



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES Y ENDOCRINOS
INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE LA TASA OVULATORIA
EN OVEJAS POR ADMINISTRACIÓN DE UNA SOLUCIÓN
GLUCOGÉNICA**

T E S I S

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

P R E S E N T A :

SILENE MARIELLA FERRARO SÍBULO

TUTOR: DR. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR

COMITÉ TUTORAL

DR. GERMÁN DAVID MENDOZA MARTÍNEZ

DRA. MÓNICA LAMAS GREGORI



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

Dedico este trabajo a mi familia, por su amor y apoyo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, por su apoyo y guía para la realización de este trabajo, por el conocimiento compartido, enseñanzas y por sus oportunas y adecuadas sugerencias.

A la Dra. Mónica Lamas Gregori, por haberme brindado tanta confianza y cariño, por sus enseñanzas y por todo el apoyo dado en su laboratorio en CINVESTAV-Sur. A su equipo de trabajo, Mónica, Erika, Lisbeth, Heberto, Jazmín, Prisca y Antonio por su ayuda y gratos momentos compartidos.

Al Dr. Germán Mendoza Martínez, por su apoyo, sus enseñanzas y acertadas sugerencias durante mis estudios.

A los miembros de mi jurado, Dra. Silvia Búntinx Dios, Dr. Joel Hernández Cerón, Dr. Eugenio Villagómez y Dr. Nazario Pescador, por sus comentarios y su valioso aporte para mejorar esta tesis.

Al Dr. Luis Miranda por su valiosa ayuda y aporte en mi trabajo. A los técnicos Braulio Sánchez y José Espinoza por su colaboración en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Chapingo.

A la Dra. Magda Crosby y el Sr. Andrés Lee por la ayuda brindada en el Laboratorio de Nutrición Animal en el Colegio de Posgraduados.

Al Dr. Javier Gutiérrez Molotla, en CEPIPSA por la colaboración brindada para la realización de un experimento.

Al MC. Víctor Martínez y Dr. José Lozano por el apoyo con los animales para la realización de algunos trabajos incluidos en esta tesis.

A la Dra. Rosa Páramo y Dr. Alejandro Rodríguez Monterde por su ayuda con las instalaciones necesarias para realizar un estudio dentro de la Facultad.

Al Dr. Eduardo Posadas, Dr. Eugenio Gómez, Dra. Miriam Boeta y su equipo de trabajo, por su ayuda con las instalaciones en el Rancho “San Francisco” para la realización de estudios incluidos en esta tesis.

A los Drs. Lucía Rangel, Juan Alberto Bálcazar, Arantza Lassala, a las MC. Susana Rojas y Ana Rodríguez por su valiosa ayuda en diferentes etapas de esta tesis. A la MC. Clara Murcia por su colaboración y ayuda en la determinación de las hormonas. Al Dr. Javier Valencia por sus enseñanzas y apoyo durante mi estancia.

A todos aquellos que me ayudaron durante los muestreos, porque sin su ayuda no hubiera sido posible y por los tantos y gratos momentos compartidos. Agradezco especialmente a Susy, Enrique, Fernanda, Clarisa, Lulú, Toño, Yola, Bruno, Luis Victorio, Ernesto, Adrián, Angelina y Memo.

A la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” en Barquisimeto, Venezuela, por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca parcial otorgada para culminar mis estudios.

RESUMEN

La administración oral de una dosis de glicerol al momento de la luteólisis, incrementa la tasa ovulatoria en ovejas. Sin embargo, no se conoce cómo el glicerol causa este efecto en un período tan corto y cómo el glicerol es absorbido y digerido. Por tanto, se plantearon estudios para evaluar la fermentación *in vitro*, de tres fuentes energéticas como el glicerol, el propilenglicol y la melaza, a fin de determinar diferencias entre ellas y las ventajas de cada una. En el capítulo 2 se mostró que el glicerol tardó más tiempo en iniciar su fermentación (mayor tiempo lag) y se fermentó básicamente a propionato y butirato. El propilenglicol produjo el menor volumen máximo de gas y se metabolizó básicamente a propionato. La melaza se comportó como un sustrato rápidamente fermentable con una fase lag muy corta. Con la evidencia anterior, se evaluó la fermentación *in vitro* del glicerol, propilenglicol y melaza combinados con forrajes y su efecto *in vivo* sobre las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina (capítulo 3). Se mostró que independientemente del forraje utilizado, el glicerol y el propilenglicol aumentaron la proporción de propionato, aunque el glicerol se fermentó más lentamente. En contraste, la combinación de glicerol, propilenglicol y melaza con ensilado de maíz retrasó el inicio de la producción de gas comparado con la combinación con alfalfa. La combinación de glicerol y propilenglicol con forrajes cambió la cinética de producción de gas y mostró la asociación entre los forrajes y las fuentes energéticas empleadas. *In vivo*, glicerol y propilenglicol aumentaron la glucosa, aunque la respuesta glicémica fue más constante en propilenglicol y la respuesta insulinémica fue mayor en el grupo con glicerol. Finalmente, estos resultados indican que la fermentación lenta del glicerol pudiera permitir su paso a través del rumen y su absorción, ofreciendo al hígado un sustrato gluconeogénico que incrementará las concentraciones de glucosa e insulina en sangre. Adicionalmente, el glicerol puede incrementar la glucosa a partir de su conversión a propionato. El efecto de la suplementación nutricional (“flushing”) sobre la tasa ovulatoria, no está completamente entendido pero se relaciona con aumentos en la concentración sanguínea de glucosa e insulina, sin cambios en las concentraciones de gonadotropinas. Asimismo, se piensa que la nutrición tiene efectos directos a nivel ovárico. Con las evidencias anteriores, se evaluó el efecto de una solución a base de glicerol (flushing ultracorto), sobre la expresión de genes que regulan la tasa ovulatoria en ovejas (capítulo 4), y se hipotetizó que el flushing ultracorto aumentaría el número de folículos seleccionados para ovulación debido a una disminución en la expresión de RNAm para aromatasa P450 o alternativamente al promover la maduración folicular, lo que se vería reflejado en un aumento en la expresión de RNAm para la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y para el receptor de LH (LHr). Encontramos que una dosis oral de 300 ml de glicerol a 90%, disminuyó significativamente la expresión de RNAm para aromatasa P450, 12 horas después del tratamiento. Asimismo, aumentó el número de folículos ≥ 3 mm de diámetro y no tuvo efecto sobre la expresión de RNAm para 3 β -HSD y LHr. El flushing ultracorto aumenta el número de folículos potencialmente ovulatorios, al disminuir la expresión de RNAm para aromatasa P450, esto sugiere cambios en la retroalimentación estradiol-FSH y parece estar mediado por el sistema glucosa-insulina.

Palabras clave: Fermentación *in vitro*, glucosa, insulina, flushing, glicerol, tasa ovulatoria, aromatasa P450, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, receptor de LH.

ABSTRACT

A single drench of glycerol at the time of luteolysis increased the ovulation rate in sheep. However, little is known how a short glycogenic drench might increase ovulation rate in a short period of time and about the absorption and digestion of glycerol. We studied the *in vitro* fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses, characterized their fermentation products and determined the advantages and difference between them. In chapter 2 it is shown that glycerol has the longest fermentation time than propylene glycol or molasses and is fermented into propionate and butyrate. Propylene glycol had the lowest volume of gas production and was metabolized into propionate. Molasses was rapidly fermented with a minimum lag time. In a second study we determined the effect of corn silage or alfalfa on *in vitro* fermentation and gas production of glycerol, propylene glycol, molasses and the effect of these glycogenic substrates on blood concentrations of glucose and insulin in ewes. Glycerol and propylene glycol (chapter 3) increased the proportion of propionate, but glycerol showed the longest lag time, independently of the forages used. In contrast, the combination of glycerol, propylene glycol and molasses with corn silage slowed down the initiation of gas production. The kinetics of ruminal fermentation of glycerol and propylene glycol with forages changed and showed the interaction between energetic sources and forages. *In vivo*, glycerol and propylene glycol increased the glycemic response. The insulinemic response was greater in the glycerol group. Finally, the long lag time of fermentation for glycerol allows for its absorption as glycerol escaping rumen fermentation providing the liver a glycogenic substrate that will increase glucose and thus insulin concentrations. The effect of nutritional supplementation ("flushing") on the ovulation rate is not completely understood but is related to increases in blood glucose and insulin concentrations. A short nutritional stimulus would necessarily be acting either directly at the ovarian level or through hormones and factors other than gonadotrophins. We evaluated the effect of a glycerol solution (ultrashort "flushing") on the expression of genes that regulate the ovulation rate in sheep (chapter 4). We hypothesized that ultrashort "flushing" enhances the number of follicles selected for ovulation due to either a decrease in the expression of P450 aromatase or alternatively by advancing the maturation of the ovarian follicles, that would be reflected in an increase in LH receptor (LHr) and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) mRNA expression in the sheep. We found that a single drench with 300 ml of a 90% glycerol solution significantly decreased the mRNA expression for P450 aromatase, 12 hours after drenching. Likewise, the number of follicles \geq 3 mm in diameter was increased but had no effect on the mRNA expression for 3 β -HSD and LHR. This decrease in aromatase suggests that the ultrashort "flushing" affects the FSH- estradiol feedback through changes in the glucose-insulin system.

Key Words: *In vitro* fermentation, glucose, insulin, flushing, glycerol, ovulation rate, P450 aromatase, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, LH receptor.

TRABAJOS GENERADOS DE LA TESIS

ARTÍCULOS EN REVISTAS INDEXADAS

Publicados:

Ferraro SM, Mendoza GD, Miranda LA, Gutiérrez CG. *In vitro* gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. *Anim Feed Sci Technol* 2009; 154: 112-118

Enviado:

Ferraro SM, Mendoza GD, Miranda LA, Gutiérrez CG. Gas production kinetics and *in vitro* ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol, and molasses combined with forages and effects of a single drench on blood concentrations of glucose and insulin in sheep. *Animal*

En preparación:

Expresión de genes que regulan la tasa ovulatoria en ovejas en respuesta a un flushing ultracorto

TRABAJOS EN CONGRESOS

Ferraro SM, Mendoza GD, Lamas Mónica Gutiérrez CG. Cinética de fermentación *in vitro* del glicerol, propilenglicol y melaza por la técnica de producción de gas en ovejas. *V Congreso Programa de maestría y doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal* (2008) 19.

Ferraro SM, Mendoza GD, Miranda LA, Gutiérrez CG. Cinética de fermentación *in vitro* del glicerol, propilenglicol y melaza en ovejas. *XXI Congreso panamericano de ciencias veterinarias* (2008) 1566.

Ferraro SM, Mendoza G, Miranda L, Gutiérrez CG. Kinetics of ruminal fermentation *in vitro* of glycerol, propylene glycol, molasses and their drenching effect in blood concentrations of glucose and insulin in ewes. In: Chilliard Y, Glasser F, Faulconnier Y, Bocquier F, Veissier I, Doreau M (eds), *Ruminant Physiology*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 2009; 176-177.

Ferraro SM, Mendoza GD, Lamas Mónica, Gutiérrez CG. Estudio de los mecanismos moleculares y endocrinos involucrados en la regulación de la tasa ovulatoria en ovejas por administración de soluciones glucogénicas. *VI Congreso Programa de maestría y doctorado en ciencias de la producción y de la salud animal* (2010) 39.

DECLARACIÓN

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de intercambio bibliográfico.

Silene Mariella Ferraro Síbulo

ÍNDICE DE CONTENIDO

Página

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
TRABAJOS GENERADOS DE LA TESIS.....	VI
DECLARACIÓN.....	VII
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1	
REVISIÓN DE LITERATURA	
CICLO ESTRAL DE LA OVEJA.....	4
DIFERENCIACIÓN Y FORMACIÓN DE LOS FOLÍCULOS EN EL OVARIO.....	5
DESARROLLO FOLICULAR Y MARCADORES MOLECULARES INVOLUCRADOS.....	9
Folículos primordiales.....	10
Folículos comprometidos.....	11
Folículos sensibles a gonadotropinas.....	15
Folículos dependientes de gonadotropinas.....	17
Folículos ovulatorios.....	18
DINÁMICA FOLICULAR EN OLEADAS Y MECANISMOS MODULADORES.....	19
Reclutamiento.....	21
Selección.....	24
Dominancia.....	27
TASA OVULATORIA, FACTORES QUE LA AFECTAN Y MECANISMOS REGULATORIOS INVOLUCRADOS.....	29
NUTRICIÓN Y TASA OVULATORIA.....	31
INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN A NIVEL CENTRAL: EFECTOS SOBRE LA RETROALIMENTACIÓN HIPÓFISIS-OVARIO.....	34

EFFECTOS METABÓLICOS DE LA SUPLEMENTACIÓN NUTRIMENTAL: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS.....	39
Sistema glucosa-insulina.....	39
Vía de las hexosaminas.....	43
Sistema de IGF.....	45
Sistema de leptina.....	46
Vía de señalización por cinasa de monofosfato de adenosina	48
Ácidos grasos, receptores activados por proliferador de peroxisomas.....	49
USO Y METABOLISMO DE SUSTANCIAS GLUCOGÉNICAS EN RUMIANTES.....	55
CAPÍTULO 2	
<i>IN VITRO</i> GAS PRODUCTION AND RUMINAL FERMENTATION OF GLYCEROL, PROPYLENE GLYCOL AND MOLASSES.....	58
ABSTRACT.....	59
INTRODUCTION.....	60
MATERIAL AND METHODS.....	60
RESULTS.....	61
DISCUSSION.....	62
CONCLUSIONS.....	64
ACKNOWLEDGMENTS.....	64
REFERENCES.....	64
CAPÍTULO 3	
CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE GAS Y FERMENTACIÓN RUMINAL <i>IN VITRO</i> DE GLICEROL, PROPYLENE GLYCOL Y MELAZA COMBINADOS CON FORRAJES. EFECTO DE UNA SOLA DOSIS ORAL EN LAS CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DE GLUCOSA E INSULINA EN OVEJAS	66
RESUMEN.....	67
INTRODUCCIÓN.....	69

MATERIAL Y MÉTODOS.....	72
RESULTADOS.....	74
DISCUSIÓN.....	83
CONCLUSIONES.....	88
AGRADECIMIENTOS.....	89
REFERENCIAS.....	89
CAPÍTULO 4	
EXPRESIÓN DE GENES QUE REGULAN LA TASA OVULATORIA EN OVEJAS EN RESPUESTA A UN FLUSHING ULTRACORTO.....	94
RESUMEN.....	95
INTRODUCCIÓN.....	96
MATERIAL Y METODOS.....	99
RESULTADOS.....	103
DISCUSIÓN.....	107
CONCLUSIÓN.....	112
REFERENCIAS.....	112
CAPÍTULO 5	
DISCUSIÓN GENERAL.....	118
REFERENCIAS.....	127

INTRODUCCION

La eficiencia reproductiva de pequeños rumiantes es el producto de tres factores: fertilidad, prolificidad y sobrevivencia de las crías. La prolificidad, determinada por la tasa ovulatoria es, un factor clave en la eficiencia reproductiva y puede ser mejorada con la nutrición (Scaramuzzi, 1988). Por su parte, la tasa de ovulación, que se define como el número de ovulaciones que tiene un grupo de hembras en un determinado ciclo estral, está afectada por factores como la genética, la edad de la hembra y la nutrición, que determinan finalmente el número de folículos seleccionados en la oleada ovulatoria (Webb y Campbell, 2007).

