículos en crecimiento, solo llegan al estadio preovulatorio, un número específico a la cuota ovulatoria de la especie o raza (Hanzen *et al.*, 2000; Ireland *et al.*, 2000) La selección del folículo dominante se da de 36 a 48 horas posteriores al reclutamiento (Drion *et al.*, 2000), es alrededor de la etapa de selección folicular que las células de la granulosa adquieren también receptores para LH (Hunter *et al.*, 2004). En ovejas los folículos comienzan a presentar receptor de LH, cuando presentan una talla de aproximadamente 3.5 mm de diámetro (Campbell *et al.*, 2003). El primer folículo que adquiere receptores a LH, se convierte en folículo dominante, ya que sus células de la granulosa son capaces de responder a ambas hormonas FSH y LH. La fase de selección se caracteriza por una disminución en la concentración de FSH y de un aumento progresivo en la síntesis de estradiol, resultado de un aumento en la frecuencia de pulsos de LH. La disminución progresiva en las concentraciones de FSH es debida a la retroalimentación negativa del estrógeno e inhibina, sobre la secreción de gonadotropinas, provocada por el

aumento progresivo en las concentraciones de estradiol (Drion *et al.*, 2000; Zeleznik, 2004).

Aunque el proceso de selección folicular está bajo regulación sistémica por FSH y LH también puede existir regulación local por factores que modulan la acción de las gonadotropinas. Cambios intrafoliculares en el estradiol y el sistema IGF, pueden explicar la mayor respuesta a la FSH por el futuro folículo dominante que por los folículos subordinados (Beg *et al.*, 2002). El incremento en la Proteína-A plasmática asociada a la preñez (PAPP-A), producida por las células de la granulosa, es un cambio temprano en el futuro folículo dominante, Fortune (2004) sugiere que el pequeño aumento en FSH que inicia la oleada folicular aumenta la PAPP-A, esta degrada al IGFBP-4 y -5, causando una disminución en sus niveles y un incremento en el IGF libre, el cual sinergiza con FSH para aumentar la producción de estradiol folicular. La producción de estrógeno suprime la secreción de FSH, por debajo del nivel necesario para mantener el desarrollo de los folículos menos maduros, los cuales sufren atresia (Zeleznik, 2004).

La dominancia es el proceso por el cual el folículo dominante pasa por un rápido desarrollo mientras que el crecimiento de los folículos subordinados se suprime (Armstrong y Webb, 1997; Evans, 2003). La dominancia folicular es ejercida por el folículo más grande presente en uno u otro ovario, el folículo dominante excede el tamaño de los demás folículos dentro de una misma oleada de crecimiento, éste tiene un diámetro superior de 2 mm a los demás folículos (Drion *et al.*, 2000, Ireland *et al.*, 2000). La etapa de dominancia se caracteriza por una elevada síntesis de estrógenos, esta producción conlleva una cooperación de las células de la teca y las células de la granulosa, y la intervención de las gonadotropinas LH, que induce la formación de andrógenos por la teca interna y FSH que induce la aromatización de los andrógenos a estrógenos en la células de la granulosa (Drion *et al.*, 2000).

La retroalimentación negativa ocasionada por estradiol e inhibina del folículo dominante, causa una disminución en los niveles de FSH, por debajo de los requerimientos de crecimiento de los folículos subordinados (Fortune, 1994; Ginther *et al.*, 2000). El fin del periodo de dominancia del folículo esta precedido por su pérdida de la capacidad para suprimir el efecto de la FSH, producir estrógenos y la pérdida de receptores de LH y FSH. Este periodo coincide con la emergencia de una nueva oleada de crecimiento folicular (Drion *et al.*, 2000).

La atresia o involución folicular constituye el futuro de la mayoría de los folículos (99.9 %) presentes en los ovarios de mamíferos (Hanzen *et al.*, 2000) esta es causada por apoptosis o muerte celular programada y puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo folicular, aunque un hallazgo consistente en varias especies, indica que la mayoría de la atresia ocurre justo antes de las etapas finales del desarrollo, en los folículos antrales tempranos (bovinos, roedores) (Bradley y Voorhis, 1999), aproximadamente durante la octava o novena generación de multiplicación de células de la granulosa.

La atresia se acompaña de un aumento en las concentraciones de enzimas lisosomales, de glicosaminoglicanos, altas concentraciones de inhibina, activina o proteínas ligadoras de IGF, además de una disminución en las concentraciones de estradiol; las células de la granulosa desaparecen progresivamente, el cumulus se disocia y el ovocito degenera (Fortune, 1994; Roche, 1996; Hanzen *et al.*, 2000).

4.2 Dinámica folicular.

La cabra domestica (*Capra hircus*) es una especie de la familia Bovidae. La cabra es poliestrica estacional. La duración de la temporada de apareamiento varía con la duración del día, raza y nutrición. Esta estacionalidad es regida por el fotoperiodo; la actividad estrual comienza durante la época de duración decreciente del día. En latitudes templadas la

mayor parte de las razas de cabras son anovulatorias y anestruales durante primavera y verano, pero comienzan el ciclo cuando la duración del día disminuye en otoño (Jainuden y Hafez, 1996).

Los pequeños rumiantes muestran un crecimiento folicular con un patrón similar a oleadas, (Ginther y Kot, 1994). El ciclo estral ovino presenta un rango de 2 a 5 ondas foliculares en cada ciclo interovulatorio pero el patrón predominante es de 3 ondas que emergen respectivamente alrededor de los días 0, 6 y 11 (Rubianes, 2000), mientras que en la cabra Simoes *et al.* (2006) mencionan que existen de 3 a 5 oleadas por ciclo, Tenorio *et al.* (2007) mencionan de 3 a 4, y de Castro *et al.* (1999) mencionan de 2 a 4 siendo lo más común 3 olas por ciclo. En los ciclos con 4 olas, la primera oleada emerge en el día 1 o 2, la segunda en el 2 a 5, la tercera del 6-9, la cuarta de los días 10 a 15 (Ginther y Kot, 1994).

Algunas de las características más frecuentemente observadas en las ondas foliculares son: 1) Los folículos más grandes de las olas 2 y 3 alcanzan menor tamaño en el diámetro máximo que los folículos más grandes de la ola 1 y ovulatoria; 2) Dos o más folículos por ola alcanzan 5 mm o mas de diámetro; 3) La mayoría de los folículos ovulatorios son los folículos más largos en el día de la luteolisis; 4) En la mayoría de las cabras con dos ovulaciones, los folículos emergen como parte de una misma ola folicular pero en pocos casos también como parte de otras oleadas; 5) Las ovulaciones dobles ocurren en el mismo día en la mayoría de los ciclos (Rubianes y Menchaca, 2003).

La media entre estros e interovulaciones es similar (20.6 ± 1.0 días y 20.7 ± 1.0 días). El espacio entre estros tiende a ser mayor en hembras multíparas (21.0 ± 0.7 días) que en hembras nulíparas (20.4 ± 1.1 días) (Simoes *et al.*, 2006). El intervalo entre el inicio del estro y la ovulación es de 1.4 ± 0.2 días (Castro *et al.*, 1997). En promedio la duración del estro comprende un periodo de 20.7 ± 0.7 horas en animales con 4 olas de desarrollo folicular

(Tenorio *et al.*, 2007), mientras que Camp *et al.* (1983) reporta un promedio de 2.8 días para la raza Nubia.

La mayoría de los folículos preovulatorios surgen del grupo de folículos presentes en el ovario entre los días 17 a 19 del ciclo estral (Cueto *et al.*, 2006). Sin embargo los folículos ovulatorios pueden derivarse de la penúltima y última oleada, lo que lleva a la introducción del concepto de codominancia para tratar de explicar la presencia de dos o más folículos grandes en cada oleada de desarrollo folicular (Gibbons *et al.*, 1999).

4.3 Sistema insulina, IGF-1 en el ovario.

El desarrollo folicular es un proceso complejo que involucra proliferación y diferenciación de los constituyentes foliculares (Giudice, 1992). Diversos estudios han revelado la importancia de las hormonas metabólicas como leptina, insulina, hormona del crecimiento e IGF-I en la regulación del desarrollo folicular.

4.3.1 Efectos de la insulina en el ovario

La insulina es una hormona peptídica, producida por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas, tiene un papel muy importante en la regulación del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas (Poretsky *et al.*, 1999) además de que también es reconocida como una señal del estado energético en el sistema nervioso central (Butler *et al.*, 2004). Los órganos blanco clásicos para la insulina son: el hígado, el tejido adiposo y el músculo (Pessin *et al.*, 1999). La insulina primero es sintetizada como preproinsulina, que contiene 110 aminoácidos, posteriormente es convertida a proinsulina; la proinsulina es homologa a el IGF-I y II y se puede unir al receptor de la insulina con 10 % de afinidad, la proinsulina es cortada por endopeptidasas y se produce la insulina.

El receptor de la insulina es un heterotetramero glicoproteico que posee dos subunidades α y dos β , las subunidades α , son estructuras extracelulares, tienen dominios de cisteína que sirven de sitios de unión para la insulina. Las subunidades β tienen dominios extracelulares, transmembranales e intracelulares. Después de que la insulina se une a las subunidades α , las subunidades β se autofosforilan en residuos específicos de tirosina e impulsan la actividad intrínseca de tirosina cinasa, iniciando una cascada intracelular de fosforilación de proteínas (Wang *et al.*, 1996). Al parecer la vía de tirosina cinasa es el principal mecanismo de señalización del receptor de insulina. Aunque una vía alterna de señalización para el receptor de insulina ya ha sido descrita, esta involucra la generación de inositolglicanos como segundos mensajeros en la membrana celular después de la unión de la insulina a las subunidades α del receptor, pero independientemente de la activación de la tirosina cinasa de la subunidad β .

Esta vía alterna podría intervenir en algunos de los efectos de la insulina, incluyendo la estimulación de esteroidogénesis ovárica. En ambos modelos humanos y animales, los receptores de insulina están ampliamente distribuidos a lo largo de los tejidos ováricos; células de la granulosa, de la teca el estroma (Poretsky *et al.*, 1999).

Numerosas acciones de la insulina se han demostrado en el ovario *in vitro* e *in vivo* sin grandes diferencias entre el humano y otras especies (Poretsky *et al.*, 1999). La insulina está presente en la circulación, así como en el líquido folicular y tiene la habilidad de regular ambas la mitogénesis y la esteroidogénesis (Spicer *et al.*, 2002). *In vitro* la insulina estimula la esteroidogénesis ovárica en células de la granulosa y células de la teca, aumentando la producción de andrógenos estrógenos y progesterona (Poretsky *et al.*, 1999, Kawashima *et al.*, 2007), la insulina potencializa la respuesta esteroidogénica de las gonadotropinas en células de la granulosa *in vivo* e *in vitro*, este efecto puede ser mediado por el aumento del número

de receptores de LH (Poretsky *et al.*, 1999) y FSH (Gutiérrez *et al.*, 1997a), ya que en complicidad con FSH mejora la capacidad de unión a LH en el ovario. También aumenta el RNA de la enzima P450 scc en células de la granulosa porcinas (Poretsky *et al.*, 1999) y en células de la granulosa humanas aumenta las proteínas y expresión del RNA m de la proteína *STAR* (Devoto *et al.*, 1999).

La adición de insulina a cultivos de células de granulosa porcinas induce efectos tróficos y cambios diferenciativos caracterizados por alteración de la morfología celular y tasas aumentadas de biosíntesis de hormonas esteroideas (Morley *et al.*, 1989) así mismo, en células de la granulosa de bovinos y equinos la adición de insulina aumenta el número de células (Gutiérrez *et al.*, 1997a, Davidson *et al.*, 2002).

Es probable que el efecto de la insulina en células de la granulosa *in vitro* sea el resultado de múltiples acciones. La insulina puede ejercer un efecto de mantenimiento mejorando las capacidades metabólicas generales de las células, permitiéndoles sobrevivir y funcionar en el cultivo. La insulina puede provocar un efecto retardado; en la inducción de receptores y la esteroidogénesis que pueden ser el resultado de una capacidad aumentada de las células de sintetizar proteínas específicas, una tasa reducida de degradación de proteínas, o en el caso de la esteroidogénesis, una actividad enzimática acrecentada (May y Schomberg, 1981).

Otros estudios indican que la insulina puede tener efectos indirectos sobre el desarrollo folicular, actuando en el hipotálamo, ya que se han localizado receptores de insulina en el núcleo arcuato y en el hipotálamo medio basal (regiones del cerebro que contienen neuronas GnRH) en la rata (Butler *et al.*, 2004). De igual manera la insulina puede actuar en la glándula pituitaria para incrementar la sensibilidad de los gonadotropos a GnRH (Poretsky *et al.*, 1999), por otro lado estudios *in vitro* indican que la insulina puede estimular la liberación de GnRH (Butler *et al.*, 2004) por lo que se sugiere que las

neuronas GnRH pueden ser directamente moduladas por la insulina (Salvi *et al.*, 2006).

Además de participar directa o indirectamente en la regulación de la esteroidogénesis y el número de receptores de insulina en el ovario, la insulina también podría afectar la expresión ovárica de receptores de IGF-I, esto podría ampliar los efectos de IGF-I en la esteroidogénesis y el desarrollo folicular. El aumento de estos receptores también podría amplificar los efectos de IGF-II. El aumento en los receptores de IGF-I por la insulina puede que incremente los efectos de la misma en estados de resistencia a la insulina, en los cuales las concentraciones de la hormona son muy altas y los receptores de insulina están bloqueados o genéticamente defectuosos. Bajo estas circunstancias la insulina puede actuar uniéndose principalmente a los receptores IGF-I. Así la habilidad de la hiperinsulinemia de estimular los receptores IGF-I puede contribuir al crecimiento del ovario y a la estimulación de la esteroidogénesis por IGF-I, IGF-II e insulina (Poretsky *et al.*, 1999).