Para lograr una mayor productividad se han desarrollado varias estrategias reproductivas, que buscan incrementar el número de crías nacidas anualmente por hembra. Se han implementado esquemas de inducción de estros, que permiten gestar a las hembras fuera de la época reproductiva, y también se ha buscado incrementar el número de crías nacidas por parto al aumentar la tasa ovulatoria y disminuir la mortalidad embrionaria. El objetivo, por lo tanto, es optimizar el potencial tamaño de la camada o la tasa ovulatoria (Martin *et al.*, 2004).

Con la estimulación nutricional, conocida como “flushing” se puede aumentar el número de folículos antrales y la tasa ovulatoria (Martínez, 2004; Letelier *et al.*, 2008). En la oveja, la tasa ovulatoria está influenciada por la nutrición y las evidencias encontradas señalan que los mecanismos que la regulan involucran una compleja relación entre mecanismos señalizadores intrafoliculares y la retroalimentación hipotálamo-hipófisis-ovario.

Se han utilizado diversos tratamientos de “flushing” agudo para aumentar la tasa ovulatoria, que incluyen la suplementación en la dieta con grano lupino (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Somchit *et al.*, 2009) en ovejas sincronizadas y por un tiempo de 5 días; se han utilizado también infusiones intravenosas a base de glucosa, glucosamina (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Gallet *et al.*, 2009) y aminoácidos (Downing *et al.*, 1995) durante 3-5 días. Estos tipos de “flushing” se

aplicaron en períodos previos a la luteólisis y cercanos a la emergencia de la oleada ovulatoria, con el objetivo de aumentar el número de folículos reclutados. El período crítico durante el cual la suplementación de corto tiempo estimula la tasa ovulatoria va del día 8 al día 4 antes de la ovulación, o de los días 10-14 del ciclo estral (Oldham y Lindsay, 1984; Stewart y Oldham, 1986; Nottle *et al.*, 1990). Este es el rango de tiempo en el cual la oleada ovulatoria emerge, de tal forma que el tratamiento de “flushing” se ha limitado al período fisiológico crítico de desarrollo folicular para lograr aumentar el número de folículos (Somchit *et al.*, 2007; Gallet *et al.*, 2009; Somchit *et al.*, 2009) y la tasa ovulatoria (Martínez 2004; Letelier *et al.*, 2008).

Aunque no está completamente entendido el mecanismo de acción de la nutrición sobre la reproducción, las evidencias encontradas indican que la nutrición tiene efectos directos a nivel ovárico (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004), es independiente de las concentraciones de gonadotropinas (Downing *et al.*, 1995a; Gutiérrez *et al.*, 1997a; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002) y se relaciona con un incremento en los niveles sanguíneos de glucosa e insulina (Downing *et al.*, 1995a; Viñoles *et al.*, 2005; Martínez 2004; Aguilar, 2006).

Se demostró que la administración oral de una dosis de glicerol a 90% al momento de la luteólisis incrementa la tasa ovulatoria en ovejas en un 80% (Martínez, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2007). Este “flushing” ultracorto actúa desde el momento de la luteólisis y se asocia con un aumento transitorio en las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina por un período de tiempo aproximadamente de 12 horas. Esto indica que existen períodos críticos cercanos a la luteólisis, durante los cuales puede aumentar la cantidad de folículos ovulatorios y son la ventana fisiológica en la oleada folicular, durante la cual los folículos son susceptibles de ser estimulados y rescatados de la atresia. Se supone que el mecanismo que produce un aumento en la tasa ovulatoria se encuentra a nivel de la selección y dominancia y no en el reclutamiento folicular.

Sin embargo, con poca evidencia sobre cómo el glicerol causa este efecto y cómo es absorbido y digerido, se planeó realizar estudios de fermentación *in vitro* e *in vivo* para determinar los productos de su fermentación y su acción sobre la concentración sanguínea de glucosa e insulina. De igual forma, se decidió determinar el efecto de otras fuentes energéticas, como el propilenglicol y la melaza, a fin de determinar diferencias y ventajas entre ellas. Finalmente, se evaluó la respuesta a un “flushing” ultracorto con glicerol sobre la expresión de algunos genes involucrados en la regulación de la tasa ovulatoria.

Con base en lo anterior, el objetivo general de este estudio fue analizar los cambios intraováricos que conllevan a un aumento de la tasa ovulatoria y la forma en que soluciones glucogénicas se digieren y metabolizan.

Las hipótesis de trabajo fueron:

-El glicerol, el propilenglicol y la melaza se degradan rápidamente por los microbios ruminales y como producto de su fermentación aumentan la proporción de propionato, precursor gluconeogénico.

-La administración de una sustancia glucogénica durante la lutéolisis en ovejas aumenta el número de folículos seleccionados y la tasa ovulatoria, probablemente regulado por disminución en la expresión de P450 aromatasas y aumento en la expresión de RNAm para el receptor de la hormona luteinizante (LHr) y la enzima esteroideogénica 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD).

Para probar las hipótesis se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Determinar la digestibilidad *in vitro* de sustancias glucogénicas y sus efectos agudos sobre las concentraciones de hormonas metabólicas y sus efectos en el reclutamiento folicular.
- 2) Describir los mecanismos moleculares y endocrinos que conducen a un aumento en el número de folículos seleccionados para ovulación en el tratamiento con soluciones glucogénicas.

CAPÍTULO 1

REVISIÓN DE LITERATURA

CICLO ESTRAL DE LA OVEJA

La oveja es un rumiante poliéstrico estacional que presenta patrones de función reproductiva dominada por dos diferentes tipos de ciclos. El primero es un ciclo estral con una duración de 16 a 17 días y el segundo es un ciclo anual de actividad ovárica determinada por el fotoperiodo (Karsch, 1984). En altas latitudes, los ciclos ovulatorios normales ocurren en la mayoría de las razas de ovejas al final del verano y a inicio de otoño (estación reproductiva), pero las ovulaciones cesan al final del invierno o inicios de la primavera (estación no reproductiva), de tal forma que el nacimiento de las crías ocurra bajo condiciones favorables de temperatura y disponibilidad de alimento (Forcada y Abecia, 2006).

La actividad sexual de las ovejas está fuertemente influenciada por el fotoperiodo, principal factor ambiental responsable de la reproducción estacional en poblaciones en altas latitudes. Sin embargo, hay una gran variedad de ovejas distribuidas en el resto del mundo bajo diferentes condiciones ambientales, nutricionales y sociales, en las cuales su respuesta al fotoperíodo puede estar modulada por estas condiciones *per se*. Así, quizás el fotoperíodo no sea el principal o único factor que influya sobre la reproducción y por tanto la descripción general de reproducción estacional en pequeños rumiantes, no puede ser aplicada universalmente (Forcada y Abecia 2006).

El ciclo estral es una secuencia de cambios morfológicos, ováricos y conductuales, así como de eventos endocrinos regulados por la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada: el hipotálamo (y su secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la glándula pituitaria (con su secreción de hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), prolactina y oxitocina), el

folículo (el cual secreta esteroides e inhibina), el cuerpo lúteo (el cual secreta progesterona y oxitocina) y el útero (el cual es responsable de la producción de prostaglandina $F_2\alpha$). Las hormonas se secretan en respuesta a mecanismos de estimulación e inhibición por retroalimentación y están involucradas en la comunicación orquestada entre los diferentes componentes del eje reproductivo (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

El ciclo estral se divide en dos fases: fase folicular y lútea. La GnRH hipotalámica estimula la secreción de LH desde la pituitaria anterior y el pico preovulatorio de la LH produce la ovulación del folículo dominante. Cuando el cuerpo lúteo se desarrolla, las concentraciones de progesterona comienzan a aumentar y permanecen elevadas durante la fase lútea del ciclo. Esta hormona tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación pulsátil de LH (Karsch, 1984). En los días 11-13 del ciclo, el incremento de prostaglandina $F_2\alpha$ induce la luteólisis y, consecuentemente, las concentraciones de progesterona disminuyen. La luteólisis marca el final del ciclo estral precedente y el inicio de la fase folicular del siguiente. La disminución en los niveles de progesterona conlleva a un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH y la estimulación de la secreción de estradiol desde el folículo ovulatorio, para provocar tanto el estro como el pico preovulatorio de LH (Karsch *et al.*, 1980).

DIFERENCIACIÓN Y FORMACIÓN DE LOS FOLÍCULOS EN EL OVARIO

La diferenciación de las gónadas en mamíferos es un proceso dinámico que ocurre durante la embriogénesis y tanto las células germinales como las somáticas adquieren características específicas de sexo durante el proceso. La meiosis inicia en diferentes momentos en hembras y machos; las células germinales femeninas inician la meiosis durante la embriogénesis, mientras que en el macho el proceso no se inicia sino hasta la pubertad (Baillet *et al.*, 2008).

Las gónadas se originan en la parte ventro-medial del mesonefros (riñones en desarrollo). La proliferación del epitelio celómico y condensación concomitante del mesénquima subyacente da lugar a la formación de las crestas genitales o gonadales a ambos lados de la línea media (Aerts y Bols, 2010a). El desarrollo del ovario en el embrión involucra tres procesos básicos: 1) la diferenciación de las células germinales primordiales (CGP); 2) la migración y proliferación de las CGP, y 3) la colonización de las crestas gonadales por las CGP y formación de los folículos primordiales (Vanderhyden, 2002).

En los mamíferos, los ovocitos se originan de un linaje de células germinales primordiales que surgen de células del epiblasto extraembrionario, localizadas fuera del embrión. La diferenciación de las CGP involucra dos proteínas producidas por el ectodermo extraembrionario: proteína morfogénica del hueso (BMP), BMP4 y BMP8b, moléculas que se unen a receptores sobre las células epiblasticas pluripotentes para inducir su diferenciación (Ying *et al.*, 2001).

Inicialmente estas crestas genitales no contienen CGP, ya que se encuentran localizadas en el epitelio del saco vitelino cercano a la base del alantoides. Posteriormente, las CGP migran hacia las crestas genitales a lo largo de la pared del intestino grueso y del mesenterio dorsal a través de movimientos ameboides (Aerts y Bols, 2010a), quizás controlados por señales quimiotácticas producidas por las crestas genitales (Oktem y Oktay, 2008), mencionándose el ligando Kit (Buehr *et al.*, 1993) e integrinas, entre ellas (Anderson *et al.*, 1999).

En la migración y proliferación de las CGP se han asociado glicoproteínas de la matriz extracelular: colágeno IV, fibronectina, laminina (García-Castro *et al.*, 1997), integrinas (Anderson *et al.*, 1999) y cadherinas (Bendel-Stenzel *et al.*, 2001) así como citocinas (Vanderhyden, 2002). Las citocinas juegan un papel en la proliferación y sobrevivencia de las CGP; el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Resnick *et al.*, 1998), factor de necrosis tumoral alfa (TNF) (Kawase *et al.*, 1994) y el factor inhibitorio de leucemia (LIF) (De Felici y Dolci, 1991; Pesce *et al.*,

1993), aumentan el número de CGP en cultivo. Así mismo, el ligando Kit (KL) y su receptor (Kit) se han asociado con la migración de las CGP (Matsui *et al.*, 1990; Keshet *et al.*, 1991).

Durante su migración desde el saco vitelino a la gónada, las CGP se multiplican por división mitótica y luego de sucesivas rondas de división mitótica, el DNA en la ovogonia se replica y tiene lugar la primera división meiótica (día 55 del embrión en oveja) (McNatty *et al.*, 2000; Baillet *et al.*, 2008) y las CGP son llamadas ovocitos. La primera división meiótica se detiene en diploteno (creando un ovocito primario) y permanece en este estado hasta que haya crecido completamente y sea estimulado para ovular (Aerts y Bols, 2010a).

En el período de transición de mitosis a meiosis de las CGP es cuando se observa el mayor número de estas células; sin embargo, justo antes del nacimiento disminuye dramáticamente el número de ovocitos como resultado de la apoptosis (Vanderhyden, 2002; Aerts y Bols, 2010a). Se ha implicado al factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta_1$, $TGF\beta_2$) y al ligando *Fas* en la muerte de las ovogonias (Guo *et al.*, 1994; Olaso *et al.*, 1998), los cuales modulan la actividad de una familia de genes mitocondriales Bcl-2. En el mismo sentido, el balance de moléculas antiapoptóticas (Bcl-x) y proapoptóticas (Bax) es necesario para la supervivencia de los ovocitos (Vanderhyden, 2002).

Una vez que las CGP colonizan la cresta genital adquieren el nombre de ovogonias y se entremezclan con las células somáticas que apoyan su posterior desarrollo. Las células de la pregranulosa se originan en las células epiteliales que se invaginan en la cresta genital. Las ovogonias se asocian con cordones de células de la pregranulosa hasta formar folículos primordiales (día 75 del embrión de oveja (Baillet *et al.*, 2008), que constan de un ovocito rodeado de una sola capa de células aplanadas o pregranulosa (Vanderhyden, 2002). La agregación celular probablemente involucra cadherinas (Di Carlo y De Felici, 2000) y la interacción del ligando Kit y su receptor para facilitar la adhesión celular (Pesce *et al.*, 1997).

Los folículos ováricos no se desarrollan en ausencia del ovocito, lo que indica que el ovocito participa en la formación del folículo de estadíos tempranos. Se desconocen los factores del ovocito que están implicados en la formación de los folículos primordiales; sin embargo, una supresión selectiva del factor de transcripción de la línea germinal alfa (FIG α) se relaciona con fallas en la formación del folículo primordial y una disminución masiva en los ovocitos (Soyal *et al.*, 2000; Vanderhyden, 2002). Algunos estudios han identificado los genes que se encuentran corriente abajo del factor de transcripción FIG α y principalmente los genes de la familia Nalp (familia de genes que contienen dominios de pirina y repeticiones ricas en leucina) han sido involucrados debido a su fuerte expresión durante la formación del folículo (Fowler *et al.*, 2009).

El desarrollo del componente somático de la gónada depende de una cascada molecular responsable del desarrollo. Se han identificado algunos de estos genes, como el gen supresor del tumor de Wilm's (Pritchard-Jones *et al.*, 1990; Pelletier *et al.*, 1991;), Dax-1 (Muscatelli *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1999) y el factor esteroideogénico 1 (Luo *et al.*, 1994) (SF-1). Estos dos últimos se reconocen como receptores nucleares huérfanos (Vanderhyden, 2002).

Finalmente, cuando la ontogénesis del ovario culmina, los folículos quedan embebidos en una matriz de fibroblastos, colágeno y fibras de elastina localizándose en la corteza, mientras que en la médula se observan fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos. El ovario está rodeado por una capa simple de epitelio germinal cuboidal cubierto por una capa de tejido conectivo denso, llamada la túnica albugínea (Aerts y Bols, 2010a).

Las CGP son células madre únicas, ya que su desarrollo requiere de una extensa desmetilación del genoma, supresión de la metilación asociada con genes improntados y la reactivación del cromosoma X, normalmente inactivo. Las modificaciones epigenéticas específicas de la línea germinal se reactivan durante la gametogénesis y se cree que extensas modificaciones genómicas pueden ser

necesarias para otorgar pluripotencialidad a las células germinales (Vanderhyden, 2002).

DESARROLLO FOLICULAR Y MARCADORES MOLECULARES INVOLUCRADOS

Al momento del nacimiento los ovarios de primates y de la mayoría de las especies domésticas contienen un número finito de folículos primordiales, mientras que en los roedores esta reserva ovárica se desarrolla en los primeros días del posparto (Fortune, 2003). Por tanto, los ovocitos presentes en el ovario adulto se originan de un número determinado de CGP derivadas de la masa celular interna del blastocisto en desarrollo (Picton, 2001).

En los mamíferos, la hembra cuenta con una reserva de ovocitos que han interrumpido su crecimiento en los folículos primordiales, única fuente de ovocitos para ser ovulados durante su vida reproductiva. Los folículos primordiales se forman durante la vida fetal en bovinos (130 días), ovinos y porcinos (70 días), o alrededor del nacimiento en roedores (Fortune, 2003; Baillet *et al.*, 2008).

El dogma de que la proliferación mitótica de los ovocitos se limitaba a la vida fetal o neonatal ha sido cuestionado recientemente con la publicación de un artículo de Johnson *et al.* (2004), referente a la naturaleza predeterminada de la reserva ovárica. Los autores reportan haber demostrado la existencia de células germinales mitóticamente activas en ovarios de ratones jóvenes y adultos. Ellos afirman que existe una renovación de la reserva folicular en los ovarios de los mamíferos posnatalmente. Johnson *et al.* (2004 y 2005) y Zou *et al.* (2009) han sugerido la presencia de células madre ovogonias en el ovario, médula ósea y sangre periférica; sin embargo; los estudios y los análisis estadísticos utilizados han sido cuestionados y su importancia e impacto para la población folicular aún están por establecerse (Binelli y Murphy, 2009).

El desarrollo de los folículos ováricos se clasifica según: el tamaño folicular, el número de capas de células de la granulosa, el desarrollo de las capas de la teca y la presencia de un antro.

Scaramuzzi *et al.* (1993) propusieron un modelo funcional que los clasifica en base a su dependencia de gonadotropinas en: folículos primordiales, folículos comprometidos, folículos sensibles a gonadotropinas, folículos dependientes de gonadotropinas y folículos ovulatorios. Se ha estimado que hay cerca de 100.000 a 250.000 folículos en corderas al nacimiento (Turnbull *et al.*, 1977) y que en algún momento hay cerca de 50 folículos antrales en los ovarios de una oveja adulta (McNatty *et al.*, 1982; Driancourt *et al.*, 1986).

En esta revisión se hablará de una clasificación funcional de los folículos en desarrollo, con base en su dependencia y sensibilidad a las gonadotropinas. El desarrollo folicular en la vaca y en la oveja toma un tiempo de alrededor 4-5 meses y aproximadamente 3-4 meses de este tiempo transcurre en el desarrollo preantral (Turnbull *et al.*, 1977; Driancourt *et al.*, 1985).

Folículos primordiales

Los folículos primordiales constituyen la reserva de folículos que no están creciendo, los cuales se van agotando durante la vida reproductiva del animal; en los ovarios de ovejas jóvenes pueden encontrarse entre 40.000 a 300.000 folículos primordiales, con un diámetro de 0.03 mm (Scaramuzzi *et al.*, 1993). Estos folículos están caracterizados por tener un ovocito de localización central, desprovisto de una zona pelúcida, pero rodeado por una capa aplanada de células pregranulosas (Nilsson y Skinner, 2001; Picton, 2001). Estas estructuras están desprovistas de una red capilar sanguínea. Los folículos primordiales son el estado más pequeño e inmaduro y comienzan su desarrollo bajo el estímulo de diversos factores intraováricos y hormonales (McGee y Hsueh, 2000). Este tipo de folículos no posee receptores para LH (LHr) en las células de la teca y no

expresan receptores para FSH (FSHr), LH en las células de la granulosa, ni actividad de aromatasa (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

El compartimiento somático del folículo deriva principalmente de células epiteliales superficiales del ovario, que migran y rodean a las células germinales para formar la capa de células pregranulosas (Sawyer *et al.*, 2002). Los mecanismos que controlan la formación del folículo no se conocen completamente; sin embargo, se postula que la comunicación entre células germinales y somáticas es necesaria y el sistema Notch es un ejemplo de mediador entre este tipo de células. Las células de la pregranulosa de los folículos primordiales expresan el receptor NOTCH2, el cual es activado por JAGGED1, derivado del ovocito. Interrupciones en la señalización de Notch comprometen la formación del folículo y puede reducir la población de folículos primordiales en el ratón (Trombly *et al.*, 2009; Buratini y Price, 2011).

Folículos comprometidos

El inicio del crecimiento folicular o activación folicular se refiere a los folículos que dejan el estado primordial de desarrollo en latencia y se reclutan para crecer (Fortune, 2003). Hay cambios en este estado de desarrollo, como agrandamiento del ovocito, desarrollo cuboidal de las células pregranulosas, desarrollo de la zona pelúcida y proliferación de las células cuboidales en capas concéntricas alrededor del ovocito. Una vez que se forman 2 ó 3 capas de células de la granulosa, las células de la teca se diferencian desde el estroma que está alrededor y se alinean de manera concéntrica sobre la membrana basal. Pueden encontrarse cerca de 4000 folículos comprometidos en el ovario, con un diámetro de 0.03 a 0.1 mm (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

El crecimiento comienza con un reclutamiento inicial (McGee y Hsueh, 2000), en el cual los folículos primordiales, cuyo desarrollo se encuentra suspendido, reciben algún tipo de señal y comienzan a crecer. Se han involucrado

algunos factores/hormonas en el crecimiento y diferenciación folicular: insulina, miembros de la familia del factor de crecimiento parecido a insulina (IGF) (Thomas *et al.*, 2007), miembros de la superfamilia del TGF- β , como el factor de crecimiento diferenciante (GDF-9), proteína morfogenética del hueso (BMP-15), hormona antimulleriana (AMH) (Durlinger *et al.*, 2002; Knight y Glister, 2006), así como otros factores no relacionados a esta superfamilia. Dentro de estos se pueden mencionar el ligando Kit (KL), también llamado factor de células madre (SCF) o factor steel, y su receptor Kit, factor de crecimiento epidermal (EGF) (Qu *et al.*, 2000). Algunos de estos factores tienen efectos estimulatorios o inhibitorios sobre la activación folicular (Fortune, 2003). Otros estudios han señalado el efecto de las neurotropinas y sus receptores sobre el desarrollo folicular temprano en ratones (Dissen *et al.*, 2001). En el mismo sentido, se relaciona a factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) con el desarrollo folicular. La FGF2, proteína localizada en el ovocito en vacas y detectada también en las células de la granulosa de folículos preantrales en desarrollo (Buratini y Price, 2011), estimula la activación y el desarrollo folicular en ratas, humanos y rumiantes (Nilsson *et al.*, 2001; Matos *et al.*, 2007; Garor *et al.*, 2009).

El FGF7, también conocido como factor de crecimiento de queratinocitos (FGK), se ha postulado como candidato en la señalización de células somáticas en la foliculogénesis temprana. El FGF7 ha sido localizado en las células estromales circundantes del folículo primordial en desarrollo en las ratas (Kezele *et al.*, 2005) y en las células de la granulosa de folículos preantrales bovinos (Berisha *et al.*, 2004). Este factor parece interactuar con el sistema Kit/KL, ya que se ha señalado que el FGF7 incrementa la expresión de KL, que a su vez estimula a FGF7 (Kezele *et al.*, 2005).

La acción de algunos de estos factores sobre el crecimiento folicular puede variar dependiendo de la especie. Por ejemplo, las células estromales que rodean al folículo primario en la rata expresan Kit (Kezele *et al.*, 2005) y el tratamiento con KL promovió que las células de la teca circundaran el folículo primario en

fragmentos ováricos bovinos en cultivos (Parrot y Skinner, 2000). KL ha sido propuesto como el principal regulador de la formación de la capa de la teca (Skinner, 2005); sin embargo, en la oveja KIT no fue localizado ni en las células estromales que rodean al folículo primario ni en las células de la teca de folículos preantrales (McNatty *et al.*, 1999). KIT se encuentra en ovocitos de todos los estados de desarrollo folicular en el ratón (Horie *et al.*, 1991) y en humanos (Horie *et al.*, 1993).

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) están implicadas en el desarrollo preantral y en la activación folicular. Esto incluye a la BMP6, la cual se expresa en células de la granulosa de folículos preantrales y en ovocitos (Webb y Campbell, 2007). Además, la transición de folículo primordial a primario es favorecida por BMP4 y BMP7 (Drummond, 2005).

También se ha estudiado la interrelación entre algunos factores. Por ejemplo, se puede mencionar que la expresión de KL puede ser suprimida por GDF-9, ya que se ha comprobado que GDF-9 recombinante puede inhibir la expresión de KL en las células de la granulosa (Joyce *et al.*, 2000). Otsuka y Shimasak (2002) indicaron que otro factor secretado por el ovocito, como BMP-15, puede estimular la expresión de KL en las células de la granulosa de ratas.

Otro de los factores que se han relacionado con la activación folicular es el estradiol. Cultivos de piezas ováricas fetales de vaca, obtenidas en diferentes momentos de la gestación, revelaron que hubo una máxima producción de estradiol por los ovarios colectados en el día 80 de gestación; por el contrario, los niveles de estradiol no fueron detectables en el día 160 de gestación. Esta última reducción en los niveles de estradiol es consistente con el momento de inicio de la activación folicular fetal. Por otra parte, el tratamiento con estradiol de piezas fetales ováricas colectadas entre los días 90-140 de gestación, disminuyó la tasa de activación folicular (Yang y Fortune, 2008).

El factor de transcripción (FOXL2) es un mecanismo de regulación esencial (Schmidt *et al.*, 2004) de las células somáticas en la activación folicular. En ausencia de FOXL2, la población folicular se queda detenida en el estado primordial de desarrollo. Algunos genes regulados por FOXL2 incluyen a la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (Star), proteína esencial para la esteroidogénesis (Pisarska *et al.*, 2004), lo que implica aún más a los esteroides sexuales en la activación de los folículos primordiales y complementa la información de Yang y Fortune (2008) quienes hablan sobre el control que pudiera tener el estradiol en esta activación.

Algunos estudios postulan que existen algunos factores de transcripción involucrados en esta transición de folículo primordial a primario. Por ejemplo, la supresión del factor de transcripción Nobox (factor específico del ovocito) resulta en una disminución de la reserva folicular (Rajkovic *et al.*, 2004). Este factor de transcripción regula genes expresados por el ovocito, como GDF9 y BMP15 (Ballow *et al.*, 2006). Hay otros dos factores de transcripción implicados en la activación folicular, como los miembros de la familia de genes Lim, entre ellos la proteína Lim 8 (Lhx8) (Choi *et al.*, 2008a), y el factor de transcripción que regula la ovogénesis-espermatogénesis (Sox12) (Choi *et al.*, 2008b). La supresión de estos factores puede inducir una disminución en los folículos primordiales.

Este tipo de folículos primarios expresa receptores para FSH en las células de la granulosa y receptores para LH en las células de la teca. A pesar de que diversos estudios *in vitro* han probado la hipótesis de que la FSH puede promover el desarrollo de folículos preantrales (Fortune, 2003), y a pesar de la expresión de receptores para FSH y LH, se considera que el crecimiento de estos folículos comprometidos es independiente de gonadotropinas.

La transición de folículos primarios a secundarios puede ser estimulada por el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), demostrado en tejido ovárico de vaca *in vitro* (Yang y Fortune, 2007).

Folículos sensibles a gonadotropinas

Después de la formación del antro, los folículos crecen lentamente. El folículo toma alrededor de 30 días para incrementar de 0.2 mm a 0.7 mm. Sin embargo, al final de este estado la velocidad de crecimiento se incrementa y el folículo toma 5 días para crecer de 0.8 mm a 2.5 mm. La tasa máxima de proliferación de las células de la granulosa se alcanza cuando el folículo es de 0.85 mm de diámetro, disminuyendo posteriormente (Turnbull *et al.*, 1977). La actividad de la enzima aromatasas, se detecta en esta clase de folículo. Sin embargo, no se detectan cantidades apreciables de estradiol hasta que el folículo alcanza aproximadamente 0.5 mm (Scaramuzzi *et al.*, 1993). La actividad de la aromatasas por célula incrementa en paralelo con el incremento en la sensibilidad de las células de la granulosa a la FSH.