Niveles elevados de insulina e IGF-I en la sangre pueden estimular la función reproductiva en vaquillas y vacas (Spicer *et al.*, 2002). Las concentraciones circulantes de insulina exhiben una variación diurna, pero también cambian durante el ciclo estral con aumento considerable en la concentración durante el periodo preovulatorio (Webb *et al.*, 2004). Adicionalmente el estradiol secretado por un folículo también aumenta la secreción de insulina en el páncreas. Esto indica que la insulina en el plasma y el estradiol de los folículos interactúan positivamente uno con otro durante el desarrollo del folículo dominante. El incremento del nivel de insulina circulante por modificación de la alimentación resulta en una primera ovulación adelantada en vacas postparto. Por lo tanto los niveles plasmáticos de insulina se relacionan estrechamente al crecimiento folicular y la ovulación por una regulación en la secreción de LH (Kawashima *et al.*, 2007).

4.3.2 Efecto de IGF-I en el ovario.

El IGF-I, es un polipeptido de 70 aminoácidos, comparte una secuencia homologa al IGF-II, proinsulina y relaxina (Poretsky *et al.*, 1999). El IGF-I era conocido anteriormente como somatomedina c e identificada como mediador de los efectos de la hormona del crecimiento. Los IGFs están involucrados en muchos procesos biológicos, estos incluyen el crecimiento pre y postnatal, la lactación, la reproducción y la función inmunológica (McGuire *et al.*, 1992). La principal fuente de IGF-I circulante es el hígado, sin embargo no solo se produce en el hígado, también se sintetiza en muchos otros tejidos, en órganos reproductivos de hembras no gestantes como el ovario, el oviducto y el útero (Nonaka *et al.*, 2003), dentro del ovario las células de la granulosa son el principal sitio de síntesis en roedores (Adashi, 1998).

El sistema IGF está compuesto de diferentes elementos:

Dos ligandos IGF-I e IGF-II.

Dos receptores; el receptor tipo I media la mayoría de las acciones tipo somatomedina de ambos ligandos, la afinidad de este receptor al de IGF-I es ligeramente superior al de IGF-II. El receptor tipo II no se une a insulina, y se une a IGF-I con poca afinidad. Una función importante de este receptor es regular el movimiento de las enzimas lisosomales.

Seis proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) las cuales se unen a IGF-I e IGF-II con gran afinidad, están presentes en todos los fluidos biológicos y disminuyen la biodisponibilidad de los IGFs, pueden ser clasificados en 2 grupos:

IGFBP-1, -2, -4, -5 y -6. En suero, sus niveles son regulados negativamente por (IGFBP-1 y -2) o no afectados por la hormona del crecimiento (GH).

IGFBP-3, la cual es la forma más predominante de IGFBP en el suero, su concentración es regulada positivamente por GH e IGF-I (Monget *et al.*, 2002).

El receptor de IGF-I es un heterotetramero con 2 subunidades α y dos subunidades β y es altamente homólogo con el receptor de la insulina, las regiones de cisteína de las subunidades α de la insulina y del IGF-I son 67 % homólogas, mientras que los dominios de tirosina cinasa de las subunidades β , son 84% homólogos, además el receptor de IGF-I se puede unir a la IGF-II y la insulina aunque con menor afinidad. La vía de señalización de IGF-I es por medio de la tirosina cinasa al igual que en la insulina (Poretsky *et al.*, 1999).

Los IGFs influyen una gran variedad de procesos biosintéticos en células de la granulosa y de la teca. Evidencia de estudios *in vitro* indica que el IGF-I en concentraciones fisiológicas estimula la mitogénesis y esteroidogénesis de las células de la granulosa en la mayoría de las especies estudiadas (Spicer y Echterkamp, 1995). El ovario de la rata es un sitio de acción de IGF-I, este actúa en mayor parte al nivel de las células de la granulosa amplificando la acción hormonal de las gonadotropinas (Adashi, 1998).

El sistema autocrino paracrino intraovarico de IGFs regula el desarrollo folicular y la esteroidogénesis solo o en sinergia con las gonadotropinas.

En porcinos el IGF-I estimula la mitosis celular y la diferenciación celular. En células de la granulosa, estimula la producción de pregnenolona, progesterona, en sinergia con FSH estimula la producción de progesterona aumentando la actividad de la enzima citocromo PSCC y su expresión génica (Giudice, 1992). En ovinos estimula la proliferación de las células de la granulosa en folículos pequeños y en folículos más grandes a producir progesterona, un efecto mediado a través del receptor IGF-I. En la vaca el IGF-I estimula la proliferación de células de la teca y de la granulosa así como la esteroidogénesis (Poretsky *et al.*, 1999).

El IGF-I también aumenta el metabolismo de las lipoproteínas de alta y baja densidad (unión, internalización y degradación), (Giudice, 1992) así mismo el IGF-I tiene la habilidad de aumentar la sobrevivencia en varios tipos

celulares, el efecto de IGF-I de proteger las células de la apoptosis está asociado con su habilidad de estimular la progresión del ciclo celular (Quirk *et al.*, 2004).

Aparte de realizar sus funciones a través de sus propios receptores el IGF-I, en ciertos casos puede también actuar vía receptores de insulina aunque esta interacción es de menor afinidad que la de insulina por su propio receptor, bajo ciertas circunstancias, el receptor de la insulina podría regular algunos de los efectos biológicos de los IGFs (Walters *et al.*, 2006).

4.4 Tasa de ovulación.

La tasa de ovulación se puede definir como el número promedio de óvulos liberados en un grupo de hembras en un determinado tiempo. La tasa de ovulación puede ser un determinante importante de la eficiencia reproductiva. Los procesos de reclutamiento y selección que llevan al desarrollo de un número de folículos ovulatorios son específicos para especies y razas (Hunter *et al.*, 2004).

Las cabras, como las ovejas son poliovulatorias (Roberts y Reeves, 1988). En estudios realizados en borregas, se ha determinado que la prolificidad muestra una relación directa con la tasa de ovulación lo que indica que las razas que tienen una mayor tasa de ovulación también tienen una prolificidad mayor (Aguilar, 2006).

4.4.1 Factores que afectan la tasa de ovulación.

El número de óvulos liberados varía ampliamente dentro y entre especies mamíferas, la cantidad de folículos que maduran está fuertemente regulada para asegurar una fertilidad óptima y mayor sobrevivencia de la progenie (Grant *et al.*, 2001). Las causas subyacentes de la variación pueden ser genéticas, ambientales (Scaramuzzi y Radfort, 1983; Mata *et al.*, 1997) como

época del año, nutrición, y otras inherentes al animal como la edad y número de parto.

4.4.2 Genética.

Durante las pasadas dos décadas se han descubierto varios genes responsables de la ocurrencia de altas tasas de ovulación en las borregas, por tal motivo se presentara información concerniente a esta especie sobre los mecanismos genéticos del control de la tasa de ovulación.

El crecimiento folicular y la tasa de ovulación están influenciados por la dosis de BMP15 y GDF9 liberados del ovocito a las células somáticas de los folículos en mamíferos (Hunter *et al.*, 2004). En la borrega así como en otras especies, el BMP15 y GDF9B (también conocido como factor de crecimiento y diferenciación 9B; GDF9B) solo se expresa en el ovocito. Los BMPs actúan a través de receptores en los ovocitos y en las células de la granulosa y se ha demostrado que incrementan la secreción de estradiol e inhibina en las células de la granulosa *in vitro* y pueden actuar aumentando las acciones de FSH (Evans, 2003).

Estudios genéticos en ovejas que muestran una fertilidad anormal han revelado que estas portan mutaciones en los genes relacionados a los BMPs (Shimasaki *et al.*, 2004). Las borregas que son heterocigóticas para la mutación en el gen BMP15 tienen alta tasa de ovulación y las que son homocigóticas son infértiles, por otro lado las borregas que tienen una mutación en el receptor BMP también tienen altas tasas de ovulación (Evans, 2003).

Las razas ovinas con altas tasas de ovulación se pueden dividir en dos grupos. El primer grupo refleja la acción individual de un gen (*FecB*) e incluye a razas como la Booroola, Huiyang y Small Tail Han (STH) (Hunter *et al.*, 2004, Hua *et al.*, 2009) y la inverdale con el gen (*FecXI*). En el segundo grupo, que incluye a razas como la Finnish Landrace y Romanov, la tasa de

ovulación refleja diferencias poligenicas con cada gen ejerciendo pequeños efectos (Hunter *et al.*, 2004).

El gen Booroola es una mutación autosomal, la cual tiene efectos aditivos sobre la tasa de ovulación. Los alelos se denominan $FecB^B$ para el alelo de alta prolificidad y $FecB^+$ para el tipo natural (Monget *et al.*, 2002), el alelo $FecB^B$ corresponde a una sola mutación en la secuencia que codifica al receptor BMP tipo 1B (BMPR-1B) (Fabre *et al.*, 2006). En ovejas sexualmente maduras, la característica más consistente reportada en hembras que poseen el alelo $FecB^B$ es que los folículos ováricos ovulan con un diámetro significativamente menor que los animales con el alelo $FecB^+$. Basada en la segregación de la tasa de ovulación en la raza merino, los genotipos en las borregas se clasifican en homocigoto no portador ($FecB^+/FecB^+$) con una tasa de ovulación de 1-2 y una talla en folículos ovulatorios de 7 mm, heterocigotos portadores ($FecB^B/FecB^+$) con una tasa de ovulación de 3-4 y una talla de folículos ovulatorios de 4-5 mm, y homocigóticos portadores ($FecB^B/FecB^B$) con más de 5 ovulaciones por ciclo y una talla de folículos ovulatorios de 3-4 mm (Bartlewski *et al.*, 1999; Monget *et al.*, 2002).

El locus $FecX$ se identifico en dos familias prolíficas de ovejas Romney, el rebaño inverdale ($FecXI$) y el Hannah ($FecX^{Hl}$), los cuales se localizan en el cromosoma X. La consecuencia de la presencia de uno de estos dos alelos en un estado heterocigótico es un aumento en la tasa de ovulación. En contraste con las borregas Booroola, las hembras homocigóticas son estériles, y tienen ovarios menos desarrollados con folículos que no avanzan más allá de la etapa de folículo primario (Montgomery *et al.*, 2001, Monget *et al.*, 2002). Estas razas presentan características comunes, como folículos más pequeños, reducción en la atresia folicular, menor número de células de la granulosa y menor producción estradiol (Evans, 2003), los folículos maduran a un diámetro menor, existe adquisición precoz de receptores de LH y una mayor actividad de la aromatasa (Hunter *et al.*, 2004).

En el segundo grupo, las razas Finnish Landrace y Romanov, la secreción de estradiol es mayor que en las razas de baja fertilidad, y las concentraciones

de FSH disminuyen más lentamente. Por lo que el intervalo entre la regresión lútea y la oleada de LH es mayor que en las razas menos prolíficas. Esto indica que la unidad hipotálamo pituitaria es relativamente insensible a la retroalimentación negativa y positiva del estradiol en estas razas.

La extensión en la duración de la fase folicular puede facilitar un mayor reclutamiento folicular y mantener más folículos preovulatorios antes de que comiencen a disminuir las concentraciones de FSH (Hunter *et al.*, 2004).

La tasa ovulatoria en cabras varía entre y dentro de las razas, en este sentido se reportan tasas de ovulación para la raza Angora de 1.15 (Greyling, 2000), para la raza Jakhrana de 1.33 (Goel y Agrawal, 2003), para la raza Teddy de 1.7 (Anwara y Ahmad, 1999), para las razas indígenas de Sudáfrica 1.7 (Webb y Mamabolo, 2004), para la raza Boer 1.7 (Greyling, 2000), para la raza Damasco 1.7 (Shalaby *et al.*, 2000), para la raza Alpina 1.69 (Silva *et al.*, 1998), 1.8, para la Saanen 1.8, para la Anglo-Nubia 2.1 (Jainudeen y Hafez), para la Nubia 1.1 (Martínez *et al.*, 2005), 1.77 (Mellado *et al.*, 1991) y 2.9 (Marai *et al.*, 2000). Mientras que para el genotipo criollo Martínez *et al.*, (2005) reportan 1.4 y 1.32 a 2.06. (Mellado, 1997). Por otro lado se puede observar que la adaptación al ambiente es un factor que influye en la prolificidad, así pues las razas que habitan en ambientes favorables tienen mayores ovulaciones y partos múltiples que las que habitan en ambientes adversos (Baird y Campbell, 1998).

La prolificidad de las cabras criollas varía de 1.32 a 2.06 cabritos por cabra parida en los meses de invierno, los empadres en los meses de baja actividad sexual en los meses de mayo-abril por otra parte conducen a una reducción en la prolificidad de las cabras criollas (Mellado, 1997).

|
|
|

4.4.2 Nutrición.

El estado nutricional es un factor importante que controla la fertilidad en el ganado mostrando efectos directos sobre la función ovárica (Armstrong *et al.*, 2002) por lo que el manejo nutricional, adecuado o deficiente, resulta determinante para el éxito reproductivo de los animales domésticos. Los cambios de peso inducidos por la nutrición pueden provocar cambios en la función folicular y la tasa de ovulación (Boukhliq *et al.*, 1996).

Generalmente, la ovulación y la tasa de preñez son reducidas en hembras con bajo nivel alimenticio (Fitz-Rodríguez *et al.*, 2009), Mani *et al.* (1992) reporta que un bajo nivel nutricional con una disminución en el peso y condición en cabras se acompaña de una reducción significativa en la tasa ovulatoria, la ocurrencia de partos múltiples y el porcentaje de hembras gestantes. Adicionalmente Mellado *et al.* (2006) reportan que pesos mayores a los 25 días de nacimiento propician una mejor actividad reproductiva en cabras, reflejada en un número superior de partos múltiples, por el contrario hembras con pesos menores a los 25 días post-nacimiento presentan tasas ovulatorias menores. Igualmente la tasa de ovulación es sensible al aporte nutricional en la borrega en su etapa adulta a los seis meses previos al apareamiento cuando los folículos ováricos emergen del grupo primordial y comienzan a crecer. La desnutrición en esta etapa reduce el número de folículos que emergen y por lo tanto el número de folículos disponibles para ovular (Robinson *et al.*, 2006).

Sin embargo en hembras con pobre nivel nutricional, la tasa de ovulación y la tasa de preñez se pueden aumentar al proporcionar una complementación alimenticia. En ese sentido, existe una práctica nutricional conocida; el *flushing*, que es el aumento en el aporte energético, proteico o ambos, de la dieta en periodos breves antes y durante el empadre. En el *flushing* existen dos efectos, el estático relacionado al estado corporal y el dinámico relacionado a la dieta, el cual es independiente del efecto del peso corporal (Pearse *et al.*, 1994).

Esta manipulación nutricional puede incrementar la foliculogénesis y la tasa de ovulación (Scaramuzzi *et al.*, 2006), en las cabras se observa buena respuesta, al aumentar significativamente el número de partos dobles o triples (Santos y Lucas, 2001, Rodríguez-Castillo *et al.*, 2004). Así mismo, siete días de suplementación alimenticia aumentan la ovulación y la tasa de preñez en cabras manejadas bajo condiciones de pastoreo y expuestas al efecto macho (Rodríguez *et al.*, 2009).

El mecanismo por el cual el *flushing* estimula la función ovárica no se conoce del todo, sin embargo los estudios no revelan una relación consistente entre el estado nutricional/perfiles metabólicos y la secreción de gonadotropinas en el ganado (Gutiérrez *et al.*, 1997b; Gong, 2002; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004). Las hormonas metabólicas, como la GH, insulina, leptina e IGF-I tienen papeles importantes en el control del desarrollo folicular ovárico (Pearse *et al.*, 1994; Robinson, 1996; Diskin *et al.*, 2003; Suguna *et al.*, 2009). Los efectos de la suplementación alimenticia de corto plazo podrían estar mediados por la glucosa e insulina actuando directamente a nivel ovárico (Viñoles *et al.*, 2005; Meza-Herrera *et al.*, 2008).

El sistema intrafolicular de insulina y glucosa es estimulado por los tratamientos nutricionales (Scaramuzzi *et al.*, 2006). Por ejemplo el efecto estimulador sobre la tasa de ovulación en borregas, suplementadas con grano de lupino aumenta la entrada de glucosa al ovario (Downing *et al.*, 1995a). Las concentraciones elevadas de glucosa estimulan la síntesis de insulina. Downing *et al.* (1995b) reportó un aumento en la tasa de ovulación y en las concentraciones de insulina al infundir glucosa por vía intravenosa. Los efectos reproductivos de la infusión de glucosa o la suplementación con lupino, son la inhibición de la secreción de estradiol de fase folicular y la estimulación de la foliculogénesis y la tasa ovulatoria. (Scaramuzzi *et al.*, 2006).

Las concentraciones periféricas de insulina son directamente proporcionales al nivel de consumo alimentario en los rumiantes (Schillo, 1992) así mismo las concentraciones de insulina e IGF-I aumentan después de una suplementación alimenticia corta (Viñoles *et al.*, 2005) adicionalmente se ha reportado que el ovario es un sitio de acción de la insulina e IGF-I en varias especies (Sarath *et al.*, 2008). Por el contrario la subnutrición reduce la respuesta del ovario a las gonadotropinas como resultado de concentraciones plasmáticas reducidas de IGF-I e insulina que conducen a una disminución del crecimiento folicular, así mismo concentraciones reducidas de IGF-I están asociadas con tasas ovulatorias reducidas (Hunter *et al.*, 2004).

Concentraciones elevadas de IGF-I podrían estimular la proliferación y la capacidad esteroidogénica de las células de la teca y granulosa, (Diskin *et al.*, 2003). El efecto del incremento nutricional sobre el sistema IGF en la borrega podría ser la reducción de las acciones foliculares de IGF-I; a través de los efectos intra-foliculares de IGF-II y las proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) se reduciría la biodisponibilidad de IGF-I en el folículo. Scaramuzzi *et al.* (2006) propone que la acción nutricional sobre el ovario es una inhibición directa de la secreción de estradiol folicular, por el sistema insulina-glucosa, leptina e IGF que promueve un incremento compensatorio en la secreción de FSH que estimula la foliculogénesis y restaura la homeostasis de la retroalimentación negativa.

Las evidencias indican que la glucosa, insulina e IGF-I son factores importantes en la regulación del desarrollo folicular y mediadores de los efectos del consumo alimentario sobre la tasa de ovulación en los animales domésticos.

4.4.3 Edad y época del año.

En ovejas y cabras la tasa de ovulación aumenta con la edad y alcanza un máximo a la edad de 3 a 6 años, y luego declina gradualmente (Jainudeen y Hafez, 1993). La fertilidad en ovejas jóvenes paridas en su primer año de

vida es menor que para las adultas; es común que el 20 % o más de las ovejas jóvenes apareadas fallen en producir un cordero (Hare y Bryant, 1985). Estudios realizados con cabras Alpine muestran que el tamaño de la camada fue menor (1.15) en el primer parto, pero para el segundo parto o posteriores fue mayor (1.89) (Silva *et al.*, 1998). Del mismo modo en cabras Teddy, la tasa de ovulación y el número de fetos aumenta con la edad (Anwara y Akmad, 1999). El aumento en la productividad con el número de pariciones indica una mejora en el comportamiento reproductivo mientras la cabra alcanza la madurez (Marai *et al.*, 2002).

La época del año en que las cabras y ovejas se aparean también afecta la tasa de ovulación. En general, los valores son más altos al principio de la temporada (Jainudeen y Hafez, 1993). Este efecto se ha demostrado en razas de ovinos en un amplio rango de condiciones ambientales y los resultados muestran que la tasa de ovulación es mayor al principio de la temporada natural de apareamiento, y declina progresivamente a finales del otoño e invierno para llegar al mínimo justo antes de la presentación del anestro (Scaramuzzi y Radfort, 1983).

En cabras criollas, los empadres en los meses de baja actividad sexual de abril-mayo conducen a una reducción en la prolificidad (Mellado, 1997).

V. MATERIALES Y METODOS

Ubicación.

El estudio se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal (CENIDFA-INIFAP), ubicadas en Ajuchitlán, Colón, Querétaro, a una altitud de 1990 msnm entre las coordenadas geográficas 20° 47' de latitud norte y 100° 03' de longitud oeste, con precipitación pluvial anual de 460-630 mm y una temperatura media de 17.4 ° C, (INEGI, 2000).

Animales.

Se utilizaron 32 cabras (27 multíparas y 5 nulíparas) criollas encastadas de Nubia, secas, vacías, dentro de estación reproductiva (noviembre de 2007 a enero de 2008). Los animales experimentales tuvieron un rango de peso vivo de 34 a 64 kg con promedio de 46.7 ± 7.5 kg y un rango de condición corporal de 2 a 3.75 con promedio de 3.02 ± 0.3 (escala 1 a 4; Honhold *et al.*, 1989). Su edad aproximada fue de 2 a 4 años. Las cabras permanecieron en estabulación y se alojaron en corrales con espacio y comederos suficientes así como bebedero con fuente permanente de agua. Los animales fueron alimentados 2 veces por día a las 8:00 AM y a las 3:00 PM. Se aumentó la cantidad de alimento proporcionado en dos ocasiones; la primera a los diez días con un incremento de 200 gramos, y la segunda el día 32 con 100 gramos de aumento, con el objetivo de ajustar el peso de los animales. La dieta utilizada fue estimada para cubrir con los requerimientos nutricionales. (Cuadro 1).

Tratamientos.

Los animales experimentales se dividieron en 3 grupos en forma aleatoria, un grupo testigo (T n= 12) el cual no recibió tratamiento y dos grupos tratados, uno con dosis baja (0.30 UI/kg, DB n=9) y el otro con dosis alta (=0.40 UI/kg, DA n=11) de insulina de acción prolongada (Insulina glargina, Lantus ®, Aventis Pharma, México). La aplicación de insulina se hizo por vía subcutánea cada 48 horas, 20 minutos antes del alimento de la mañana durante 60 días. Las dosis que se aplicaron se establecieron en base a resultados de pruebas piloto previas que tuvieron el objetivo de determinar las dosis e intervalos de tiempo más adecuadas de aplicación de insulina para evitar la presentación de hipoglicemia severa.

Cuadro 1. Composición de la dieta experimental (BH).

Ingrediente.	% en la ración.
Grano sorgo molido	32.9
Sorgo rastrojo	31.1
Heno de alfalfa	17.2
Pasta de soya	6.1
Melaza	11.8
Sal iodada	0.28
Minerales	0.64
PC	10.5
EM	2.1
Ca	.46
P	.22

BH (Base húmeda).

Diseño experimental

Se sincronizó el estro de las cabras con 2 aplicaciones de un análogo sintético de prostaglandina F2-alfa (PGF2 α ; 0.150 mg cloprostenol; Prosolvin C[®], Intervet, México) con intervalo de 11 días. El celo posterior a la segunda aplicación se consideró como el primer celo del periodo experimental. A partir de este celo se indujeron 6 ciclos estrales cortos consecutivos (duración aproximada 11 días) mediante aplicación de PGF2 α . Durante todo el periodo experimental se detectaron celos por observación 2 veces por día, una hora en la mañana y otra en la tarde, auxiliados con 3 machos epididimectomizados que adicionalmente contaron con arnés marcador y permanecieron todo el tiempo con las hembras. En la supervisión de la mañana se identificaban y registraban como hembras en celo a aquellas con marcas claras indicadoras de haber recibido monta.

Para determinar el número total de folículos ováricos antrales ≥ 2 mm y el diámetro del folículo mayor se realizaron estudios ultrasonográficos. Se utilizó un equipo Aloka SSD 500, con transductor rectal de 5 Mhz/64 mm (UST-657-5, Aloka Co., LTD, Tokyo, Japan). El estudio ultrasonográfico se realizó en un subgrupo de cabras seleccionadas al azar (n=6 por grupo de tratamiento), dentro de las primeras 12 horas después de presentar signos de estro. Las imágenes ultrasonográficas obtenidas fueron transferidas en papel (video impresora Sony, UP-870 MD) para analizarlas posteriormente.

En todas las cabras, entre los días 6-8 posteriores a la presentación de cada uno de los estros inducidos, se determinó la tasa de ovulación por conteo de los cuerpos lúteos mediante laparoscopia abdominal. Previo a la laparoscopia, los animales fueron restringidos de alimento y agua por 24 horas. Para efectuar la revisión laparoscópica los animales fueron anestesiados mediante inyecciones intravenosas de maleato de acepromacina (Calmivet[®] Vetoquinol, Mexico, 1 ml/ 10 kg) como tranquilizante y Ketamina (Anesket[®], PiSA, Mexico, .25 mg/kg/IV) como anestésico. El procedimiento realizado fue similar al descrito por Camp *et al.*

(1989). Se utilizó una cánula trocar de 6 mm de diámetro, endoscopio rígido de 5 mm de diámetro (Karl Storz, ® Alemania) el cual fue conectado a través de un cable de fibra óptica a una fuente de luz, (Maxillum 250-I, EUA), así como un bastón manipulador de 5 mm de diámetro con punta roma. Una vez anestesiadas, las cabras fueron colocadas en decúbito dorsal en una mesa quirúrgica, la cual se inclinaba a 45° de tal manera que la parte posterior del animal quedara elevada. Asimismo, la cavidad abdominal se insuflaba de aire utilizando una bomba de baja presión antes de insertar los trocares para introducción del endoscopio y del bastón de manipulación. Una vez realizado lo anterior se localizaban los ovarios, exteriorizándolos de la bursa ovárica mediante el bastón manipulador para proceder al conteo de cuerpos lúteos. Al término de cada revisión laparoscópica, se irrigaban los ovarios y tejido conjuntivo adyacente con aproximadamente 30 ml de una solución para disminuir adherencias y prevenir infecciones (Cuadro 2). Así mismo, se aplicaba un antimicrobiano (Emicina LA ®, Oxitetraciclina, Laboratorios Pfizer LTDA, Brasil, 1ml / 10 kg) por vía intramuscular para prevenir infecciones.

Cuadro 2. Solución para disminuir adherencias.

Ingrediente	Cantidad en la solución
Dexametasona	150 mg
Heparina	2500 UI
Penicilina	5 millones UI
Solución salina	500 ml

Muestreo sanguíneo y procesamiento de muestras.

En 6 animales de cada grupo de tratamiento se realizaron ventanas de muestreo sanguíneo a los 0, 20, 40 y 60 días del periodo experimental. En cada una de estas ventanas, se obtuvieron muestras de sangre (5 ml) por punción de la yugular mediante tubos vacutainer ® con 143 USP de heparina sódica, antes de la primera (AM1) y segunda comidas del día (PM1) y a la mañana de los siguientes 2 días (AM2 y AM3) en condiciones de ayuno (2 muestras con intervalo de 20 minutos en cada caso, excepto en la mañana

del 3er día cuando solo se obtuvo una muestra). Las muestras obtenidas se centrifugaron a 3500 g durante 15 minutos para separar el plasma, el cual se conservó a -20 °C hasta su análisis.