Campbell (2009) menciona que el comienzo de la fase sensible a gonadotropinas en el desarrollo folicular ha sido difícil de probar y aunque el FSHr esté presente en los folículos con solo una o dos capas de células de la granulosa (Mc Natty *et al.*, 1999 y 2000), hay poca evidencia de que concentraciones fisiológicas de FSH puedan modular el desarrollo folicular en este estado de desarrollo. Sin embargo, Campbell *et al.* (2004) mencionan que estudios de ovario autotransplantado para evaluar el desarrollo preantral en condiciones hipo, hiper y normogonadotrópicas, los han llevado a sugerir que el inicio de la fase sensible a gonadotropinas se encuentra alrededor del comienzo de la fase folicular multilaminar terciaria. Esto último también coincide con el momento de desarrollo folicular, durante el cual se detecta la expresión de RNAm para LHr, cuando la teca se forma alrededor de las células de la granulosa (McNatty *et al.*, 1999, 2000).

Todo esto es apoyado aún más por la evidencia de que se detecta RNAm para enzimas esteroideogénicas como citocromo P450 cortadora de la cadena lateral (P450scc), citocromo P450 17 α hidroxilasa (P450c17) y 3 β hidroxisteroide

deshidrogenasa (3β -HSD) luego de la formación de la teca interna (Bao y Garverick, 1998), y la citocromo P450 aromatasa (P450arom) se detecta solamente en las células de la granulosa. Estos patrones de expresión de RNAm confirman que el estado de desarrollo folicular sensible a gonadotropinas es funcionalmente esteroideogénico y los folículos tienen la habilidad para producir estradiol, progesterona y andrógenos en cantidades pequeñas, pero significativas (McNatty *et al.*, 1999, 2000; Webb *et al.*, 2003). Además, los folículos sensibles a gonadotropinas también expresan altos niveles de RNAm y proteínas para las subunidades de activina/inhibina (McNatty *et al.*, 1999) y hormona antimulleriana (Campbell, 2009).

De igual forma, se ha asociado a los miembros del sistema Insulina/IGF como moduladores potenciales del desarrollo folicular independiente de gonadotropinas. En este sentido, el estudio de Armstrong *et al.* (2002) demostró que los folículos preantrales de bovino expresan RNAm que codifica para IGFBP-2 y 3 y para el receptor de IGF-1. Webb *et al.* (2003) reportan que la exposición del folículo y del ovocito en desarrollo a las acciones proliferativas y diferenciadoras de los IGFs está básicamente modulada por la expresión local y abundante de IGFBP-2 durante estados preantrales del desarrollo folicular (Webb *et al.*, 2003), apoyado también por estudios de cultivo *in vitro* (Walters *et al.*, 2006).

Hay aproximadamente cerca de 25 folículos (entre 1 a 2.5 mm de diámetro) sensibles a gonadotropinas que componen el “pool” desde el cual los folículos ovulatorios se desarrollarán (McNatty *et al.*, 1982; Scaramuzzi *et al.*, 1993). En ovejas, una vez que el folículo alcanza 2 mm en diámetro, sufre una transición de independiente a dependiente de gonadotropinas (Driancourt, 2001). El final de la fase sensible a gonadotropinas en la oveja está marcado por el pico en el índice mitótico de las células de la granulosa en folículos antrales pequeños de 1.2 mm de diámetro (Turnbull *et al.*, 1977), seguido de una marcada declinación de este índice en folículos de 2-2.5 mm de diámetro. Esto señala el inicio de la fase

dependiente de gonadotropinas en esta especie, que, a su vez, está acompañado por un incremento en la tasa de atresia folicular (McNatty *et al.*, 1999).

Folículos dependientes de gonadotropinas

Las gonadotropinas, FSH y LH controlan los estados finales de la foliculogénesis. Este control también está dado por la expresión diferencial de factores de crecimiento derivados del ovocito y de células somáticas, que modulan la acción de las gonadotropinas en puntos clave del desarrollo folicular (Campbell, 2009). Como su nombre lo indica, la FSH juega un papel crucial tanto en el crecimiento como en la diferenciación del folículo y ha sido probado en ovejas (McNeilly *et al.*, 1992; Campbell *et al.*, 1998a) y vacas (Garverick *et al.*, 2002) y confirmado en otras especies, como el ratón (Kumar *et al.*, 1997) y los humanos (Simpson, 2008).

En el mismo sentido, la LH participa de manera importante durante la foliculogénesis y la maduración del ovocito. Está bien establecido, en la mayoría de las especies, que en un ciclo normal la maduración final y el desarrollo de folículos antrales y sus ovocitos es dependiente de un incremento en la secreción pulsátil de LH (Baird, 1983; Hillier, 2001).

La LH tiene efectos directos e indirectos sobre el desarrollo y mantenimiento de los folículos antrales. Se ha postulado que existe una concentración máxima de LH que es perjudicial para el desarrollo del folículo antral (Hillier, 1994) y estudios realizados en ovejas tratadas con un antagonista de GnRH también sugiere la existencia de una concentración umbral de LH (Campbell *et al.*, 2007). La LH puede afectar el desarrollo del folículo de una manera indirecta a través de su papel esteroideogénico (Baird *et al.*, 1981; Peluso *et al.*, 1984; Walters y Schallenberger, 1984), ya que el nivel de secreción de estrógenos ováricos depende no solamente de la presencia de un folículo estrogénico en el ovario, sino del patrón de LH al cual el folículo está expuesto

(Campbell *et al.*, 1999a; 2007). Por tanto, en un ciclo normal, la LH es capaz de influir en el nivel y patrón de liberación de la FSH al controlar el nivel de secreción de estradiol en el ovario.

Además, hay evidencias que sugieren que la LH tiene un mecanismo adicional para actuar de manera indirecta sobre el desarrollo de folículos sensibles a gonadotropinas, ya que puede influir sobre el nivel de secreción de inhibina A (Campbell *et al.*, 2007).

Para que un folículo progrese de sensible a gonadotropinas a dependiente de gonadotropinas, hay un absoluto requerimiento de FSH. El número de folículos dependientes de gonadotropinas en el "pool" que crece puede ser de 1 a 8 con un diámetro de 2.5 mm. (Scaramuzzi *et al.*, 1993). Con el adecuado apoyo de FSH, hay un incremento en la actividad de aromatasa y los folículos secretan estradiol en cantidades incrementadas. En esta clase de folículos se detectan receptores para LH en las células de la granulosa. Sin un adecuado apoyo de FSH, la actividad de aromatasa no se mantiene, la secreción de estradiol cae y los andrógenos se acumulan dentro del folículo, conllevando a la atresia. Los folículos en el estado dependiente de gonadotropinas tienen requerimientos más altos de FSH que los folículos sensibles a gonadotropinas y ovulatorios, una característica que los hace vulnerables a la atresia (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

Folículos ovulatorios

La imagenología ultrasónica transrectal (Pierson y Ginther, 1984) permitió el estudio del desarrollo folicular en rumiantes. Al usar esta metodología, la cual permite visualizar folículos ováricos ≥ 2 mm en tamaño, fue posible elucidar que la tasa de crecimiento de un folículo desde el reclutamiento hasta que éste alcanza el tamaño preovulatorio es aproximadamente de 1mm/día (Bartlewski *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2000).

En ovejas de ovulación simple, el folículo ovulatorio usualmente alcanza un diámetro ≥ 5 mm. Ovejas homocigotas para el gen Booroola pueden tener más de 5 ovulaciones por ciclo y los folículos pueden alcanzar un tamaño preovulatorio de 2-4 mm (Montgomery *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001).

La transformación del folículo dependiente de gonadotropinas a uno capaz de ovular requiere una baja, pero crítica concentración de FSH (Campbell *et al.*, 1999a). Los folículos ovulatorios tienen un gran número de receptores para LH y FSH; el incremento en su tamaño se debe a un aumento en el número de células de la granulosa y a la acumulación de líquido folicular en el antro (Turnbull *et al.*, 1977). El folículo ovulatorio tiene una máxima actividad de aromatasa y por esta razón tiene los niveles más altos de estradiol intrafolicularmente (Hsueh *et al.*, 1984); de esta forma, es el responsable de 90% de las concentraciones circulantes de esta hormona (Baird *et al.*, 1991).

En el siguiente apartado se describirá más específicamente la modulación endocrina y génica que regula el crecimiento de los folículos en etapas más tardías de desarrollo y que llevan a la selección del folículo dominante.

DINÁMICA FOLICULAR EN OLEADAS Y MECANISMOS MODULADORES

El desarrollo folicular que puede ser regulado por gonadotropinas ocurre de una manera cíclica y organizada, denominada oleadas de desarrollo folicular. Una oleada folicular se define como el crecimiento sincrónico inicial de una cohorte de folículos (emergencia), sensibles a gonadotropinas, de los cuales uno, en especies o razas monoovulares, es seleccionado para continuar su crecimiento y se vuelve el folículo dominante. Mientras está creciendo, el folículo dominante promueve atresia en los otros folículos de la misma cohorte (Evans, 2003). La foliculogénesis dependiente de gonadotropinas se divide en tres etapas: reclutamiento, selección y dominancia.

En algunas especies, como ratas, primates y cerdos, los folículos dominantes se desarrollan solamente durante la fase folicular y se destinan, entonces, para la ovulación. En otro grupo de especies, como la vaca, oveja y yegua, el reclutamiento, la selección y la dominancia ocurren a intervalos regulares, pero sólo el folículo dominante presente durante la fase folicular ovula (Fortune, 1994).

Con el uso de la ultrasonografía transrectal se demostró la existencia de las oleadas foliculares en la vaca y se pudo monitorear diariamente el desarrollo folicular en animales (Pierson y Ginther, 1984; Sirois y Fortune, 1988). El ciclo estral del bovino está caracterizado por dos o tres oleadas de crecimiento folicular (Adams, 1999).

Las oleadas foliculares en la oveja ocurren en forma similar a las de la vaca, ya que estas oleadas están precedidas por incrementos transitorios, en forma de oleadas cada 3 a 5 días (Bister y Paquay 1983), de las concentraciones de FSH, que estimulan la emergencia de la oleada folicular (Evans *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 1998). También se confirmó por ultrasonografía el patrón en forma de oleadas de folículos 3 a 5 mm de diámetro y la asociación temporal entre un pulso de FSH y la emergencia de cada oleada en la oveja (Ginther *et al.*, 1995; Bartlewski *et al.*, 1998, 2000; Leyva *et al.*, 1998; Viñoles *et al.*, 1999; Seekallu *et al.*, 2009).

En ovejas y cabras, cada oleada folicular emerge cada 4 o 5 días y está compuesta por un grupo de folículos reclutados (cohorte) de aproximadamente 2 a 3 mm de diámetro, de los cuales algunos crecerán hasta un diámetro de 4-7 mm y ovularán, mientras que el resto sufrirá atresia (Bartlewski *et al.*, 1999). Un rango de 2 a 5 ondas foliculares ocurren en cada ciclo interovulatorio, pero el patrón predominante es de 3 ondas que emergen, respectivamente, en los días 0, 6 y 11 del ciclo estral del ovino (Rubianes, 2000). En la oveja se ha descrito también una dinámica folicular compuesta de cuatro oleadas (Toosi *et al.*, 2009; Seekallu *et al.*, 2010).

A continuación se describirán los cambios endocrinos y marcadores moleculares involucrados en el reclutamiento cíclico, selección y dominancia que llevan al folículo a convertirse en ovulatorio.

Reclutamiento cíclico

En la vaca, cada oleada de crecimiento folicular está caracterizada por el reclutamiento de 3 a 5 folículos que crecen por encima de 4 mm de diámetro. Este grupo de folículos reclutados continúa su crecimiento hasta que alcanzan un diámetro de 8 mm y en ese momento un folículo es seleccionado para continuar su crecimiento y se convierte en folículo dominante (Webb *et al.*, 2003). El reclutamiento implica que una cohorte de folículos antrales escapa de la apoptosis debido a los niveles incrementados de la FSH circulante (Aerts y Bols, 2010b). En la vaca una cohorte de folículos en desarrollo abarca entre 5-10 folículos (Driancourt, 2001), pero puede contener por encima de 24 folículos (Mihm y Austin, 2002). En la oveja, el número de folículos reclutados pueden ser entre 1 a 8, con un diámetro de 2.5 mm (Scaramuzzi *et al.*, 1993).

La involución del folículo dominante durante una oleada de crecimiento causa un aumento transitorio en FSH circulante; además, la pérdida del folículo dominante está acompañada por una disminución en los niveles de hormonas sintetizadas por el folículo, como estrógenos e inhibina, por tanto, disminuye la retroalimentación negativa que ejercen estos esteroides sobre la FSH y esto produce un incremento temporal en la secreción de esta gonadotropina. La FSH actúa como un factor de sobrevivencia para los folículos antrales tempranos y, por lo tanto, es la gonadotropina responsable del reclutamiento de una nueva cohorte de folículos antrales para la próxima oleada folicular (Webb *et al.*, 1999a; Fortune *et al.*, 2004; Aerts y Bols, 2010b).

Los folículos reclutados están caracterizados por la expresión de RNAm que codifica para LHr y FSHr en las células de la teca y de la granulosa, respectivamente, con pocos cambios en la expresión de estos receptores durante

este estado de desarrollo. La expresión de RNAm para P450scc y P450arom se detecta en las células de la granulosa. A medida que el folículo madura, hay un cambio en la dependencia de FSH a LH y éste puede ser parte de los mecanismos involucrados en la selección del folículo dominante. Además, hay cambios en los patrones de expresión de RNAm para receptores de gonadotropinas y enzimas esteroidales en las células foliculares, estrechamente ligados a cambios en las concentraciones periféricas de gonadotropinas (Webb *et al.*, 1999a).