Determinación de hormonas y metabolitos.

En las muestras de sangre colectadas, en forma selectiva se determinaron las concentraciones de glucosa, insulina y factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I).

Las concentraciones de glucosa se determinaron directamente en sangre mediante un glucómetro portátil (One touch ultra II ®, Johnson & Johnson), en las muestras AM, PM1 y AM2. A partir de estos valores, se estimaron las concentraciones promedio de glucosa en ayuno para cada ventana de muestreo.

La determinación de las concentraciones de insulina, se realizó en plasma mediante radioinmunoanálisis de fase líquida el cual empleó un antisuero policlonal anti-insulina humana producido en cobayo; la sensibilidad del ensayo fue de 0.02 ng/ml y los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron 8.8 y 7.6 respectivamente, en las muestras PM1 y AM2. A partir de estos valores, se estimaron las concentraciones promedio de insulina en condiciones de ayuno y posteriores a la administración exógena de la hormona para cada ventana de muestreo. Las primeras muestras en cada ventana de muestreo (muestreo AM1), no fueron consideradas para la determinación de insulina, pues eran obtenidas inmediatamente antes de la administración exógena de la hormona (momento en que ya se habría perdido el efecto de la administración inmediata anterior).

La determinación de las concentraciones de IGF-I se realizó en plasma mediante radioinmunoanálisis con extracción (Coated-tube IRMA, DSL-5600 ACTIVE® Diagnostic Systems Laboratorios Inc.), en las primeras muestras de las 3 mañanas consecutivas dentro de cada ventana de muestreo (AM1, AM2 Y AM3). El promedio de la concentración de IGF-I en estas muestras se consideró como valor de ayuno para esta hormona. Los coeficientes de

variación intra- e inter-ensayo para control bajo fueron 0.25 y 4.28 respectivamente y para el control alto fueron 1.7 y 9.43.

Peso y condición corporal

Con el fin de ajustar las dosis de insulina y la cantidad de alimento suministrado, se obtuvieron los pesos de las cabras en condiciones de ayuno de alimento de 14 h al inicio del trabajo y posteriormente cada 15 días hasta el día 45. Asimismo, se evaluó la condición corporal (CC) de los animales (escala 1 a 4; Honhold *et al.*, 1991) al inicio y a los 45 días del periodo experimental.

Variables de respuesta

El día de presentación del estro:

 Diámetro de los folículos ováricos mayores (mm).

 Número total de folículos antrales ≥ 2 mm.

Seis a ocho días después del estro:

 Numero de cuerpos lúteos (como indicador de tasa de ovulación).

En condiciones de ayuno:

 Concentraciones promedio de glucosa (mg/dl).

 Concentraciones promedio de insulina (ng/ml).

 Concentraciones promedio de IGF-I (ng/dl).

Peso vivo (Kg) posterior a ayuno de 14 h.

Condición corporal.

Análisis estadístico.

Las variables de respuesta se analizaron por medio de un análisis de varianza para mediciones repetidas considerando al tratamiento de insulina como efecto entre unidades experimentales y al tiempo y sus interacciones como efecto dentro de unidades experimentales utilizando el software JMP4® (SAS Institute , 2002). En el caso del número de cuerpos lúteos como indicador de tasa ovulatoria los datos fueron transformados a raíz de y +0.5 para su análisis.

VI. RESULTADOS.

Tasa de ovulación, peso vivo y condición corporal.

La administración de insulina no tuvo efecto sobre la tasa de ovulación valorada a partir del número de cuerpos lúteos presentes en el ovario 7 días posteriores a la presentación de cada estro ($P=0.87$). El número de ovulaciones por estro varió a través del periodo experimental (1.59, 1.63, 1.84, 1.88, 1.75, 1.69; $P<0.07$) y no se observó una interacción entre tratamiento por periodo de evaluación ($P=0.23$) sobre esta variable. El número de ovulaciones mínimo y máximo por tratamiento durante el periodo de evaluación fue T= 1.4 y 1.8, DB= 1.6 y 1.9, DA =1.5 y 2,1. El peso vivo no fue afectado por la administración de insulina, ($P=0.84$). Se observó una reducción significativa del peso vivo en los días 15 y 45 del estudio ($P<0.001$, Figura1). La condición corporal entre los grupos de tratamiento fue similar ($P=0.80$; Cuadro 3). No se observó efecto de periodo ($P=0.66$) o interacción ($P=0.42$) tratamiento por periodo sobre condición corporal.

Cuadro 3. Tasa ovulatoria, peso y condición corporal promedio en cabras con o sin administración prolongada de insulina. (Medias mínimo cuadráticas \pm error estándar)

Tratamiento	n	Tasa de ovulación	Peso(Kg)	Condición corporal
Testigo	12	1.68 \pm 0.5	44.9 \pm 6.1	2.94 \pm 0.3
DB	9	1.75 \pm 0.4	46.6 \pm 5.8	3.17 \pm 0.3
DA	11	1.75 \pm 0.5	45.1 \pm 7.1	2.98 \pm 0.3

No se encontraron diferencias estadísticas entre grupos ($P > 0.05$).

Diámetro de los folículos mayores y número total de folículos antrales.

En este estudio se indujeron 6 ciclos estrales cortos con el objetivo de obtener un mayor número de eventos ovulatorios para evaluar durante el periodo experimental. En el primer ciclo estral inducido no se obtuvieron imágenes de calidad satisfactoria para su análisis, por lo que solo se tomaron en cuenta 5 observaciones de eventos ovulatorios. En el diámetro de los folículos mayores no se observaron diferencias estadísticas entre grupos ($P=0.76$; Cuadro 4). Se encontró efecto de tiempo ($P<0.05$) en el cual el diámetro del folículo mayor fue superior en el periodo 4 (Figura 2). No hubo interacción tratamiento por tiempo ($P=0.95$). Se observó efecto de tratamiento y de tiempo para el número total de folículos antrales. El grupo DA fue superior ($P<0.04$; Cuadro 4). En cuanto al efecto de tiempo los periodos 1 y 2 fueron superiores ($P<0.01$; Figura 3). No se observó interacción tratamiento por tiempo ($P=0.22$).

Cuadro 4. Diámetro promedio de los folículos mayores y número total promedio de folículos antrales ≥ 2 mm en cabras con o sin administración prolongada de insulina. (Medias mínimo cuadráticas \pm error estándar).

Tratamientos	n	Diámetro de los folículos mayores(mm)	Numero de folículos antrales totales ≥ 2 mm
T	6	6.13 \pm .48 ^a	9.7 \pm 1.07 ^a
DB	6	6.15 \pm .47 ^a	10.2 \pm 2.03 ^{ab}
DA	6	6.40 \pm .5 ^a	11.6 \pm 1.94 ^b

Diferente literal dentro de la misma columna indica diferencia significativa. ($P < 0.05$)

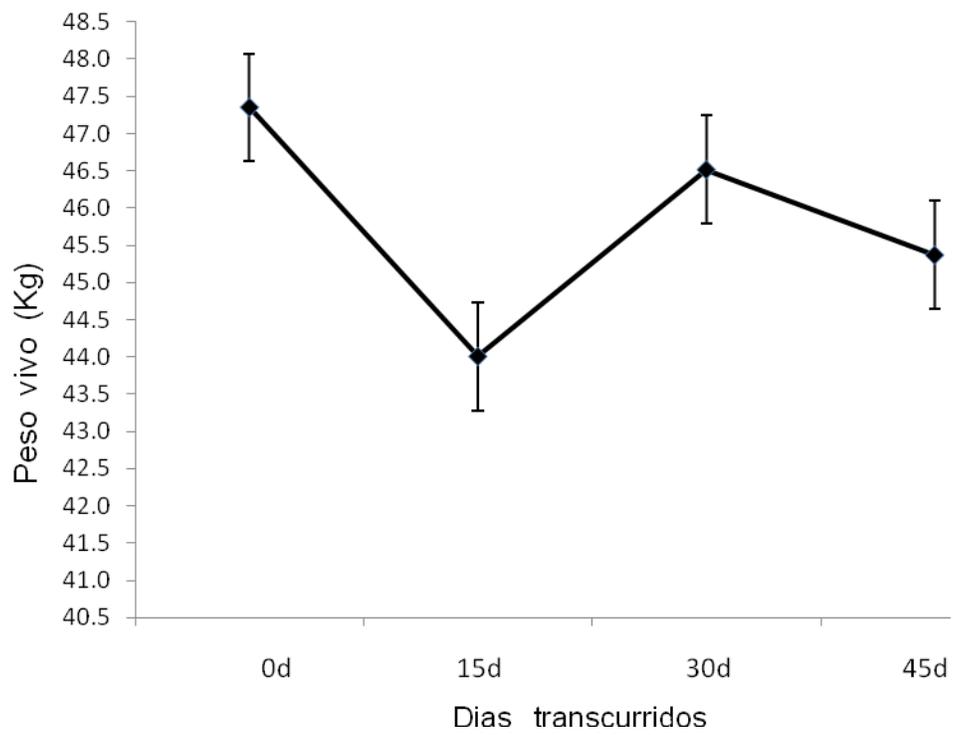


Figura 1. Peso vivo promedio por periodo de evaluación (\pm error estándar) en cabras.

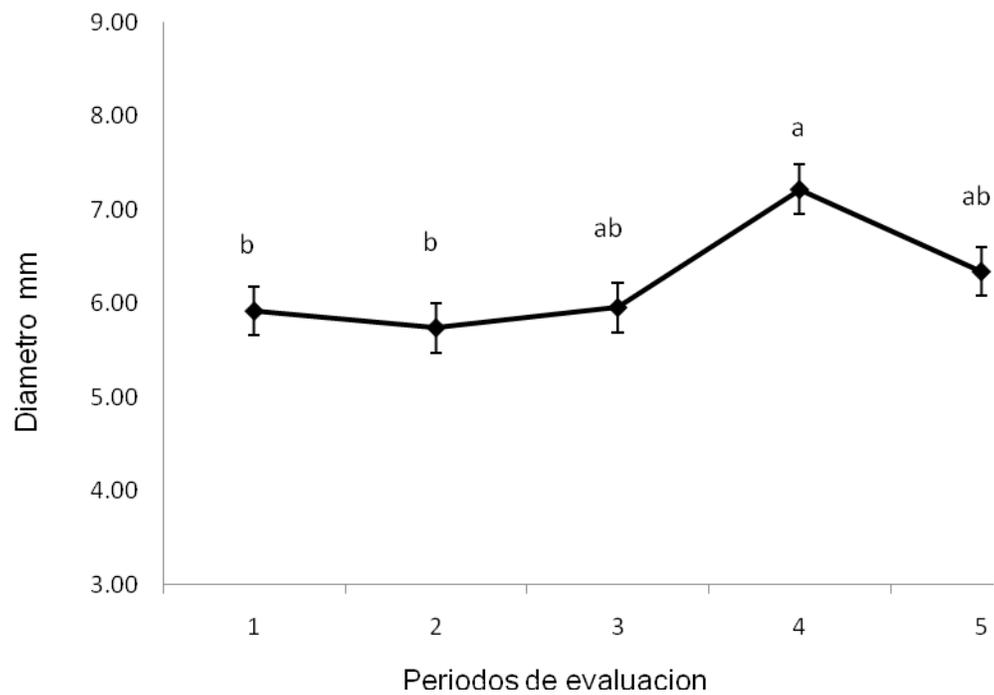


Figura 2. Diámetro promedio de los folículos mayores (mm) por periodo de evaluación en cabras (\pm error estándar). *Diferente literal Indica diferencia estadística entre tiempos. (P < 0.04).*

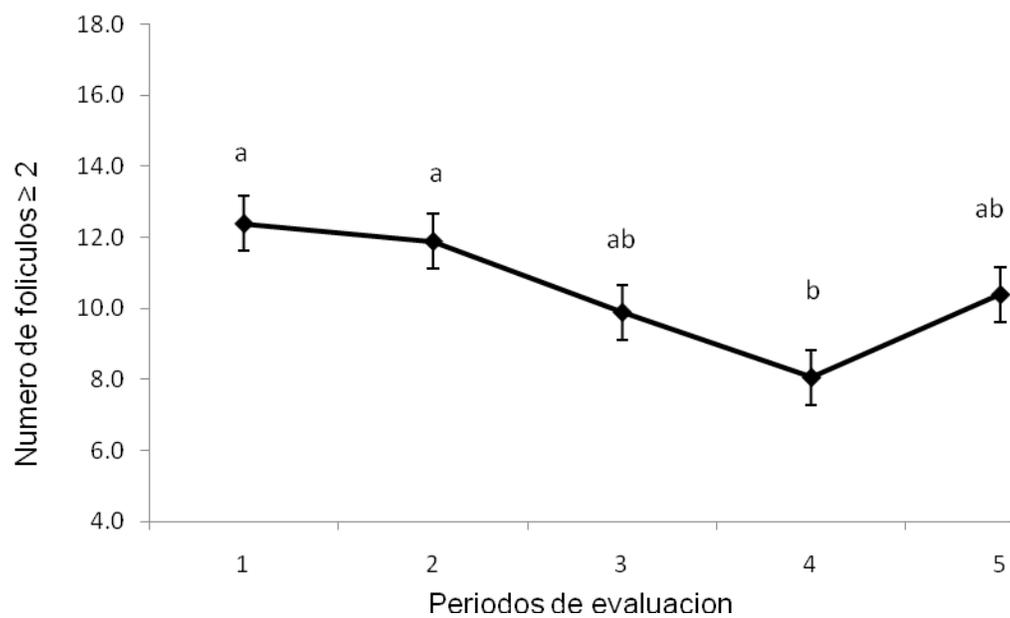


Figura 3. Número promedio de folículos antrales ≥ 2 mm por periodo de evaluación en cabras (\pm error estándar). *Diferente literal indica diferencia estadística entre tiempos ($P < 0.05$).*

Concentraciones de insulina, IGF-I y glucosa.