En estudios de Gong *et al.* (1996a) y Garverick *et al.* (2002) se ha comprobado el papel que cumple la FSH en el crecimiento folicular y en la expresión de RNAm para P450scc y P450arom, en animales tratados con agonistas de GnRH y con infusiones de FSH. La expresión de RNAm para P450scc y P450arom en las células de la granulosa y para P450c17 en las células de la teca fue mayor en los folículos reclutados de vacas infundidas con FSH y con un agonista de GnRH que en los folículos reclutados de tamaño similar en vacas con ciclos estrales normales. Además la infusión de FSH en vacas tratadas con un agonista de GnRH indujo una mayor expresión de P450scc y P450arom en folículos pequeños comparado con vacas testigo (Garverick *et al.*, 2002). Esto puede ser comparable con lo que ocurre en ovejas, que poseen el gen mayor FecB, el cual incrementa la tasa ovulatoria y causa una diferenciación folicular precoz. Esto se debe a una mutación en el receptor BMPR-1B y la presencia de la mutación en FecB incrementa la expresión de RNAm para P450arom e inhibina β A en las células de la granulosa (Campbell 1998b; Webb *et al.*, 1999b).

Como se ha descrito anteriormente los sistemas de IGF y de la hormona de crecimiento participan en el desarrollo folicular en diferentes etapas. Tienen participación en el desarrollo preantral y en estados finales del crecimiento folicular, lo que permite asociar la acción del sistema de IGF con la etapa de reclutamiento, ya que en ovejas, el IGF-1 promueve la proliferación de las células de la granulosa de folículos pequeños (1-3 mm de diámetro), mientras que en

folículos grandes (> 5 mm) estimula la secreción de progesterona (Monniaux y Pisselet, 1992).

Se sabe que el IGF-I actúa en sinergia con la FSH para estimular la esteroidogénesis de las células de la granulosa de folículos de todas las tallas. Se sugiere que la biosíntesis de estrógenos y progesterona está regulada diferencialmente por IGF-I dependiendo del tamaño de los folículos (Monget *et al.*, 2002). En un estudio realizado en vacas seleccionadas para ovulación doble, se mostró que las concentraciones de IGF-I están dos veces más elevadas en la sangre y en el fluido folicular que en las de vacas no seleccionadas para esta característica. De acuerdo con estos autores, las elevadas concentraciones de IGF-I pueden modificar la foliculogénesis ovárica al promover el desarrollo de más folículos preantrales, el reclutamiento de más folículos dentro de la cohorte de folículos en desarrollo y la selección de dos o más folículos dominantes dentro de una oleada folicular (Echternkamp *et al.*, 2004).

La hormona del crecimiento se ha relacionado, también, con el reclutamiento folicular, ya que en vacas, su administración conduce a un incremento de las concentraciones de IGF-I y del número de folículos antrales sanos de 2-5 mm de diámetro, sin afectar el número de folículos ovulatorios ni las concentraciones séricas de FSH, LH, progesterona o estradiol (Gong *et al.*, 1991). Además, en vacas Brahman con deficiencia en el receptor de GH, se observó una disminución de 30% del peso corporal, de los niveles de IGF-I, del número de folículos con 2-5 mm de diámetro y del número de folículos > a 5 mm, sin cambios en los niveles de FSH, LH y estradiol (Chase *et al.*, 1998).

Monget *et al.* (2002) indican que tanto en la vaca como en el ratón se ha visto que el IGF-I juega un papel al incrementar la sensibilidad de los folículos antrales pequeños (200 μ en el ratón y 5 mm de diámetro en la vaca) a la acción de las gonadotropinas y a su transición al estado folicular dependiente de gonadotropinas.

Selección

Durante la selección, uno o dos folículos son seleccionados para continuar creciendo; los otros folículos de la cohorte se convierten en subordinados y entran en atresia (Driancourt, 2001). En el bovino, el folículo ovulatorio se selecciona alrededor de tres días antes de la ovulación (Webb y Armstrong, 1998).

Durante la selección folicular, la expresión de RNAm para LHr, tanto en células de la teca como de la granulosa, fue mayor para el folículo recién seleccionado comparado con folículos reclutados. En contraste, los niveles de RNAm para FSHr en células de la granulosa no cambiaron durante el proceso de selección (Bao y Garverick, 1998).

Tan pronto ocurre la selección del folículo dominante, el RNAm para LHr y 3β -HSD comienza a expresarse en las células de la granulosa (Bao y Garverick 1998, Garverick *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2003). De acuerdo con esto, un folículo que adquirió receptores para LH en las células de la granulosa antes que otros folículos puede inhibir el crecimiento de los otros folículos al inhibir selectivamente a la FSH; mientras la FSH es inhibida por estradiol e inhibina, la secreción de LH no lo es y el proceso es visto como una competencia en la que el ganador es el folículo que primero expresa receptores para LH en las células de la granulosa (Lucy, 2007).

Esto indica que el folículo puede usar el soporte de LH para continuar su crecimiento cuando las concentraciones circulantes de FSH han disminuido. Esto ha sido demostrado en modelos hipogonadotrópicos con infusión de LH y FSH para investigar el papel de estas gonadotropinas en la selección y dominancia folicular en vacas (Gong *et al.*, 1996b) y en ovejas (Campbell *et al.*, 2000). En ovejas, los folículos comienzan a mostrar LHr cuando miden aproximadamente 3.5 mm de diámetro (Campbell *et al.*, 2003).

Por otro lado, Evans y Fortune (1997) indican que al comparar el folículo más grande con los dos subordinados más grandes en el día 2 de la primera oleada folicular, en vacas, no encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión para receptores de gonadotropinas y enzimas esteroideogénicas. No así en el día 3 de la oleada: cuando el folículo dominante fue 3 mm más grande que el subordinado más grande, se detectaron diferencias en la producción de estradiol y en los niveles de RNAm. Específicamente, los niveles de RNAm para LHr y 17 α hidroxilasa fueron más altos en la teca interna, así como los niveles de RNAm para FSHr y aromatasa en las células de la granulosa del folículo dominante que en el folículo subordinado más grande. Además, no fue detectado RNAm para LHr en las células de la granulosa, lo que sugiere que la adquisición de LHr ocurre en estados más tardíos de diferenciación del folículo dominante.

Por su parte, Fortune *et al.* (2004) proponen al sistema de IGF como uno de los principales involucrados en la selección del folículo dominante. El IGF promueve la síntesis de estradiol en folículos antrales y, por su parte, las proteínas de unión a IGFs (IGFBPs), específicamente las de bajo peso molecular, como IGFBP-2, 4 y 5, tienen efectos negativos sobre las acciones de los IGFs al unirse a ellos e impedir que se unan a sus receptores. Sin embargo, hay proteasas específicas para estas proteínas de unión que se encargan de hidrolizar las IGFBPs, permitiendo así que el IGF se una a su receptor. Por tanto, cambios en algún componente del sistema de IGF puede afectar potencialmente el desarrollo folicular.

Rivera *et al.* (2001) demostraron una asociación negativa entre las concentraciones de estradiol y las IGFBPs de bajo peso molecular en el fluido folicular en el día 2 de la primera oleada folicular del ciclo estral del bovino. En el momento en que sólo hubo una diferencia de 1 mm de diámetro entre el folículo dominante y el subordinado más grande, las concentraciones de estradiol en el líquido folicular fueron cuatro veces mayores y los niveles IGFBP-4 cerca de 2.5 veces menores en el folículo dominante que en el folículo subordinado.

Posteriormente, con la administración de dosis pequeñas de FSH recombinante bovina, lograron la selección de folículos codominantes, que tuvieron altas concentraciones de estradiol y bajas de IGFBP-2, 4 y 5 comparados con los subordinados (Rivera y Fortune, 2001).

Webb *et al.* (2003 y 2007) mencionan que la FSH inhibe la expresión de IGFBP-2 de una manera indirecta y que bajas cantidades de esta proteína y un incremento en el número de receptores de LH en las células de la granulosa están relacionados con el establecimiento del folículo dominante. En conjunto, estos resultados indican que la regulación de la biodisponibilidad de IGF intrafolicular es el factor clave que controla la selección y el mantenimiento del folículo dominante en la vaca.

Rivera *et al.* (2001) proponen que la dominancia folicular en la vaca está asociada con la adquisición de una proteasa para IGFBP-4 (en humanos conocida como proteína A del plasma asociada a la preñez (PAPP-A)), que se encuentra 3.5 veces más concentrada en el folículo dominante que en el folículo subordinado.

Estos estudios muestran evidencias que indican que tan pronto el folículo dominante alcanza un mayor tamaño con respecto al resto de la cohorte, su líquido folicular tiene significativamente mayores concentraciones de estradiol y PAPP-A, pero menores concentraciones de IGFBPs de bajo peso molecular. En el mismo sentido, se sugiere que antes de que el folículo dominante sea significativamente más grande que el resto de los folículos de la cohorte, éste adquiere PAPP-A en respuesta a un incremento en las concentraciones circulantes de FSH, lo que conlleva a un incremento de IGF intrafolicular libre, el cual sinergiza con la FSH para estimular un rápido incremento en la producción de estradiol. El incremento en estradiol ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH para evitar que otros folículos de la cohorte adquieran PAPP-A (Fortune *et al.*, 2004). Además, estudios en folículos de vacas (Nicholas

et al., 2002) y de ovejas (Hastie y Haresing, 2006) han demostrado que a medida que el folículo incrementa en tamaño, disminuye la expresión para IGFbps.

Posteriormente, Beg y Ginther (2006) diseñaron una serie de experimentos destinados a dilucidar el papel del IGF en la selección del folículo dominante y propusieron una tercera opción que combina las dos teorías: ellos postulan que el incremento en la expresión de LHr en las células de la granulosa y el incremento en el IGF-I libre ocurren aproximadamente al mismo tiempo, y que la degradación de las IGFbps en el líquido folicular y la expresión de LHr en las células de la granulosa probablemente se requieren para el establecimiento de la dominancia.

Sin embargo, recientemente un estudio realizado por Luo *et al.* (2011) en vacas tratadas con un antagonista del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), justo antes de la selección folicular, investigaron el papel de la LH sobre posibles cambios en las concentraciones de RNAm durante la selección del folículo dominante. Estos investigadores encontraron que un evento temprano durante la selección del folículo dominante consiste en la inducción de RNAm para LHr en las células de la granulosa y la expresión de RNAm es dependiente de la LH circulante.

Dominancia

El folículo dominante funcional tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de otros folículos en ambos ovarios mientras continúa con su crecimiento. De hecho, si el folículo dominante es removido, se producirá un nuevo reclutamiento de forma inmediata (Ginther *et al.*, 2000). En la vaca, cuando el folículo más grande de la oleada, después de aproximadamente 3 días de crecimiento, alcanza un diámetro de 8.5 mm en promedio, ocurre una diferenciación entre el futuro folículo dominante y el resto de los folículos subordinados. Este momento decisivo se denomina "desviación" (Ginther *et al.*, 1999; Beg y Ginther, 2006). El folículo dominante en desarrollo es el inhibidor principal de la secreción de FSH y es

capaz de continuar su crecimiento a pesar de la reducción en FSH. Esta baja concentración de FSH tiene la ventaja de evitar la emergencia de una nueva cohorte de folículos en crecimiento (Aerts y Bols, 2010b). La desviación, entre el folículo dominante y los subordinados ocurre de manera abrupta y en un período crítico de 8 horas, momento en el cual el folículo dominante suprime la FSH y provoca la atresia de los folículos antrales restantes (Ginther *et al.*, 2000).

Durante el período posterior a la selección y durante el establecimiento de la dominancia, existe un crecimiento continuo del folículo, durante el cual se incrementa la expresión de RNAm para los receptores de gonadotropinas, enzimas esteroideogénicas y de la proteína reguladora aguda de la esteroideogénesis (StAR) en las células de la teca y de la granulosa, y los folículos producen grandes cantidades de estradiol, lo que indica que los folículos dominantes adquieren una elevada capacidad para producir esteroides a lo largo de su desarrollo (Webb *et al.*, 2003).

La LH tiene un papel clave durante la fase de dominancia. Ginther *et al.* (2001) consignaron en novillas, que los receptores para LH se expresan en las células de la granulosa del futuro folículo dominante 8 horas antes del inicio de la desviación. En folículos bovinos en general, los LHr aparecen cuando los folículos tienen 8 mm de diámetro (Webb *et al.*, 2003). Por lo tanto, se supone que el folículo dominante sufre una transición de dependencia de FSH a LH (Mihm *et al.*, 2006) Y el folículo dominante es capaz de sobrevivir y madurar a pesar de los bajos niveles circulantes de FSH. Durante la dominancia, hay cambios funcionales en el folículo dominante, como la disminución en la relación estradiol-progesterona (Mihm *et al.*, 2006) para prepararlo para la ovulación. Aún no está claro qué es lo que determina que un folículo se convierta en dominante o subordinado. Se ha propuesto que la adquisición de LHr en las células de la granulosa es lo que diferencia a los folículos dominantes de los subordinados (Bao y Garverick, 1998).

La angiogénesis tiene un papel importante en el desarrollo folicular, se ha demostrado que un incremento en el aporte sanguíneo a folículos antrales individuales está asociado con incremento en el desarrollo folicular, con la selección y la dominancia folicular (Zelevnik *et al.*, 1981; Plendl, 2000; Acosta *et al.*, 2005). Estudios en vacas, cerdos y primates no humanos, bien sea a través de la estimulación de la producción de VEGF o de la inhibición de su acción, indicaron que este factor puede causar una tasa acelerada o disminuída del desarrollo folicular, respectivamente, lo que sugiere que el VEGF tiene un papel en el crecimiento folicular (Zimmermann *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2005).

El factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) es un factor que regula la angiogénesis en el ovario. Se ha observado que los folículos dominantes tienen un lecho vascular más grande por acción de factores angiogénicos, como el VEGF, y se ha propuesto que también tienen un suministro mayor de gonadotropinas con respecto a los folículos subordinados (Barboni *et al.*, 2000).

TASA OVULATORIA: FACTORES QUE LA AFECTAN Y MECANISMOS REGULATORIOS INVOLUCRADOS

La tasa de ovulación, que se define como el número de ovulaciones que tiene un grupo de hembras en un determinado ciclo estral, está afectada por factores como la genética y ambientales.

El potencial de la tasa ovulatoria se controla genéticamente en una determinada raza o especie, sin embargo, puede estar influída por la administración exógena de hormonas y por factores ambientales como la nutrición.

En ovejas se han identificado algunas razas de tasa ovulatoria alta como Romanov y Finish Landrace. En estas razas la tasa ovulatoria refleja la acción de varios genes y la selección folicular es multigénica (Webb *et al.*, 1998). La fase

folicular es de mayor duración, debido a que las concentraciones de estrógenos son mayores y las concentraciones de FSH disminuyen de manera lenta (Bindon *et al.*, 1979). La mayor duración de la fase folicular ofrece la oportunidad de reclutar y mantener una mayor cantidad de folículos preovulatorios.

Existe otro grupo de razas de ovejas, en las cuales, la tasa de ovulación y el tamaño de la camada puede ser genéticamente regulado por la acción de un gen mayor, llamado gen de la fecundidad (*Fec*). Las ovejas Booroola (gen *Fec^B*), Inverdale (gen *FecX^l*) y Hanna (gen *Fec^H*) tienen una alta tasa de ovulación que refleja la mutación del gen *Fec* y la mutación se localiza en el cromosoma 6 de la raza Booroola y en el cromosoma X para las otras dos razas (Davis, 2005). En la raza Booroola se ha observado que los animales heterocigóticos tienen una tasa de ovulación de 3 a 4, mientras que en los animales homocigóticos la tasa ovulatoria es mayor a 5. Sin embargo, en las razas Inverdale y Hanna los animales heterocigóticos tienen una tasa de ovulación alta mientras que los homocigóticos son infértiles (Monget *et al.*, 2002). También se identificó una mutación en el gen GDF-9 para las razas de ovejas Cambridge y Belclare (Hanrahan *et al.*, 2004), y se identificaron cinco mutaciones en la proteína morfogenética ósea tipo 15 (BMP-15), y una mutación en el receptor de la proteína morfogenética ósea tipo IB (BMP-IB o cinasa similar a activina 6, (ALK-6)) (Galloway *et al.*, 2000; Monget *et al.*, 2002; Hanrahan *et al.*, 2004; McNatty *et al.*, 2005a, 2005b).

Se han desarrollado varias estrategias, para incrementar el número de crías nacidas anualmente por animal gestante y se han implementado esquemas de inducción de estros que permiten gestar a las hembras fuera de la época reproductiva. También se ha buscado incrementar el número de crías nacidas por parto al aumentar la tasa ovulatoria y disminuir la mortalidad embrionaria (Martin *et al.*, 2004).

Hay diferentes métodos para incrementar la tasa ovulatoria, dentro de los cuales se puede mencionar el uso de gonadotropina coriónica equina (eCG) y

FSH, que promueven el desarrollo de folículos medianos y grandes (Lindsay, 1991). Otros métodos indirectos son la inmunización contra hormonas esteroides (estrógenos, estrona, androstenediona y testosterona) (Campbell *et al.*, 1991), inmunización pasiva y activa contra inhibina, que produce aumentos en la FSH y en la tasa de ovulación (Wheaton *et al.*, 1992), así como la administración de líquido folicular de origen equino (Scaramuzzi *et al.*, 1993; García *et al.*, 2001) y bovino (Henderson *et al.*, 1986).

Sin embargo, Martin *et al.* (2004) proponen algunos métodos naturales para incrementar la eficiencia reproductiva en pequeños rumiantes, buscando una producción animal limpia, verde y ética (Martin y Kadokawa, 2006). Dentro de las estrategias señalan: 1) el efecto macho, para inducir una ovulación sincronizada en hembras anovulatorias; 2) la alimentación focalizada en la reproducción, con suplementaciones nutrimentales de corto tiempo destinadas y diseñadas específicamente para algunos eventos reproductivos, tales como producción de gametos, sobrevivencia embrionaria, programación fetal y producción de calostro, 3) una combinación de manejo, nutrición y selección genética para comportamiento (temperamento), destinada a maximizar la sobrevivencia de las crías. Todas estas estrategias involucran manipulaciones sin fármacos. Se menciona que el uso de herramientas para un manejo limpio, verde y ético de los animales puede disminuir costos, incrementar la productividad y, al mismo tiempo, mejorar la imagen de la industria de la carne y de la leche en la sociedad y en el mercado.

NUTRICIÓN Y TASA OVULATORIA

La nutrición durante la vida fetal de la oveja puede influir en el número de folículos y el subsecuente tamaño de la camada (Robinson *et al.*, 2002). En la oveja pospúber la transformación de un folículo primordial a folículo ovulatorio toma aproximadamente seis meses (Campbell *et al.*, 2003) y el plano nutricional del animal durante este período influye en el número de folículos que alcanza el

estado final de crecimiento (Oldham *et al.*, 1990). Una vez que el folículo ha entrado a esta fase de crecimiento sólo tiene dos alternativas: degenerarse a través del proceso de atresia u ovular. Más de 99% de los folículos ováricos sufren atresia (Hsueh *et al.*, 1994); de esta forma, sólo 0.1-0.2% de los folículos presentes al nacimiento llegan a ovular (Webb *et al.*, 2003).

El mecanismo por el cual la nutrición aumenta la tasa ovulatoria no está totalmente dilucidado; sin embargo, en todos los sistemas de producción animal el objetivo es optimizar el tamaño potencial de la camada y la alimentación es uno de los principales recursos limitantes para conseguir ese objetivo (Martin *et al.*, 2004).

Con los años, se han formulado diversas definiciones del efecto de la nutrición. Esto incluye los llamados efectos estático, dinámico e inmediato. El término efecto estático se refiere a una mayor tasa de ovulación observada en ovejas pesadas comparadas con ovejas livianas, mientras que el efecto dinámico se refiere a incrementos en la tasa de ovulación debido a incrementos en el peso vivo y la condición corporal debido a una suplementación nutricional durante períodos cortos (3 semanas) antes del apareamiento (Lindsay *et al.*, 1993; Scaramuzzi *et al.*, 2006). El efecto inmediato se refiere a aumentos en la tasa ovulatoria con una suplementación por 4 a 6 días con grano lupino (una leguminosa con alto contenido en energía y proteína), sin cambios en el peso vivo o la condición corporal (Downing *et al.*, 1995a; Scaramuzzi *et al.*, 2006).

Dentro de las estrategias nutrimentales utilizadas está el “flushing”, que puede definirse como una sobrealimentación energética que se suministra a las hembras algunas semanas antes del empadre, de tal forma que se encuentren ganando peso rápidamente antes de la presentación del estro (Heape, 1899).

Inicialmente, la suplementación se realizaba 3 semanas antes del empadre; posteriormente, Gherardi y Lindsay (1982) indicaron que sólo 9 días de consumo antes de la ovulación eran suficientes para promover el aumento en la tasa ovulatoria. Oldham y Lindsay (1984) después redujeron ese tiempo a 6 días. Por

otro lado, Stewart y Oldham (1986) encontraron que el consumo de lupino causó un efecto positivo si el consumo ocurría entre el día 8 y 5 antes de la ovulación; sin embargo, el efecto fue negativo o neutral si el consumo ocurría entre los días 4 y 1 antes de la ovulación. Posteriormente a estos estudios, el período efectivo para tratamientos nutrimentales fue ampliamente reducido en la oveja. El período crítico durante el cual la suplementación de corto tiempo estimula la tasa ovulatoria va del día 8 al día 4 antes de la ovulación, o los días 10-14 del ciclo estral (Gherardi y Lindsay, 1982; Oldham y Lindsay, 1984; Nottle *et al.*, 1985; Stewart y Oldham, 1986; Teleni *et al.*, 1989; Nottle *et al.*, 1990; Parr *et al.*, 1992). Este es el rango de tiempo en el cual la oleada ovulatoria emerge. Sin embargo, dado que el patrón en oleadas de desarrollo folicular no había sido aclarado cuando las investigaciones arriba mencionadas se desarrollaron, los autores no fueron capaces de asociar el período crítico con la emergencia de la oleada ovulatoria.

El efecto estático de la nutrición promueve aumentos consistentes en la tasa ovulatoria, que van desde 1.2-2%/Kg de aumento en el peso vivo (Lindsay *et al.*, 1975). Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando el efecto inmediato de la nutrición varían desde 0 a 54% (Gherardi y Lindsay 1982; Downing *et al.*, 1995b; Nottle *et al.*, 1997, Williams *et al.*, 2001). Las fuentes de variación son la duración de la suplementación y el día del ciclo en qué se aplica el tratamiento (Viñoles *et al.*, 2007).

La mayoría de los intentos para determinar la importancia relativa de los contenidos de energía y proteína de la dieta han indicado que la energía es el más importante (Teleni *et al.*, 1989). En los rumiantes hasta 35% de los requerimientos de glucosa pueden provenir de los aminoácidos. Un incremento en la proteína resultará, por lo tanto, en un incremento de glucosa. Aunque la suplementación de energía y proteína en la dieta incrementan la tasa ovulatoria en las ovejas (Abecia *et al.*, 1997), las infusiones de glucosa (Downing *et al.*, 1995a) y de una mezcla de aminoácidos también lo hacen (Downing *et al.*, 1995c). Scaramuzzi *et al.* (2010a), en dos estudios realizados en ovejas con ovario autotransplantado, tomaron

muestras sanguíneas de la arteria carótida y las venas ovárica y yugular y midieron las concentraciones de glucosa, así como las diferencias en las concentraciones arterial-venosa (arteria carótida-vena yugular y arteria carótida-vena ovárica) de glucosa y lactato. Los resultados indican que hay una significativa remoción de glucosa desde la sangre arterial en su paso por el ovario en las fases lútea, folicular temprana y folicular tardía del ciclo estral; además, hubo producción de lactato en la fase lútea del ciclo, no así en la folicular, lo que sugiere que en la fase lútea del ciclo estral el metabolismo ovárico puede ser anaeróbico.

Dentro de los tratamientos nutrimentales utilizados para provocar un aumento de la tasa ovulatoria se pueden mencionar los trabajos con suplementación con grano lupino, con glucosa y con glucosamina (Downing *et al.*, 1995a; Downing *et al.*, 1995b; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002), tratamientos orales con soluciones glucogénicas, como glicerol, propilenglicol y sus mezclas (Martínez 2004), suplementación con aminoácidos, como leucina e isoleucina (Downing *et al.*, 1995c), así como la adición de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta (ácido oléico, linolénico y linoléico) (Bilby *et al.*, 2006; Zachut *et al.*, 2008) y la adición de ácidos grasos *in vitro* (Coyral-Castel *et al.*, 2010).

El rango de duración de estos tratamientos es muy amplio; se han utilizado tratamientos largos, que empiezan desde 6 semanas antes del empadre. Sin embargo, la tendencia actual es utilizar tratamientos de suplementación cortos, que coincidan con los períodos críticos del crecimiento folicular y, por lo tanto, ubicados en la parte final de la fase lútea del ciclo estral.

INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN A NIVEL CENTRAL: EFECTOS SOBRE LA RETROALIMENTACIÓN HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

Actualmente se acepta que las influencias ambientales sobre la reproducción están integradas dentro de mecanismos homeostáticos que

controlan la reproducción principalmente a nivel hipotalámico. Por ejemplo, el efecto del fotoperíodo en el patrón de actividad reproductiva estacional está controlado por la acción de la melatonina sobre el hipotálamo.

El efecto de la subnutrición en la reproducción se ejerce en forma primaria a nivel del eje hipotálamo-pituitaria, bloqueando la frecuencia de pulsos de LH y la ovulación. Sin embargo, Monget y Martin (2007) consignan que la cantidad de óvulos liberados no parece estar afectada por cambios en el patrón de secreción de LH.

Los mecanismos que relacionan el estado nutricional con la secreción pulsátil de LH no se conocen. Se ha sugerido que existen señales sanguíneas que reflejan el estado metabólico del animal, como glucosa, insulina y leptina, que pueden influir en la secreción de LH (Steiner *et al.*, 1983; Butler, 2000).

Algunos estudios mencionan cambios en la secreción de LH, pero en animales sometidos a una restricción alimenticia. En cabras con ayuno por 72 horas ocurrió una disminución en la frecuencia pulsátil de LH, asociada a una disminución simultánea de insulina y de glucosa, aunque esto sólo ocurrió en cabras ligeras con un peso corporal < 24 kg (Tanaka *et al.*, 2002). De igual forma, en cabras ovariectomizadas, con implantes que contenían 17β estradiol y sometidas a un ayuno por 72 horas, disminuyó la frecuencia de pulsos de LH, en asociación con cambios en glucosa e insulina (Espinosa, 2010).

En otro estudio, ovejas sometidas a un ayuno agudo durante la fase folicular del ciclo estral, mostraron tanto una disminución en la tasa de ovulación y en las concentraciones plasmáticas como en la amplitud de pulsos de leptina, LH y FSH (Kosior-Korzecka *et al.*, 2006).

Es probable que los efectos inhibitorios de la subnutrición en la secreción de LH involucren mecanismos del sistema nervioso central que controlan la secreción de GnRH por el hipotálamo (Ebling *et al.*, 1990). No obstante, se conoce

poco acerca de cómo el animal informa al sistema nervioso central sobre su estado nutricional y de cómo esta información es traducida en una señal neuroendocrina. Existen diferentes hipótesis que tratan de explicar como la secreción de LH podría estar regulada por las reservas de grasa corporal o por señales metabólicas presentes en la sangre, como glucosa, ácidos grasos libres, insulina, tiroxina, GH, leptina e IGF-I (Randel, 1990; Hall *et al.*, 1992; Roche *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2002; Ohkura *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha concluido si es una sola señal nutricional específica la que controla la secreción de LH o si intervienen varios factores que actúan sinérgicamente en dicho proceso.

Dado que la FSH y la LH son necesarias para el crecimiento y maduración folicular, se postulaba que los mecanismos por los cuales la nutrición influía en la tasa ovulatoria deberían estar mediados por cambios en las concentraciones de estas hormonas.