En las concentraciones plasmáticas promedio de insulina se encontró efecto de tratamiento y de periodo, la interacción tratamiento por periodo no fue significativa ($P=0.11$). Las concentraciones circulantes de insulina fueron superiores para DA ($P<0.06$, Cuadro 5). Con respecto al periodo las concentraciones circulantes de la hormona fueron mayores a los 40 y 60 días ($P<0.01$; Figura 3).

Se observó efecto de tratamiento ($P<0.05$; Cuadro 5) en las concentraciones circulantes de glucosa más no de periodo ($P=0.26$) ni de interacción tratamiento por periodo ($P=0.47$). La concentración promedio de glucosa fue menor para el grupo DA ($P<0.03$), el grupo DB fue similar al DA ($P=0.10$) y al T ($P=0.20$) (Cuadro 5). Para las concentraciones promedio de IGF-I no hubo diferencia entre tratamientos ($P=0.74$), aunque si se observó un efecto de periodo ($P<0.001$; Figura 5). A los 60 días las concentraciones de IGF-I fueron superiores con las observadas a los 0 y 20 días y similares con las encontradas a los 40 días que a su vez no fueron diferentes de las de 0 y 20 días ($P>0.05$).

Cuadro 5. Concentraciones promedio de insulina, glucosa e IGF-I en cabras con o sin administración prolongada de insulina. (Medias mínimo cuadráticas \pm error estándar).

Tratamientos	n	Insulina (ng/ml)	Glucosa (mg/dl)	IGF-I (ng/dl)
Testigo	6	0.15 ± 0.02^a	56.5 ± 4.4^a	166.8 ± 58.4^a
DB	6	0.23 ± 0.05^{ab}	53.3 ± 4.4^{ab}	178.5 ± 69.3^a
DA	6	0.27 ± 0.07^b	49.5 ± 6.2^b	150.6 ± 43.1^a

Diferente literal dentro de la misma columna indica diferencia estadística ($P<0.05$).

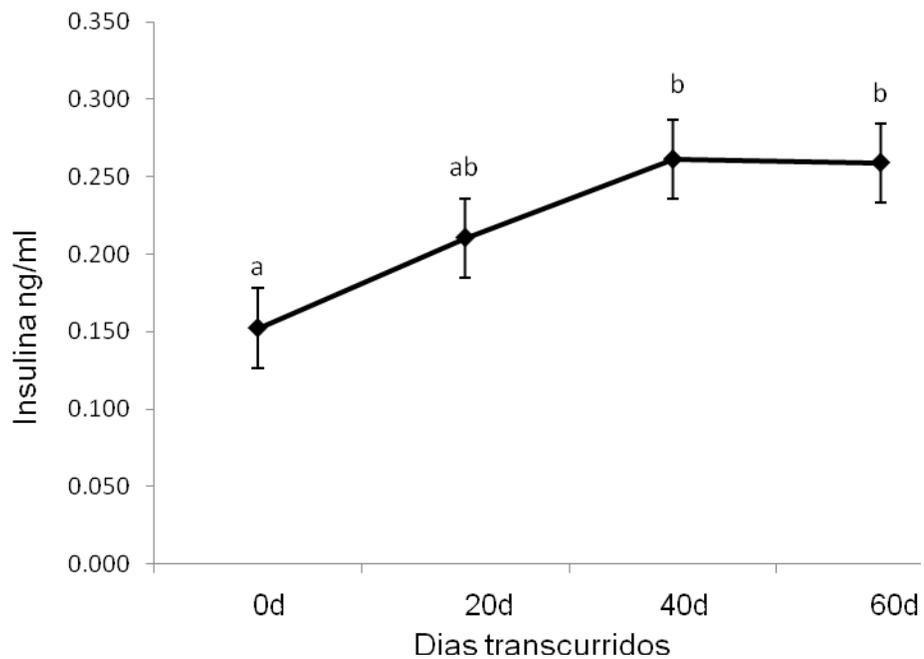


Figura 4. Concentraciones promedio de insulina por ventana de muestreo en cabras (\pm error estándar). *Diferente literal indica diferencia estadística entre tiempos ($P < 0.05$).*

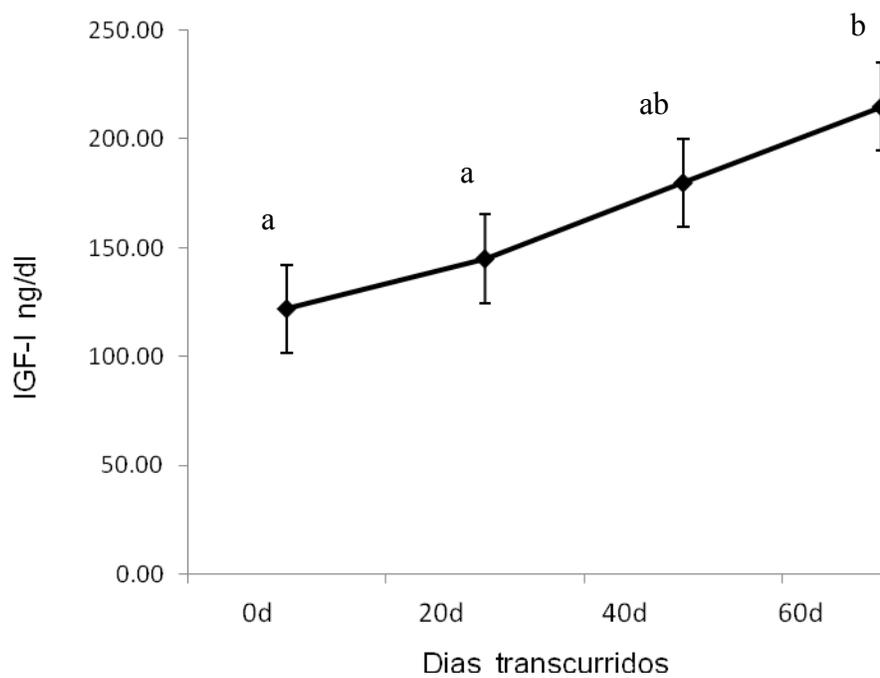


Figura 5. Concentraciones promedio de IGF-1 por ventana de muestreo en cabras (\pm error estándar). *Diferente literal indica diferencia estadística entre tiempos (P<0.001).*

VII. DISCUSION

La insulina ha sido implicada en la regulación del desarrollo y función folicular (Sarath *et al.*, 2008). Así mismo esta hormona podría ser un factor clave en la mediación de los efectos del *flushing* sobre la función ovárica (Armstrong *et al.*, 2002). *In vitro* la insulina estimula la esteroidogénesis ovárica en células de la granulosa y células de la teca, aumentando la producción de andrógenos estrógenos y progesterona (Poretsky *et al.*, 1999; Kawashima *et al.*, 2007). Diversas evidencias sugieren un papel esencial de la insulina en las etapas tempranas del desarrollo folicular preantral (Fortune, 2003), así como en el desarrollo del folículo dominante.

La evaluación del efecto de la insulina exógena sobre la función reproductiva en diferentes especies ha arrojado resultados contrastantes (Harrison y Randel 1986; Cox *et al.*, 1987; Kirkwood *et al.*, 1991; Matamoros *et al.*, 1991; Whitley *et al.*, 2000; Sarath *et al.*, 2008). Cabe resaltar que en la mayoría de estos estudios, se administró la insulina solo por periodos cortos y los efectos evaluados fueron solo los de corto plazo. Lo anterior implica que la población de folículos involucrados fue solo la que se encontraba en estadios terminales de desarrollo y no las que corresponden a estadios de desarrollo más tempranos. A diferencia de lo anterior, en el presente estudio se indujeron estados de insulinemia elevada de largo plazo, evaluándose el efecto de estos sobre el desarrollo folicular y la tasa de ovulación a través de varios ciclos estrales. Para esto, se utilizó un análogo de insulina humana, insulina glargina, que es una preparación de insulina de larga duración (24 horas) con un perfil de acción plano, prolongado, sin pico de acción y predecible con pequeña variación intraindividual (Campbell *et al.*, 2001). Las dosis experimentales se establecieron a partir de un estudio piloto, considerando que las concentraciones plasmáticas de insulina se mantuvieran dentro de un rango fisiológico y que no se generaran condiciones de hipoglicemia (< 40 mg/dl de glucosa) prolongadas.

Como puede observarse en el Cuadro 3, la administración prolongada de insulina no afectó el peso vivo ni la condición corporal de los animales

experimentales a ninguna de las dosis evaluadas. Sin embargo, en todos los grupos se observaron fluctuaciones en el peso vivo a través del tiempo (Figura 1), independientes de los tratamientos y probablemente provocadas por el manejo intensivo (laparoscopias, evaluaciones ultrasonográficas, etc.) o por ajustes en las dietas y raciones suministradas. La ausencia de efecto de los protocolos de administración de insulina utilizados, puede ser un indicativo de que no se comprometió de forma importante el metabolismo energético de los animales en los grupos tratados. Lo anterior a diferencia de las pérdidas de peso observadas por Simpson *et al.* (1994) en vacas, aún cuando la administración de la hormona fue por solo 5 días.

Como puede observarse en el Cuadro 5, la concentración sanguínea promedio de glucosa en condiciones de ayuno se disminuyó gradualmente de acuerdo a la dosis de insulina. Sin embargo, esta disminución fue de solo 3.3 y 7.5 mg/dl (6 y 13 % menor) en los grupos DB y DA con respecto al testigo. Los valores de glucosa presentados en el Cuadro 5, representan el promedio de glucosa plasmática de 3 muestras previas al suministro de alimento en el transcurso de un día y medio (AM1, PM1 y AM2), colectadas en 4 ventanas dentro del periodo experimental. Con respecto al protocolo de administración de insulina, las muestras se colectaron 48, 8 y 24 h posteriores a la aplicación de la hormona en AM1, PM1 y AM2 respectivamente. Las concentraciones plasmáticas de glucosa por tratamiento para AM1, PM1 y AM2 fueron 60.3, 60.5 y 63.0 mg/dl ($P > .50$), 50.2, 35.4 y 37.7 mg/dl ($P < .001$) y 59.0, 52.6 y 59.1 mg/dl ($P = .07$) para los grupos T, DB y DA. De acuerdo a los valores de glucosa en la muestra PM1, es claro que ambos tratamientos de insulina generaron estados hipoglicémicos a las 8 h post-inyección, aunque analizando los datos individuales, esto ocurrió solo en el 54 y 62% de los animales en DB y DA, respectivamente. Por otra parte, la condición glicémica apareció completamente normalizada en la muestra obtenida 24 h después de la aplicación de la hormona. Simpson *et al.* (1994), Downing y Scaramuzzi (1997) y Scherzer *et al.* (2009) encontraron depresiones similares en la

glicemia posteriores a la administración de insulina. En contraste, Selvaraju *et al.* (2002 y 2003) no observaron esa disminución de la glicemia, lo cual probablemente estuvo asociado con el protocolo y dosis de administración de la hormona (0.2 UI/kg de insulina de larga acción a vacas repetidoras por 3 días a partir del día 7 del ciclo estral y Selvaraju *et al.* (2003) que administró 0.2 UI/kg de insulina de larga acción a cabras empezando el día 7 del ciclo estral. Cabe resaltar que en el presente estudio, no se observaron signos clínicos de hipoglicemia en ninguno de los animales de los grupos tratados con insulina. Por el contrario Kirkwood *et al.* (1991) reportaron que 4 de 49 borregas tratadas con 1.0 UI de insulina por kg de peso corporal 6, 28 y 50 horas después de retirar una esponja vaginal, presentaron signos de hipoglicemia clínica, a las cuales se les suspendió el tratamiento y fueron retiradas del experimento. Adicionalmente, Downing y Scaramuzzi. (1997) reportaron que hacia el final de un periodo de 3 días de infusión intravenosa de 0.4 UI/Kg/día de insulina, 15 de 15 borregas mostraron signos de hipoglicemia a las cuales se les aplicó dextrosa en pequeñas cantidades y no fueron retiradas del estudio. En base a la ausencia de signos clínicos de hipoglicemia y aunque el protocolo de muestreo sanguíneo aplicado en el presente estudio no permite corroborarlo, se podría asumir que los estados hipoglicémicos generados por los tratamientos de insulina fueron solo por periodos cortos y susceptibles de ser compensados por los mecanismos homeostáticos del animal. Esto también apoyado en los resultados de las pruebas piloto realizadas para determinar las dosis de insulina utilizadas, en las que las determinaciones repetidas de la glicemia indicaron que a esas dosis los estados hipoglicémicos eran de corta duración.

Como se esperaba, la concentración sérica promedio de insulina fue mayor para DB y DA en los muestreos postinyección, que concuerda con mayores concentraciones de insulina en animales tratados con dicha hormona reportados por Harrison y Randel (1986); Matamoros *et al.* (1991); Downing y Scaramuzzi (1997). A los 0 días no hubo diferencia entre grupos y durante el resto del experimento se observó un incremento gradual de la insulinemia de

acuerdo a la dosis aplicada, mayor en DA que en DB (Cuadro 5). Independientemente de los tratamientos experimentales, se encontró un aumento progresivo de la insulina plasmática promedio entre los días 0 y 40 del periodo experimental, con una estabilización en las concentraciones de la hormona entre los días 40 y 60 (Figura 4). Al separar por grupo de tratamiento (datos no presentados), este incremento se observó solo en los animales a los que se les administró insulina y no en los del grupo testigo; en estos últimos la concentración plasmática de la hormona se mantuvo relativamente estable a lo largo del periodo experimental.