Las gonadotropinas, sobre todo la FSH, y los circuitos de retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-ovario son de importancia crítica en la modulación de la respuesta a la estimulación folicular nutricional (Scaramuzzi *et al.*, 2006). Sin embargo, los esfuerzos por encontrar correlaciones entre nutrición, cambios en el mecanismo de retroalimentación negativa estradiol-FSH y tasa ovulatoria han producido resultados contradictorios. El efecto de la nutrición en los niveles de FSH es confuso, con resultados a favor y en contra de aumentos en la concentración de esta hormona. En algunos estudios se observó que un mayor nivel de ingesta aumentaba las concentraciones de FSH durante la fase lútea y folicular del ciclo y esto se asoció con un aumento en la tasa ovulatoria (Rhind *et al.*, 1985; Smith y Stewart, 1990). Sin embargo, ovejas que tienen ovulaciones dobles tienen mayores concentraciones de FSH en la fase lútea, pero menores concentraciones durante la fase folicular, respecto a ovejas con ovulación simple (Scaramuzzi y Radford, 1983; Lindsay *et al.*, 1993). Este hallazgo tendría sentido, ya que un aumento en el número de folículos en crecimiento conduciría a la secreción extra de estrógenos e inhibina, que reducirían los niveles de FSH a

través del mecanismo de retroalimentación negativa. Esto es lo que se ha llamado la paradoja de la tasa ovulatoria, ya que la asociación entre niveles de FSH, crecimiento folicular y producción de estradiol no respeta el mecanismo de retroalimentación negativa (Monget y Martin 1997).

Por otro lado, el incremento en el consumo produce un aumento en el reclutamiento folicular en vacas, lo cual se ha asociado a un incremento en la insulina circulante, sin observarse cambios en las concentraciones de FSH, hormona de crecimiento o IGF-I (Gutiérrez *et al.*, 1997a). O'Callaghan *et al.* (2000) encontraron que al administrar a las ovejas raciones alimenticias de hasta dos veces las necesidades de mantenimiento, se aumenta el número de folículos mayores de 3 mm y, en consecuencia, la tasa ovulatoria; este manejo tampoco aumentó las concentraciones circulantes de IGF-I o FSH. Sin embargo, a pesar de la falta de cambios en las concentraciones de FSH (Gutiérrez, *et al.*, 1997a; O'Callaghan *et al.*, 2000; Armstrong *et al.*, 2002), la nutrición tiene efectos a nivel local en el ovario.

Para explicar la inconsistencia de los resultados entre autores, Monget y Martin (1997) proponen que los niveles normales de gonadotropinas observados por algunos autores podrían, en realidad, reflejar un ajuste en el sistema de retroalimentación esteroide-gonadotropinas. Se ha postulado que la leptina, uno de los productos de secreción del tejido adiposo, sería la responsable de este nuevo nivel de ajuste en el mecanismo de retroalimentación hipófisis-ovario (Scaramuzzi *et al.*, 2006; Viñoles, 2007).

Al respecto, Scaramuzzi *et al.* (2006) mencionan que en el caso de la FSH, al estar sujeta a un mecanismo regulatorio por retroalimentación negativa, cualquier estímulo nutricional sobre sus concentraciones puede corregirse rápidamente por este mecanismo homeostático de retroalimentación. Además, comentan que mientras no haya claridad respecto a cuán rápida o transitoria sea

dicha corrección luego de una estimulación nutricional, el efecto de la nutrición en las concentraciones de FSH permanecerán difíciles de demostrar.

En relación con las hormonas ováricas implicadas en la retroalimentación, algunos estudios señalan que tanto la infusión de glucosa como la suplementación con grano lupino suprimen la secreción de estradiol durante la fase folicular del ciclo estral y esto parece ser un efecto directo sobre el folículo, ya que se lleva a cabo, bien sea en presencia de concentraciones ligeramente aumentadas o en ausencia de cambios en la FSH. No está claro si estos efectos de la nutrición alteran las vías de señalización estimuladas por la FSH a nivel intracelular o la actividad aromatasa estimulada por FSH (Scaramuzzi *et al.*, 2006; Somchit *et al.*, 2007).

En la oveja, la suplementación de corto tiempo estimula la foliculogénesis (Viñoles *et al.*, 2005; Somchit *et al.*, 2007) e incrementa la tasa de ovulación (Teleni *et al.*, 1989; Letelier *et al.*, 2008). Se ha sugerido que el mecanismo de este efecto no es principalmente hipotálmico, sino que involucra efectos directos de nutrientes y metabolitos sobre el folículo (Scaramuzzi *et al.*, 2006). Un incremento en la nutrición estimula la foliculogénesis y hay fuertes evidencias que muestran que el folículo responde a acciones directas de la nutrición. Por el contrario, hay poca evidencia acerca de que la nutrición estimule la foliculogénesis indirectamente al incrementar la secreción de gonadotropinas. La desnutrición inhibe la foliculogénesis y hay evidencia que muestra que este proceso reduce la secreción de LH y FSH por acciones centrales sobre el sistema pituitaria-hipotálamo y, particularmente, por la inhibición del pulso generador de GnRH. Estas diferencias sugieren que los efectos de una subnutrición y una sobrenutrición sobre la foliculogénesis no son los extremos opuestos de un solo mecanismo, sino son dos mecanismos diferentes (Scaramuzzi *et al.*, 2010b).

Bajo estas circunstancias, el siguiente trabajo se enfocará en un modelo en el cual los carbohidratos y ácidos grasos además de tener un papel central como

reguladores del metabolismo, tienen funciones señalizadoras, que localmente modifican las acciones gonadotrópicas sobre el folículo.

EFFECTOS METABÓLICOS DE LA SUPLEMENTACIÓN NUTRIMENTAL: MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS

Una vía para relacionar la reproducción con la nutrición es a través del balance energético negativo. Cuando los requerimientos netos de nutrientes de los animales son mayores que el consumo neto de nutrientes, los animales usarán sus reservas energéticas como glucógeno, triglicéridos y proteínas para satisfacer el déficit: en este estado el animal se encuentra en balance energético negativo. En un balance energético positivo el requerimiento neto de nutrientes es menor que el consumo neto. El estado metabólico y la partición de nutrientes dentro del organismo están regulados por una serie compleja de interacciones entre las concentraciones sanguíneas de hormonas metabólicas y el flujo de nutrientes en todo el cuerpo. Muchas de las hormonas y nutrientes que ayudan a mantener la homeostasis también afectan al sistema reproductivo (Scaramuzzi *et al.*, 2006)

Los cambios en los niveles circulantes de hormonas son señales importantes que informan acerca del estado metabólico del animal (Lindsay *et al.*, 1993). El folículo tiene un sensor de nutrientes específico y mecanismos metabólicos que pueden modificar la foliculogénesis y muchos de los sistemas hormonales que responden a la nutrición también afectan al ovario, como el sistema de glucosa-insulina, el sistema de IGF y el sistema de leptina (Scaramuzzi *et al.*, 2006).

Sistema Glucosa-Insulina

Glucosa

La glucosa es un combustible imprescindible para el metabolismo de las células y su estatus está regulado localmente por varios mecanismos

intracelulares que, probablemente, estén interrelacionados. Éstos incluyen las vías de señalización de insulina, las acciones de la cinasa de monofosfato de adenosina (AMPK) y la vía de las hexosaminas (Scaramuzzi *et al.*, 2010b).

Williams *et al.* (2001) consignaron que las concentraciones de GLUT-1 y GLUT- 4 fueron de 7-18 veces mayor en las células de la granulosa que en las de la teca y de la granulosa, sin embargo la concentración de estas proteínas no fue afectada por el tratamiento nutricional. La presencia de estos transportadores de glucosa en las células de la granulosa y de la teca de los folículos indican que tienen un papel como moduladores de la función folicular. Además, en ovejas con autotransplante ovárico se ha determinado un aumento significativo ($P < 0.001$) en la concentración arterial de glucosa (58.0 ± 5.0 mg/dL) comparada con la concentración en sangre venosa ovárica (42.3 ± 2.4 mg/dL) (Scaramuzzi *et al.*, 2010a). Williams *et al.* (2001) proponen tres mecanismos por medio de los cuales la glucosa e insulina pudieran afectar la función folicular: 1) los cambios en energía disponible, independientemente de los cambios en GLUT, pueden alterar el ambiente endocrino y la capacidad esteroidogénica de las células foliculares; 2) alteraciones en la función o expresión de los transportadores de glucosa en el ovario pueden modificar el consumo de glucosa, y 3) los cambios en las concentraciones circulantes de glucosa e insulina conllevan a un incremento en el consumo de glucosa, el cual altera la capacidad esteroidogénica, que en parte puede afectar la función o la expresión de los transportadores GLUT.

Insulina

Una consecuencia fisiológica del incremento de los niveles de glucosa en la sangre es el incremento de la insulina circulante. Se ha propuesto que la respuesta al estímulo nutricional está mediada por el aumento en los niveles de insulina, la cual aumenta la utilización de glucosa a nivel ovárico, provocando así un aumento de la tasa ovulatoria.

En ovejas infundidas intravenosamente con glucosa por 5 días, desde el día 8 hasta el día 12 del ciclo estral, se incrementaron las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina y aumentó la tasa ovulatoria. Los autores concluyen que la insulina estuvo involucrada en mediar la ovulación en respuesta al estímulo nutricional (Downing *et al.*, 1995a). De manera similar, el incremento en la tasa ovulatoria por infusión intravenosa de una mezcla de leucina, isoleucina y valina se asoció a un incremento en las concentraciones sanguíneas de insulina (Downing *et al.*, 1995c). En estudios realizados con grano lupino como suplemento en la dieta por 5 días, la tasa de ovulación aumentó y se encontraron incrementadas las concentraciones sanguíneas de insulina (Scaramuzzi *et al.*, 2006). De igual forma, Viñoles *et al.* (2005) señalaron aumentos en las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina en ovejas que recibieron un suplemento por 6 días; estos aumentos se asociaron a un aumento en el número de folículos en crecimiento de 2-3 mm. La administración el día 14 del ciclo estral de glicerol a 90% en dosis única en ovejas aumentó las concentraciones de glucosa e insulina y esto se relacionó con un aumento en la tasa ovulatoria de 80% (Martínez, 2004).

El folículo tiene un sistema funcional de glucosa-insulina (Ver figura 1.1) y se ha comprobado la presencia de receptores para insulina con función de tirosincinasa, que se autofosforila al unirse la insulina (Poretzky *et al.*, 1999). Las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS-1, IRS-2, IRS-4) interactúan con el receptor de insulina, el cual, una vez activado por el ligando y fosforilado, inicia las respuestas intracelulares de insulina. Las IRS han sido detectadas en células de la granulosa en humanos (Yen *et al.*, 2004) y en células de la teca y de la granulosa en la oveja (Somchit, 2008). El folículo expresa otras cinasas activadas por la insulina como la cinasa de fosfatidilinositol-3 (PI3K), un miembro de la familia de proteíncinasas específicas para serina/treonina (Akt), la cinasa P70S6 (P70S6K), el blanco en mamíferos de la rapamicina (mTOR) y las cinasas

reguladas por la señalización extracelular (ERKs) (Zelevnik *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2007 y 2008).

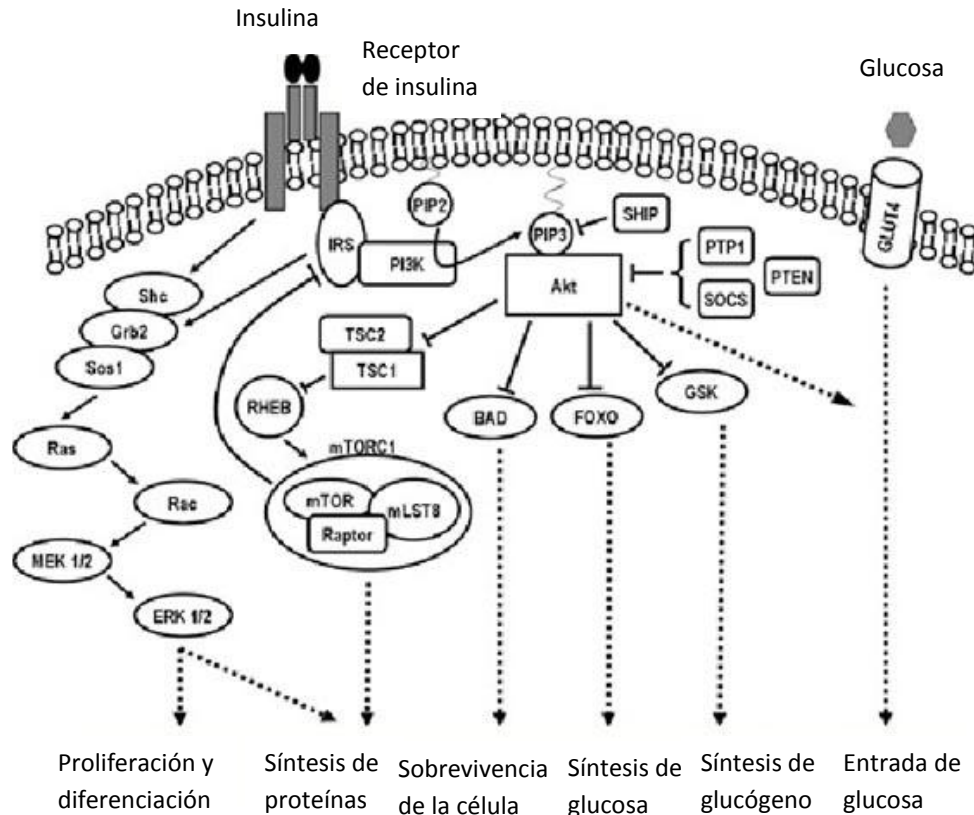


Figura 1.1. Vías de señalización de insulina en el folículo ovárico. Akt, proteínasina para serina/treonina; BAD, proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2; ERK 1/2, proteínasinas reguladas por señales extracelulares; FOXO, factores de transcripción miembros de la familia Forkhead; GLUT4, transportador de glucosa 4; Grb2, proteína adaptadora de unión 2; GSK, proteínasina de la glucógeno sintetasa; IRS, sustrato del receptor de insulina; MEK 1/2, cinasa de MAPcinasa; mLST8, proteína vinculada a mTOR; mTOR, proteínasina serina/treonina blanco en mamíferos de la rapamicina; mTORC1, complejo sensible a mTOR1; PI3K, cinasa de fosfato de inositol 3; PIP2, fosfatidilinositol 4, 5-difosfato; PIP3, fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato; PTEN, fosfatasa y homólogo de la tensina; PTP1, protein-tirosina-fosfatasa 1; Rac, proteína GTPasa; Ras, proteína G de unión a GTP; RHEB, proteína GTPasa; SHIP, fosfatasa de inositol con homología a SRC; Shc, proteína de colágeno homóloga; SOCS, supresor de la señalización de citoquinas; Sos 1, factor intercambiador de nucleótidos; TSC1, proteína de esclerosis tuberal 1; TSC2, proteína de esclerosis tuberal 2. Las flechas indican las vías de estimulación, las terminaciones "T" indican las vías inhibitorias, y las líneas discontinuas indican los acontecimientos terminales en una vía. Adaptado de Scaramuzzi *et al.*, 2010b.