Las concentraciones séricas promedio de IGF-1 no fueron afectadas por los tratamientos. Esto está de acuerdo a resultados de Matamoros *et al.* (1991), Simpson *et al.* (1994) y Whitley *et al.* (1998). Sin embargo, los dos primeros autores también reportan aumentos de las concentraciones de IGF-1 en el fluido folicular. Resulta interesante observar el incremento lineal de IGF-I a través del tiempo, independiente de tratamiento, mostrando un efecto significativo a los 60 días (Figura 5).

Las concentraciones plasmáticas de IGF-I están asociadas positivamente con la condición corporal y el consumo de alimento (Diskin *et al.*, 2003). Así mismo, su producción hepática es nutricionalmente regulada (Renaville *et al.*, 2002). En una variedad de especies (animales domésticos, humanos y animales de laboratorio), las mayores concentraciones plasmáticas de IGF-I se encuentran en individuos jóvenes, bien alimentados y sanos. En contraste, los animales viejos, enfermos y mal alimentados tienen concentraciones plasmáticas de IGF-I bajas, que reflejan un funcionamiento comprometido de los tejidos, órganos y células (Lucy, 2000).

Las concentraciones séricas de IGF-I disminuyen en vacas en el periodo de balance energético negativo (Zulu *et al.*, 2000), igualmente la restricción alimenticia en vaquillas cíclicas disminuyó las concentraciones plasmáticas de IGF-I (Spicer *et al.*, 1991). Por el contrario, cabras que recibieron un suplemento proteico no degradable en rumen (efecto dinámico) o con mejor

condición corporal (efecto estático) muestran mayores concentraciones séricas de IGF-I (Guerra-García *et al.*, 2009).

En el presente estudio, se hicieron ajustes en el aporte de alimento en dos ocasiones con el objetivo de evitar disminución en el peso de los animales; la primera a los diez días con un incremento de 200 gramos y la segunda el día 32 con 100 gramos de aumento. Es factible que estos cambios en la ingesta provocaran el incremento en las concentraciones plasmáticas de IGF-I observado en los animales experimentales. Por otro lado, varios estudios han reportado un incremento en las concentraciones circulantes de IGF-I en caprinos y bovinos expuestos a días largos (Dahl *et al.*, 1997, 2000, Kendall *et al.*, 2003, Mabjeesh *et al.*, 2007, Spicer *et al.*, 2007). Este efecto estacional también pudo haber influido en el incremento de las concentraciones circulantes de la hormona que se observaron a través del periodo experimental.

La administración de insulina aumentó el número total de folículos antrales ≥ 2 mm (Cuadro 4), resultado similar a Sarath *et al.* (2008), quien reporta un aumento en el número total de folículos antrales en cabras aciclicas con administración de insulina. De igual forma, Matamoros *et al.* (1991) observaron que la aplicación de insulina en cerdas aumentó el número de folículos pequeños (≤ 3 mm) y Sevaraju *et al.* (2003) detectó un mayor número de folículos grandes anovulatorios en cabras superovuladas con un tratamiento previo de insulina. A diferencia de los autores anteriores, Simpson *et al.* (1994) no observó cambios en el total de folículos antrales, después de aplicar 0.25 UI/Kg/día de insulina de larga acción durante 5 días en vacas sometidas a un protocolo de superovulación con FSH. Así mismo, Whitley *et al.* (1998) y Suguna *et al.* (2009) no encontraron efecto sobre el número de folículos antrales en cerdas destetadas que recibieron 0.4 UI/kg de insulina por 3 o 5 días, o en cabras gestantes que recibieron 0.2 UI/kg de insulina por 3 días, respectivamente.

En otro estudio, las concentraciones de insulina aumentaron en vaquillas con alta ingesta dietética que se asoció con un incremento en el número de

folículos pequeños (< 4 mm) durante los primeros 3 días del ciclo estral (Gutiérrez *et al.*, 1997b). Es posible que en el presente estudio, el mayor número de folículos encontrados en los grupos tratados con insulina haya sido ocasionado por un cambio en la dinámica folicular con un aumento de folículos reclutados y una reducción de la atresia folicular como ha sido observado en cerdas (Cox *et al.*, 1987; Matamoros *et al.*, 1991). En apoyo a lo anterior, está el hecho de que el efecto de los tratamientos con insulina no fue diferenciado por etapa dentro del periodo experimental (interacción tratamiento x periodo no significativa).

En el presente trabajo, parte fundamental del diseño experimental fue la de evaluar repetidamente el desarrollo folicular durante el periodo de administración de insulina (5 periodos de evaluación), en momentos coincidentes con la parte final de oleadas ovulatorias (evaluación durante el estro). La implicación de lo anterior, es que de esa manera se puede estimar el efecto diferencial de exponer a un tono aumentado de insulina a folículos ováricos a partir de diferentes estadios de desarrollo. Además, también se puede valorar que tanto se influye sobre eventos determinantes para establecer el número de folículos que ovularán (número de folículos antrales en la oleada ovulatoria, grado de desarrollo del folículo mayor). De acuerdo a la hipótesis experimental planteada, tendría que ser más evidente el efecto de los tratamientos de insulina sobre el desarrollo folicular en los últimos periodos de evaluación. Estos periodos, corresponderían a oleadas ovulatorias en las que los folículos antrales participantes habrían estado expuestos al tono elevado de insulina desde que estaban como folículos preantrales o antrales tempranos, estadio de desarrollo en que la insulina parece jugar un papel esencial (Fortune, 2003). Sin embargo, la única variable de respuesta asociada con el desarrollo folicular que fue consistentemente influenciada por la administración de insulina (número total de folículos antrales ≥ 2 mm), lo fue de la misma manera a través de todo el periodo de tratamiento (aumento en el número de folículos independiente del periodo de evaluación). Lo anterior, sugiere que el efecto de insulina fue

ejercido fundamentalmente sobre folículos en estadios tardíos de desarrollo; efecto observado desde la primera oleada ovulatoria después de 10 días de exposición al tono elevado de insulina.

Los diámetros de los folículos mayores en este estudio fueron similares a los reportados por otros autores, $5.4 \pm .5$ en cabras anglo-nubias (Filho *et al.*, 2007) y 5.9 ± 0.7 y 6.6 ± 0.9 mm en cabras serranas (Simoes *et al.*, 2006). El tratamiento de insulina no tuvo efecto sobre el diámetro promedio del folículo mayor, resultado que concuerda con Scherzer *et al.*, (2009) quien administró 5 UI / kg de insulina a borregas durante la fase folicular tardía. Por el contrario Suguna *et al.* (2009) reportó un aumento del diámetro del folículo mayor en animales tratados con insulina, tal vez debido a los efectos positivos de la insulina sobre la proliferación de las células de la granulosa. De igual modo, Simpson *et al.* (1994) observaron un aumento del diámetro del folículo mayor en vacas cíclicas, causado por el aumento del fluido folicular ocasionado por la administración de insulina. En este estudio, se observó un aumento en todos los grupos de tratamiento en el promedio del diámetro de los folículos mayores en el periodo 4 de muestreo que corresponde al día 45 del estudio (Figura 2), en dicho periodo no se registraron cambios en la metodología de la evaluación ultrasonográfica. Quince días previos a este periodo, se detectó un aumento del peso corporal en los animales de los 3 grupos experimentales, así mismo, las concentraciones circulantes de insulina e IGF-1 fueron mayores en el día 40 para los 3 grupos en relación al día 20. Estrada (2007), encontró un aumento del diámetro del folículo mayor en cabras con un índice de masa corporal alto, indicativo de altas reservas corporales. Así mismo, glucosa, insulina, leptina e IGF-I son encontrados en mayor concentración en los animales con altas reservas corporales de energía (Marie *et al.*, 2001).

Como ya se mencionó antes, la insulina y el IGF-1 estimulan la proliferación celular y la esteroidogénesis en los folículos. La insulina está presente en la circulación así como en el líquido folicular y es capaz de influir en la mitogénesis y la esteroidogénesis folicular (Spicer *et al.*, 2002). En la cerda y

en la mujer, el IGF-1 estimula la proliferación de las células de la granulosa, sinergiza con FSH en la diferenciación de éstas y estimula la actividad aromatasa. En la borrega, estimula la proliferación de las células de la granulosa en folículos pequeños y en la vaca estimula la proliferación y esteroidogénesis de las células de la granulosa y de la teca (Giudice *et al.*, 1992, Poretsky *et al.*, 1999). Las concentraciones de IGF-1 en fluido folicular en folículos grandes de bovino están altamente correlacionadas con las concentraciones circulantes de IGF-1 (Diskin *et al.*, 2003), por lo que probablemente el efecto mitogénico y esteroidogénico de la insulina e IGF-1, explique el aumento en el diámetro de los folículos mayores a los 45 días de este estudio.

Aunque el número total de folículos ≥ 2 mm se incrementó por la administración de insulina, esto no se reflejó de manera contundente en un aumento de la tasa de ovulación. El número de ovulaciones por estro varió a través del periodo experimental (1.59, 1.63, 1.84, 1.88, 1.75, 1.69; $P < 0.07$). Así mismo el rango de ovulaciones mínimo y máximo por tratamiento durante el periodo de evaluación fue $T = 1.4$ y 1.8 , $DB = 1.6$ y 1.9 , $DA = 1.5$ y 2.1 . Aunque la administración de insulina no afectó significativamente la tasa de ovulación, si se observó un pequeño cambio en el valor mayor del rango de tasa ovulatoria, siendo superior para los grupos tratados con la hormona lo que sugiere que la administración prolongada de insulina pudo afectar en algún grado a esta variable.

Downing y Scaramuzzi (1997) aplicaron 0.4 UI/kg por 3 días en fase lútea en borregas y la tasa de ovulación no fue afectada; 1.9 ± 0.07 para el grupo tratado y 2.0 ± 0.10 para el control. Estos autores proponen que la hipoglicemia inducida por insulina inhibe la secreción de LH, lo que puede interferir con la maduración final de folículos ovulatorios e influenciar el proceso ovulatorio. Así mismo, Kirkwood *et al.* (1991) administraron 1.0 UI/ Kg de insulina a borregas durante 3 días consecutivos, pero no afectó la tasa de gestación ni el tamaño de la camada.

Por otro lado, Harrison y Randel (1986) reportaron que la infusión de 40 unidades de insulina durante 10 días aumentó la tasa de ovulación en vaquillas energéticamente deprimidas. Se ha observado que la tasa de ovulación tiene un mayor aumento cuando los animales que son sometidos a flushing tienen una condición corporal baja (Downing y Scaramuzzi., 1991), mientras que los animales con buena condición corporal no responden a la sobrealimentación (Scaramuzzi y Radfort., 1983). Borregas bien alimentadas que recibieron 1 UI/kg de insulina de larga acción por 5 días no mejoraron su eficiencia reproductiva (tasa de gestación) (Whitley et al., 2000). El promedio de la condición corporal para las cabras de este trabajo fue 2.94 ± 0.3 , 3.17 ± 0.3 , 2.98 ± 0.3 para T, DB y DA respectivamente, esto permite proponer que debido a esto, la administración prolongada de insulina no afectó la tasa de ovulación. Por otro lado se ha observado que la capacidad ovulatoria en cabras criollas no es alta. Martínez et al. (2005) reportan una prolificidad en cabras criollas de 1.4 y Mellado (1997) de 1.3 a 2.0. Por lo tanto es posible que la falta de efecto significativo del tratamiento con insulina sobre la tasa ovulatoria, estuviera relacionada con el limitado potencial ovulatorio de las cabras utilizadas y que éste ya se estuviera expresando al máximo independientemente de la administración de insulina.

Evidencias provenientes de varias especies destacan la importancia de la glucosa y la insulina como mediadores de los efectos nutricionales sobre la reproducción. Murahashi *et al.* (1996), identificaron a un sensor central en el tallo cerebral abajo del área postrema, el cual podría ser un importante glucosensor en la modulación de la secreción de LH. Así mismo, en la cabra la disponibilidad de glucosa regula la actividad del generador de pulsos GnRH a nivel del hipotálamo (Ohkura *et al.*, 2004). Por otro lado, la hipoglicemia inducida por insulina está asociada con una reducción aguda en la pulsatilidad de GnRH, lo cual inhibe la secreción de LH pero no de FSH en borregas (Downing y Scaramuzzi, 1997). En el estudio anterior, la reducción en la frecuencia de secreción pulsátil de GnRH y LH provocó un retraso en el desarrollo de los folículos preovulatorios y en el incremento preovulatorio de

estradiol e inhibina por cerca de 8 horas. Adicionalmente, Scherzer *et al.* (2009) reportaron que la administración de 5 UI/kg insulina a borregas durante la fase folicular tardía, disminuyó las concentraciones de estradiol por 8-12 hrs y retrasó la oleada preovulatoria de LH por 15 hrs, además de incrementar las concentraciones de cortisol por 10 h. Por el contrario, Deichsel *et al.* (2005) reportaron que la hipoglicemia de corto plazo inducida por inyecciones intravenosas de 0.1 o 0.2 UI/kg de insulina en yeguas, no afectó el funcionamiento del eje hipotálamo-pituitaria-ovarios y además las concentraciones de IGF-I y LH permanecieron estables.

Cabe resaltar que a diferencia del presente trabajo, en los estudios en que observaron una inhibición de la secreción de GnRH y LH al administrar insulina exógena las dosis de la hormona fueron mayores y/o se indujeron también signos clínicos de hipoglicemia. Por otra parte, también es importante hacer notar que no se observaron efectos adversos en los tiempos de presentación de los estros sincronizados ni en el tamaño de los folículos mayores a ninguna de las dosis de insulina evaluadas. Por lo anterior, es probable que la ausencia de efecto significativo de los tratamientos de insulina sobre tasa ovulatoria no haya sido debida a una alteración en la secreción de GnRH y LH. Independientemente, Downing *et al.* (1999) observaron que la infusión de insulina y glucosa por separado no tuvo influencia en el desarrollo folicular en borregas, mientras que la infusión de insulina y glucosa juntas alteraron la esteroidogénesis en ovarios autotransplantados. En este sentido, Matamoros *et al.* (1990) proporcionaron una dieta elevada en energía en cerdas durante la administración de insulina para prevenir la hipoglicemia inducida por la hormona, observándose efectos positivos sobre la función ovárica y baja incidencia de hipoglicemia.

A pesar de que no se determinaron las concentraciones circulantes de LH, la ausencia de efectos detrimentales sobre la actividad ovulatoria en los grupos tratados con insulina parece indicar que no hubo una influencia importante sobre la secreción de esta hormona. Sin embargo, también es evidente que los tratamientos de insulina indujeron estados hipoglicémicos temporales que

podrían haber alterado la disponibilidad de glucosa en las células de los folículos ováricos. Queda pendiente determinar si el control de esa condición hipoglucémica pudiera alterar la respuesta a insulina a nivel del desarrollo folicular y su repercusión sobre la tasa ovulatoria.

VIII. CONCLUSIONES.

En base a los resultados se puede concluir que la hormona insulina tiene la capacidad de regular el desarrollo folicular en cabras criollas. Así mismo, la insulina afecta los estadios avanzados del desarrollo folicular y no las etapas tempranas de desarrollo folicular.

Por otra parte, independientemente del estadio de desarrollo folicular al que los folículos son expuestos a la insulina, aparentemente ésta no incrementa el número de ovulaciones.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- Adams G P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl.*1999; 54: 17-32.
- Adashi E Y. The IGF family and folliculogenesis. *J Reprod Immunol.*1998; 39: 13-
- Aguilar M C U. Evaluación de la administración de glicerol por vía oral en la tasa de ovulación y prolificidad en cabras (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México; 2006.
- Anwara M y Ahmad K M. Ovulation rate, number of fetuses and embryo loss in Teddy goats of Pakistan. *Small Rum Res.* 1999; 31: 281-283.
- Ariyaratna H B S, Gunawardana V K. Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. *Small Rum Res.*1997; 26: 123-129.
- Armstrong D G y Webb R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reproduction.*1997; 2: 139-146.
- Armstrong D G, Gong J G, Gardner J O, Baxter G, Hogg C O, Webb R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction.* 2002; 123: 371-378.
- Baird D T y Campbell B K. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate. *Moll Cell Endocrinol.* 1998; 145: 89-95.
- Bartlewski P M, Beard A P, Cook S J, Chandolia R K, Honaramooz A, Rawlings N C. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod Fertil.*1999; 115: 111-124.
- Beg M A, Bergfelt D R, Kot K, Ginther O J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biol Reprod.* 2002; 66:120-126.
- Boukhliq R T, Adams N R, Martin G B. Effect of nutrition on the balance of production of ovarian and pituitary hormones in ewes. *Anim Reprod Sci.* 1996; 45: 59-70.

- Boyazoglu J, Hatziminaoglou I, Morand-Fer P. The role of the goat in society: past, present and perspectives for the future. *Small Rum Res.* 2005; 60: 13-23.
- Bradley J. y Van Voorhis. Follicular development en *Encyclopedia of Reproduction*, volume 2, por Academic Press; 1999: 376-389.
- Britt K L, Saunders P K, McPherson S J, Misso M L, Simpson E R, Findlay J K. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod.* 2004; 71:1712- 1723.
- Butler S T, Pelton S H, Butler W R. Insulin increases 17 β -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction.* 2004; 127: 537–545.
- Cahill L P y Mauleon P. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *J Reprod Fertil.* 1981; 61:201- 206.
- Camp J C, Wildt D E, Howard P K, Stuart L D y Chakraborty P K. Ovarian activity during normal and abnormal length estrous cycles in the goat. *Biol Reprod.* 1983; 28:673-681.
- Campbell B K, Souza C, Gong J, Webb R, Kendall N, Masters P. Domestic ruminants as model for elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction.* 2003; 61: 429-443.
- Campbell B K, Telfer E E, Webb R, Baird D T. Evidence of a role of follicle-stimulating hormone in controlling the rate of preantral follicle development in sheep. *Endocrinology.* 2004; 145:1870-1879.
- Campbell B K. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Anim Reprod.* 2009; 6: 159-171.
- Campbell R K, White J R, Levien T, Baker D. Insulin Glargine. *Clin Ther.* 2001; 23:1938-1957.
- Cone R D, Low M J, Elmquist J K, Cameron J L. Neuroendocrinology. En. Larsen PR, Kronenberg HR, Melmed S, Polonsky KS. *Williams Textbook of Endocrinology*, Tenth edition. USA. Saunders. 2003: 81-176.

- Cox N M, Stuart M G, Althen T G, Bennett W A, Miller H W. Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth. *J Anim Sci.* 1987; 64: 507-516.
- Cueto M, Gibbons A, Alberio R, Taddeo H, Gonzalez-Bulnes A. Timing of emergence of ovulatory follicles in polyovulatory goats. *Anim Reprod Sci.* 2006; 91: 275-284.
- Dahl G E, Elsasser T H, Capuco A V, Erdman R A, Peters R R. Effects of a long daily photoperiod on milk yield and circulating concentrations of insulin-like growth factor-I. *J Dairy Sci.* 1997; 80: 2784-2789.
- Davidson T, Chamberlain C, Bridges T S y Spicer L J. Effect of follicle size on in vitro production of steroids and insulin-like growth Factor (IGF-I),(IGF-II) , and the IGF-binding proteins by equine ovarian granulosa cells. *Biol Reprod.* 2002; 66: 1640–1648.
- de Castro T, Rubianes E, Menchaca A, Rivero A. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology.* 1999; 52: 399- 411.
- de la Sota R L, Simmen F A, Diaz T, Thatcher W W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol Reprod.* 1996; 55: 803–812.
- Deichsel K, Hoppen H-O, Bruckmaier R M, Kolm G y Aurich C. Acute insulin-induced hypoglycaemia does not alter IGF-1 and LH release in cyclic mares. *Reprod Dom Anim.* 2005; 40: 117–122.
- Devoto L, Christenson L. Insulin and insulin like growth factor I and II modulate human granulosa- lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5:1003-1010.
- Diskin M G, Mackey D R, Roche J F, Sreenan J M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2003; 78: 345–370.

- Downing J A y Scaramuzzi R J. Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion on gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. *J Reprod Fertil.* 1991; 43: 1: 209-227.
- Downing J A y Scaramuzzi R J. The effect of the infusion of insulin during the luteal phase of the estrous cycle on the ovulation rate and on plasma concentrations of LH, FSH, and glucose in ewes. *Theriogenology.* 1997; 47: 747-759.
- Downing J A, Joss J, Scaramuzzi R J. The effect of a direct arterial infusion of insulin and glucose on the ovarian secretion rates of androstenedione and oestradiol in ewes with an autotransplanted ovary. *J Endocrinol.* 1999; 163: 531-541.
- Downing J A, Joss J, Scaramuzzi R. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophins and metabolic hormones in ewes infused with glucose during the late luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol.* 1995b; 146: 403-410.
- Downing, J A, Joss J, Connell P, Scaramuzzi R J. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophin and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Reprod Fertil.* 1995a; 103: 137-145.
- Driancourt M A, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of Kit and Kit ligand in ovarian function. *Reproduction.* 2000; 5:143-152.
- Drion P V, Beckers J F, Derkenne F, Hanzen Ch. Le développement folliculaire chez la vache. 2. Mécanismes hormonaux au cours du cycle et du postpartum. *Ann. Med. Vet.* 2000; 144: 385-404.
- Elvin J A, Clark A T, Wang P, Wolfman N M, Matzuk M M, 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol.*1999;13: 1035-1048.
- Erickson G F y Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: The role of novel growth factors. *Fertility and Sterility.* 2001; 76. 943-949.
- Estrada E C. Efecto de las reservas corporales de energía y de la restricción nutricional sobre la expresión de la transición estacional en cabras (Tesis de

Maestría) Cuautitlan Izcalli, Mexico: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Mexico; 2007.

-Evans A C O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Dom Anim.* 2003a; 38: 240-246.

-Evans A C O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci.* 2003b; 78: 289-306.

-Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Persani L, Monget P, Monniaux D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006; 4:20.

-Filho F T, Santos M H B, Carrazzoni P G, Paula-Lopes F F, Neves JP, Bartolomeu C C, Lima P F, Oliveira M A L. Follicular dynamics in Anglo-Nubian goats using transrectal and transvaginal ultrasound. *Small Rum Res.* 2007; 72: 51–56.

-Fitz-Rodriguez G, De Santiago-Miramontes M A, Scaramuzzi R J, Malpaux B, Delgadillo J A. Nutritional supplementation improves ovulation and pregnancy rates in female goats managed under natural grazing conditions and exposed to the male effect. *Anim Reprod Sci.* 2009; 116: 85-94.

-Fortune J E, Cushman R A, Wahl C M, Kito S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 163:53-60.

-Fortune J E, Rivera G M, Yang M Y. Follicular development: The role of follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83: 109-126.

-Fortune J E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 1994; 50, 225-232.

-Fortune J E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003; 78: 135-163.

-Galina M A, Silva E, Morales R, Lopez B. Reproductive performance of mexican dairy goats under various management systems. *Small Rum Res.* 1995; 18: 249-253.

- Gibbons J R, Kot K, Thomas D L, Wiltbank M C, Ginther O J. Follicular dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. *Theriogenology*. 1999; 52:1005-1020.
- Ginther O J y Kot K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*. 1994; 42: 987-1001.
- Ginther O J, Bergfelt D R, Kulick L J, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle : role of estradiol. *Biol Reprod*. 2000; 63: 383-389.
- Giudice L C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrine Rev*. 1992; 13: 641–669.
- Goel A K y Agrawal K P. Ovulation in Jakhrana goats native to tropical climates. *Small Rum Res*. 2003; 50: 209–212.
- Gong J G, Bramley T A, Wilmut I, Webb R. Effect of recombinant bovine somatotrophin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotrophin in heifers. *Biol Reprod*. 1993; 48: 1141–1149.
- Gong J G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol*. 2002; 23: 229-241.
- Greyling J P C. Reproduction traits in the Boer goat doe. *Small Rum Res*. 2000; 36: 171-177.
- Guerra-García M, Meza-Herrera CA, Sánchez-Torres-Esqueda MT, Gallegos-Sánchez J, Torres-Hernández G, Pro-Martínez A. IGF-I y actividad ovárica en cabras en condición corporal divergente y con un suplemento de proteína no degradable en rumen. *Agrociencia*. 2009; 43: 241-247.
- Gutierrez C G, Campbell B K, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone and morphological characteristics. *Biol Reprod*. 1997; 56: 608–616.
- Gutierrez C G, Oldham J, Bramley T A, Gong, Campbell B K, Webb R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *J Anim Sci*. 1997b; 75: 1876-1884.

- Hanzen Ch, Lourtie O, Drion P V. Le développement folliculaire chez la vache. Aspects morphologiques et cinétiques. Ann. Med. Vet. 2000; 144 : 223-235.
- Hare L y Bryant M J. Ovulation rate and embryo survival in young ewes mated either at puberty or at the second or third oestrus. Anim Reprod Sci. 1985; 8: 41-52.
- Harrison L M y Randel R D. Influence of insulin and energy intake on ovulation rate, luteinizing hormone and progesterone in beef heifers. J Anim Sci .1986; 63: 1228-1235.
- Hillier S G. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. Mol Cell Endocrinol. 2001; 179:39-46.
- Honhold N, Petit H , Halliwell R W. Condition scoring scheme for small east African goats in Zimbabwe. Trop Anim Health Prod. 1989; 21(2): 121-7.
- Hua G H, Yang L G. A review of research progress of *FecB* gene in chinese breeds of sheep. Anim Reprod Sci. 2009; 116: 1-9.
- Hunter M G, Robinson R S, Mann G E, Webb R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. Anim Reprod Sci. 2004; 82-83: 461-477.
- Hurk R van den, Bevers M M, Beckers J F. *In-vivo* and *in-vitro* development of preantral follicles. Theriogenology.1997; 47: 73-82.
- INEGI. Cartas topográficas de climas de temperaturas y precipitación. Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática en México. 2000
- Ireland J J, Mihm M, Austin E, Diskin M G, Roche J F. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. J Dairy Sci. 2000; 83:1648-1658.
- Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H, 2002. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. Biol Reprod. 2002; 67: 1099-1105.

- Jainudeen M R y Hafez ESE. Ovejas y Cabras; ciclos reproductivos. En. Hafez ESE. Editor. Reproducción e inseminación artificial en animales. Sexta edición. McGraw- Hill Interamericana. 1996: 311-322.
- Jeong K H y Kaiser U B. Gonadotropin-Releasing Hormone regulation of Gonadotropin biosynthesis and secretion. En. Neill JD. Editor. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition. Elsevier. 2006: 1635-1693.
- Kawashima C, Fukihara S, Maeda M. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction*. 2007; 133: 155–163.
- Kendall P E, Auchtung T L, Swanson K S, Radcliff R P, Lucy M C, Drackley J K, Dahl G E. Effect of photoperiod on hepatic growth hormone receptor 1A expression in steer calves. *J Anim Sci*. 2003; 81: 1440-1446.
- Kezele P R, Nilsson E E, Skinner M K. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 192: 37- 43.
- Kirkwood R N, Tracker P A, Korchinski R S, Gonzalez A, Laarveld B. Effect of pre-mating injections of insulin on fertility and prolificacy of ewes. *Can J. Anim Sci*. 1991; 71: 241- 244.
- Knight P G y Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006; 132: 191-206.
- Levine J E. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). En. *Encyclopedia of Hormones*. Elsevier Science. 2003:157-164.
- Lucy M C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci*. 2000; 83:1635–1647.
- Mabjeesh S J, Gal-Garber O, Shamay A. Effect of photoperiod in the third trimester of gestation on milk production and circulating hormones in dairy goats. *J Dairy Sci*. 2007; 90: 699–705.
- Mani A U, McKelvey W A C, Watson E D. The effects of low level of feeding on response to synchronization of estrus, ovulation rate and embryo loss in goats. *Theriogenology*. 1992; 38: 1013-1022.

- Marai I F M, Abou-Fandoud E I , Daader A H , Abu-Ella A A. Reproductive doe traits of the Nubian (Zaraibi) goats in Egypt. *Small Rum Res.* 2002; 46:201–205.
- Marie M, Findlay P A, Thomas L, Adam C L. Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. *J Endocrinol.* 2001; 170: 277- 286.
- Martinez R D R, Mastache A A L, Valencia J M, Reyna L S. Comportamiento reproductivo de tres razas caprinas bajo condiciones de trópico seco en Guerrero Mexico. *Vet Méx.* 2005; 36, 2: 147-157.
- Mata J, Darmanin N, Camacho A y Camacho M E. Estudio de la prolificidad en la agrupación caprina canaria. *Arch Zootec.* 1997; 46: 169-173.
- Matamoros I A, Cox N M, Moore A B. Effects of exogenous insulin and body condition on metabolic hormones and gonadotropin-induced follicular development in prepuberal gilts. *J Anim Sci.* 1991; 69: 2081-2091.
- Matamoros I A, Cox N M, Moore A B. Exogenous insulin and additional energy affect follicular distribution, follicular steroid concentrations, and granulosa cell human chorionic gonadotropin binding in swine. *Biol Reprod.* 1990; 43: 1-7.
- May J V y Schomberg D W. Granulosa cell differentiation in vitro: effect of insulin on growth and functional integrity. *Biol Reprod.* 1981; 25: 421-431.
- McGuire M A, Vicini J L, Bauman D E, Veenhuizen J J. Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. *J Anim Sci.* 1992; 70: 2901- 2910.
- McNatty K P, Heath D A, Lundy T, Fidler T A, Quirke L, O’Connell A, Smith P, Gromme N, Tisdall D J. Control of early ovarian follicular development. *J Reprod Fertil Suppl.* 1999; 54: 3-16.
- Mellado M, Foote R H, Gomez A. Reproductive efficiency of Nubian goats throughout the year in northern Mexico. *Small Rum Res.* 1991; 6: 151-157.
- Mellado M. La cabra criolla en América Latina. *Vet. Méx.* 1997; 28: 333-343.
- Meza-Herrera CA, Hallford D M, Ortiz J A, Cuevas R A, Sánchez J M, Salinas H Mellado M, Gonzalez-Bulnes. Body condition and protein

supplementation positively affects periovulatory ovarian activity by non LH-mediated pathways in goats. *Anim Reprod Sci.* 2008; 106: 412–420.

-Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen J M, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 2002; 23: 139-154.

-Monniaux D y Pisselet C. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod.* 1992; 46:109–119.

-Montgomery G W, Galloway S M, Davis G H, y McNatty K P. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction.* 2001; 121: 843–852.

-Morley P, Calaresu F, Barbe G y Armstrong D T. Insulin enhances luteinizing hormone-stimulated steroidogenesis by porcine theca cells. *Biol Reprod.* 1989; 40: 735-743.

-Mourad M. Reproductive performance of Alpine and Zaraibi goats and growth of their first cross in Egypt. *Small Rum Res.* 1993; 12: 379-384.

-Muñoz-Gutierrez M, Blache D, Martin G B, Scaramuzzi R J. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I IGF receptor and IGF-binding protein-2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins. *Reproduction.* 2004; 128: 747-756.

-Murahashi K, Bucholtz D C, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster D L, Maeda K I. Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. *Endocrinology.* 1996; 137: 1171–1176.

-Murphy B D y Pescador N. Control de la foliculogenesis por factores endocrinos y paracrinós. Séptimo Curso Internacional de Reproducción Bovina. Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. México. 1997; 73- 86.

-Nonaka S, Hachizume T, Horiuche M, Mikami U, Osawa T, Miyake Y, Hara S. Origin of plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) during estrus in goats. *J Reprod Dev.* 2003; 49: 253- 258.

- Ohkura S, Ichimaru T, Itoh F, Matsuyama S, y Okamura H. Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic GnRH pulse generator activity in goats. *Endocrinology*. 2004; 145: 3239–3246.
- Parrot J A, Skinner M K. Kit-Ligand/Stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*.1999; 140: 4262-4271.
- Pearse B H G, McMeniman N P, Gardner I A. Influence of body condition on ovulatory response to lupin (*Lupinus angustifolius*) supplementation of sheep. *Small Rum Res*. 1994; 13: 27-32.
- Perera-Marin G, Murcia C, Gonzalez-Padilla E. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: characterization and physiological relevance. *Anim Reprod Sci*. 2007; 101:187-207.
- Pessin J E, Thurmond D C, Elmendorf J S, Coker K J, Okada S. Molecular Basis of insulin stimulated GLUT4 vesicle trafficking. *J Biol Chem*. 1999; 274: 2593-2596.
- Poretsky L, Cataldo N, Rosenwaks Z, Giudice L C. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocrine Rev*. 1999; 20: 535–582.
- Quirk S M, Cowan R G, Harman R M, Hu C L, Porter D A. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci*. 2004; 80: 40–52.
- Ramirez J L, Cox N M, Moore A B. Influence of exogenous insulin before breeding on conception rate and litter size of sows. *J Anim Sci*. 1997; 75: 1893-1898.
- Ramírez L, Cox N M, Moore A B. Influence of exogenous insulin before breeding on conception rate and litter size of gilts. *J Anim Sci*. 1997; 75: 1893-1898.
- Renaville R, Hammadi M, Portetelle D. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Domest Anim Endocrinol*. 2002; 23: 351-360.
- Roberts A J y Reeves J J. Kidding rates of Angora goats passively immunized against estrogens. *J Anim Sci*.1988; 66:2443-2447.

- Robinson J J. Nutrition and reproduction. *Anim Reprod Sci.* 1996; 42: 25-34.
- Roche J F. Control and regulation of folliculogenesis-a symposium in perspective. *Reproduction.* 1996; 1:19-27.
- Rodríguez-Castillo J C, Pro-Martínez A, Becerril-Pérez C M, Figueroa-Sandoval B, Gallegos-Sánchez J. Respuesta reproductiva y tasa ovulatoria en cabras Boer x Nubia en diferentes épocas del año. *Interciencia.* 2004; 29; 8: 468-472.
- Rubianes E y Menchaca A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science.* 2003; 78: 271-287.
- Rubianes E. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Actas Fisiol.* 2000; 6: 93-103.
- Salvi R, Castillo E, Voirol M J. Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology.* 2006; 147(2):816–826.
- Santos AS y Lucas T J. Manejo reproductivo. En. Santos AS y Lucas TJ. Editor. *La leche caprina y su producción.* México: Editores mexicanos unidos, 2001:151-174.
- Sarath T, Mehrotra S, Agarwal S K, Varshney V P, Hoque M, Shankar U, Singh S K. Effect of insulin administration on ovarian function and estrus induction in acyclic goats. *Anim Reprod Sci.* 2008; 108: 216–225.
- SAS (2000) JMP. Version 4.0.2 (Academic). SAS Institute Inc., Cary NC, EEUU.
- Scaramuzzi R J y Radfort H M. Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J Reprod Fertil.* 1983; 69: 353-367.
- Scaramuzzi R J, Campbell B K, Downing J A, Kendall N R, Khalid M, Muñoz-Gutierrez M, Somchit A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Develop.* 2006; 46: 339–354.

- Scherzer J, Ghuman S P S, Pope M, Routly J E, Walter I, Smith R F, Dobson H. Follicle and oocyte morphology in ewes after treatment with insulin in the late follicular phase. *Theriogenology*. 2009; 71: 817–828.
- Schillo K K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep *J Anim Sci*. 1992; 70: 1271-1282.
- Selvaraju S, Agarwal S K, Karche S D, Srivastava S K, Majumdar A C, Shanker U. Fertility responses and hormonal profiles in repeat breeding cows treated with insulin. *Anim Reprod Sci*. 2002; 73: 141–149.
- Selvaraju S, Agarwal S K, Karche S D, Majumdar A C. Ovarian Response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. *Theriogenology*. 2003; 59: 1459-1468.
- Shalaby A S, Sharawy S M, Saleh N H, Medan M S. Reproductive performance of Damascus goats in semi-arid areas in Egypt. 7th International Conference on Goats, France, 15-21, May 2000.
- Shimasaki S R, Moore R K, Otsuka F, Erickson G F. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Rev*. 2004; 25 (1):72–101.
- Silva E, Galina M A, Palma J M , Valencia J . Reproductive performance of Alpine dairy goats in a semi-arid environment of Mexico under a continuous breeding system. *Small Rum Res*. 1998; 27: 79-84.
- Silva J R V, Tharasanit T, Taverne M A M, van der Weijden G C, Santos R R, Figuereido JR y van der Hurk R. The Activin-Follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *J Endocrinol*. 2006; 189: 113-125.
- Simoes J, Almeida J C, Valentim R, Baril G, Azevedo J, Fontes P, Mascarhenas R. Follicular dynamics in Serrana goats. *Anim Reprod Sci*. 2006; 85: 263- 273.
- Simpson R B, Chase C C Jr, Spicer L J, Vernon R K, Hammond A C, Rae D O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *J Reprod Fertil*. 1994; 102: 483- 492.

- Skinner M K. Regulation of primordial follicle assembly and development. Hum Reprod Update. 2005; 11: 461-471.
- Smitz J E J, Cortvrindt R G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. Reproduction. 2002 123:185-202.
- Spicer L J y Echterkamp S E. The ovarian insulin and insulin like growth factor system with emphasis on domestic animals. Domest Anim Endocrinol. 1995; 12: 223-245.
- Spicer L J, Alpizar E, Echterkamp S E. Effects of insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production *in vitro*. J Anim Sci.1993; 71: 1232–1241.
- Spicer L J, Buchanan B A, Chapin L T, Tucker H A. Effect of exposure to various durations of light on serum insulin-like growth factor-I in prepubertal holstein heifers. Am J Anim Vet Sci. 2007; 2: 42-45.
- Spicer L J, Chamberlain C S, Maciel S M. 2002. Influence of gonadotropins on insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) induced steroid production by bovine granulosa cells. Domest Anim Endocrinol. 2002; 22: 237–254.
- Spicer L J, Enright W J, Murphy M G, y Roche J F. Effect of dietary intake on concentrations of insulin-like growth factor-I in plasma and follicular fluid, and ovarian function in heifers. Domest Anim Endocrinol. 1991; 8(3): 431- 437.
- Suguna K, Mehrotra S, Agarwal S K, Hoque M, Umashanker, Singh S K, Varshney V P. Effect of exogenous insulin administration on ovarian function and embryo/fetal development during pregnancy in goats. Anim Reprod Sci. 2009; 111: 202-213.
- Tenorio F F, Santos M H B, Carrazoni P G, Paula-Lopes F F, Neves J P, Bartolomeu C C, Lima P F, Oliveira M A L. Follicular dynamics in Anglo-Nubian goats using transrectal and transvaginal ultrasound. Small Rum Res. 2007; 72: 51-56.
- Turnbull K E, Braden A W H, Mattner P E. The pattern of follicular Growth and atresia in the ovine ovary. Aust. J. Biol. Sci.1977; 30: 229-241.

- Viñoles C, Forsberg M, Martin G B, Cajarville C, Repetto J, Meikle A. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction*. 2005; 129: 299–309.
- Walters K, Binnie J P, Campbell B K. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reproduction*. 2006; 131: 515–523.
- Wang B, Balba Y, Knutson V P. Insulin-induced *in situ* phosphorylation of the insulin receptor located in the plasma membrane versus endosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 227: 27-34.
- Webb E C y Mamabolo M J. Production and reproduction characteristics of South Africans indigenous goats in communal farming systems. *S Afr J Anim Sci*. 2004; 34: (1).
- Webb R, Garnsworthy P C, Gong J G, Armstrong D G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci*. 2004; 82: 63-74.
- Whitley N C, McFadin-Buff E L, Keisler D H. Effect of insulin on feed intake and reproductive performance of well-nourished nulliparous ewes. *Theriogenology*. 2000; 54: 1049-1054.
- Whitley N C, Quirk-Thomas M N, Skelton J O, Moore A B, Purvis J, Qiu Y, Cox N M. Influence of insulin on follicular development and the intrafollicular insulin-like growth factor I (IGF-I) system in sows after weaning. *J Reprod Fertil*. 1998; 112: 175-184.
- Zeleznik A J. The physiology of follicle selection. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004; 2:31.
- Zulu V C, Nakao T, Swamukai Y. Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. *J Vet Med Sci*. 2002; 64: 657- 665.