Hay por lo menos dos maneras en que la insulina cumple su papel en la foliculogénesis. La primera es que la insulina tiene funciones esenciales no específicas en el mantenimiento de la integridad y salud de las células foliculares, como lo hace en todas las demás células. Segundo, el sistema de insulina-glucosa también puede tener efectos específicos en las células de la granulosa y de la teca. Esta última posibilidad está apoyada en evidencias derivadas principalmente de estudios *in vitro* que muestran que la insulina tiene acciones específicas durante la foliculogénesis y hasta efectos gonadotrópicos directos (Poretsky y Kalin, 1987). En estudios *in vitro*, en medio de cultivo con células de la granulosa de folículos bovinos, se demuestra cómo IGF-I e insulina interactúan con FSH para estimular la producción de estradiol por estas células (Gutiérrez *et al.*, 1997b). Datos de estudios *in vivo* han demostrado que la insulina o tratamientos que incrementan la insulina de forma aguda, aumentaron el número de folículos y disminuyeron la expresión de aromatasa en células de la granulosa (Somchit, 2008; Gallet *et al.*, 2009) y las concentraciones circulantes de estradiol (Peluso *et al.*, 1991; Letelier *et al.*, 2008; Gallet *et al.*, 2009).

Vía de las hexosaminas

La vía de las hexosaminas ha sido propuesta como un sensor celular del estatus energético (Marshall *et al.*, 1991), que puede ser un mediador en los efectos de la glucosa sobre la expresión de diversos genes. Luego del consumo de alimento y de la fosforilación de glucosa a glucosa 6 fosfato, la glucosa se utiliza en dos vías principales, la síntesis de glucógeno y la síntesis de ATP vía glicólisis o vía del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Sin embargo, una pequeña cantidad de glucosa se convierte a fructosa 6-fosfato, que entra a la vía biosintética de las hexosaminas; el primer paso en esta vía es la conversión de fructosa 6 fosfato en glucosamina 6 fosfato por la enzima glutamin fructosa- 6-fosfato amidotransferasa. El producto final de esta vía es la UDP-N-acetil

glucosamina (UDP-Glc-NAc), principal sustrato para la glicosilación de proteínas. (Ver figura 1.2) (Scaramuzzi *et al.*, 2010b).

La entrada de glucosa a la vía de las hexosaminas regula la expresión de algunos genes, cuyos productos tienen efectos en la función folicular. Entre ellos están TGF α y FGF2, tanto TGF α como FGF2 inhiben a la aromatasa *in vitro* (Harlow *et al.*, 1995) y la secreción de 17 β estradiol *in vivo* (Campbell *et al.*, 1994; Scaramuzzi y Downing 1995). Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2004) mostraron que la infusión de glucosamina en ovejas por 3 días incrementó el número de folículos grandes y postularon a esta vía sensora de nutrientes como mediadora de la foliculogénesis estimulada por la nutrición.

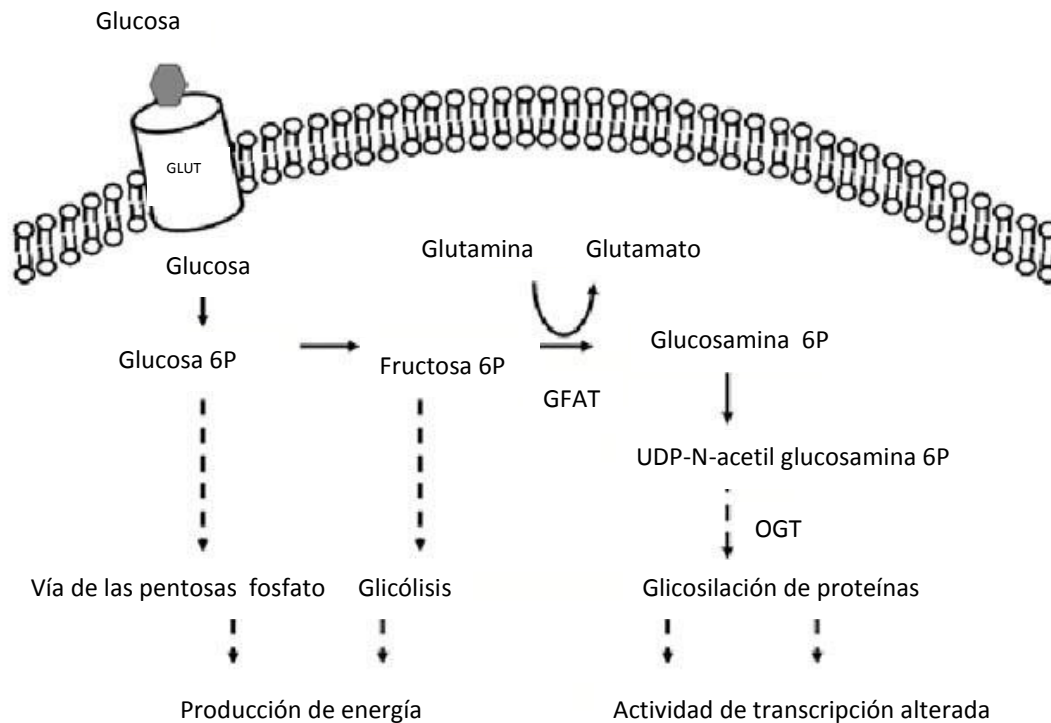


Figura 1. 2. Vía de biosíntesis de hexosaminas y otras vías metabólicas de glucosa en el folículo. GFAT, enzima glutamina fosfato amido transferasa; OGT, enzima O- glucosamil-N-acetiltransferasa. Adaptado de Scaramuzzi *et al.*, 2010b.

Sistema de IGF

El sistema de IGF está compuesto por dos ligandos, (IGF-I e IGF-II), dos receptores, (IGF-IR, IGF-IIR), 8 proteínas de unión para IGF (IGFBP-1, 2, 3, 4, 5 y 6) y al menos una proteasa para las IGFBPs (Kostecka y Blahovec, 1999; Monget *et al.*, 2002).

El IGF-I está relacionado con el crecimiento folicular y es un potente estimulador de la proliferación y de la secreción de esteroides a nivel folicular en la mayoría de las especies. Experimentos llevados a cabo con un análogo como IGF-LR3 muestran los efectos estimulatorios a corto plazo sobre la esteroidogénesis folicular y los efectos estimulatorios a largo plazo sobre la proliferación folicular, que conllevan a una hipersecreción de estradiol por el ovario (Gutiérrez *et al.*, 1997b; Scaramuzzi *et al.*, 1999; Scaramuzzi *et al.*, 2006).

La acción del IGF-I sobre el folículo es estimular la proliferación y la esteroidogénesis folicular. Gong *et al.* (2002) indican que en vacas posparto en condiciones de balance energético negativo, las concentraciones sanguíneas de IGF son bajas y, por lo tanto, la foliculogénesis y la secreción de esteroides se encuentran suprimidas.

La producción folicular de IGF-I parece estar limitada a pequeños mamíferos, como los roedores, con ciclos estrales muy cortos o a especies como el cerdo, con alta tasa de ovulación (Hernández 1995; Zhou *et al.*, 1996). Sin embargo, los folículos de mamíferos como la vaca, la oveja y la mujer no producen cantidades significativas de IGF-I (Bondy *et al.*, 1993; Perks *et al.*, 1995; Perks *et al.*, 1999; Mazerbourg *et al.*, 2003; Hastie *et al.*, 2006). Ya que el mecanismo de retroalimentación que controla la secreción hepática de IGF-I no incluye al ovario, las acciones intrafoliculares de IGF-I deben controlarse localmente. Al respecto, en estudios de suplementación de corto tiempo con infusión de glucosa o consumo de grano lupino, no se encontraron cambios en las concentraciones sanguíneas de IGF-I en los animales tratados comparados con los animales controles y en

relación al sistema intrafolicular de IGF-I, se suprimió la acción de IGF-I al disminuir la expresión para RNAm de IGF-IR e IGFBP-5 y aumentar la expresión de RNAm para IGFBP-2 (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002, 2004, 2005). Se postula que el efecto de la suplementación en el sistema de IGF es reducir las acciones foliculares de IGF-I a través de las acciones intrafoliculares de IGF-II y de proteínas de unión para IGFs, como las IGFBP 2, 4 y 5, que actúan para controlar la biodisponibilidad de IGF-I en el folículo (Scaramuzzi *et al.*, 2006).

Por su parte, Viñoles *et al.* (2005) proponen que una suplementación de corto plazo causa aumentos en las concentraciones sanguíneas de IGF-I y proponen que IGF-I probablemente actúa a nivel ovárico promoviendo el crecimiento folicular debido a una disminución local de las IGFBPs.

La administración exógena de IGF-I en un modelo de ovario autotransplantado en oveja indujo una hiperestimulación de la foliculogénesis y de la secreción folicular de estradiol e inhibina (Scaramuzzi *et al.*, 1999). Bajo condiciones fisiológicas, la actividad del IGF-I es mantener en límites precisos y a través de sistemas intrafoliculares una sobreactividad del IGF-I intrafolicular (Scaramuzzi *et al.*, 2010b).

Sistema de leptina

La leptina es una hormona proteica producida en las células adiposas (Dyer *et al.*, 1997), que afecta la función reproductiva. Esta hormona actúa directamente en el hipotálamo para regular el consumo, el balance energético de todo el cuerpo y tiene una acción directa a nivel ovárico (Spicer *et al.*, 2003). Las concentraciones plasmáticas de leptina varían con cambios agudos en la nutrición y están correlacionadas con la grasa corporal en la oveja (Blache *et al.*, 2000).

Existe una relación entre insulina y leptina, ya que la insulina estimula la secreción de leptina por los adipocitos. La insulina es una hormona anabólica, que

interviene en el metabolismo intermediario de carbohidratos, lípidos y proteínas. Así, al promover la lipogénesis puede, de una manera indirecta, incrementar la producción de leptina (Poretsky *et al.*, 1999). Hay evidencias que indican que las concentraciones de leptina incrementan 2-8 horas después de una comida, lo que indica la asociación entre insulina y leptina (Marie *et al.*, 2001).

Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2002) observaron un aumento en las concentraciones plasmáticas de insulina y leptina en ovejas que consumieron grano lupino. Las concentraciones plasmáticas de leptina se incrementaron 24 horas después de comenzar la suplementación y permaneció alta por otras 72 horas. En otro estudio de suplementación corta por 6 días en ovejas, también se consignaron incrementos en las concentraciones sanguíneas de insulina y leptina (Viñoles *et al.*, 2005).

En el mismo sentido, se ha comprobado la presencia del sistema de leptina en ovarios de ovejas. Trabajos realizados por Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2005) y Pisani *et al.* (2008) han detectado RNAm para el receptor de leptina (ObRb) en el folículo de oveja. En ovejas suplementadas por 5 días con infusiones de glucosa o con grano lupino en su dieta se incrementó el número de folículos con RNAm para ObRb. Algunos experimentos también han revelado que la leptina inhibe la secreción *in vivo* de estradiol y estimula la foliculogénesis durante la fase folicular del ciclo estral. La inmunización pasiva contra leptina tuvo el efecto opuesto de incrementar la secreción de estradiol (Kendall *et al.*, 2004; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2005); aunque la infusión directa de leptina en la arteria ovárica redujo la secreción de estradiol (Kendall *et al.*, 2004).

In vitro, la leptina muestra un efecto bifásico en la esteroidogénesis. En células de la granulosa (Campbell *et al.*, 1999b) la leptina en concentraciones bajas tuvo acción estimulante, mientras que a dosis altas resultó inhibidora.

La inhibición que produce la leptina sobre la secreción de estradiol aparentemente puede involucrar al sistema de IGF. La inmunoneutralización de

IGF-I revirtió los efectos inhibitorios de la leptina en la secreción de estradiol (Sirotkin *et al.*, 2005). Además, la leptina inhibió el efecto de IGF-I en la secreción de estradiol estimulada por FSH en las células de la granulosa (Zachow y Magoffin, 1997; Spicer *et al.*, 2000), e inhibió el efecto de IGF-I en la producción de androstenediona estimulada por LH en las células de la teca (Spicer *et al.*, 2000).

En el bovino, se ha demostrado que las concentraciones circulantes de leptina se relacionan con la condición corporal (Leon *et al.*, 2004). Adicionalmente, las concentraciones de leptina en vaquillas aumentan con cada punto que aumente la condición corporal y este aumento está asociado con folículos dominantes más grandes, aumento en la tasa de crecimiento folicular, persistencia del folículo dominante y mayor número de folículos reclutados (Leon, 2003).

Vía de señalización por Cinasa de monofosfato de adenosina (AMPK)

La AMPK es una cinasa serina /treonina que es activada por un incremento en la relación de monofosfato de adenosina (AMP)/Adenosintrifosfato (ATP) y está asociada con un agotamiento de ATP en respuesta a estrés ambiental y nutricional (Hardie, 2004).

En tejidos periféricos, la AMPK está involucrada en diversas vías metabólicas intracelulares, como la entrada de glucosa, glicólisis, oxidación de ácidos grasos y síntesis de esteroides (Carling *et al.*, 1987).

La AMPK también está implicada en la función ovárica en diversas especies, ya que ha sido identificada en células de la granulosa, células de la teca y en ovocitos (Tosca *et al.*, 2008). En células de la granulosa *in vitro*, en vacas, dos activadores de la AMPK, como el 5-imidazol-4-carboxamida-1-beta-d-ribofuranosida (AICAR) y N, N-dimetilimidodicarbonimidico diamida (metformina) inhibe tanto la secreción de estradiol como de progesterona (Tosca *et al.*, 2008) y

en células de la granulosa aisladas de ovarios de rata inmaduras la AMPK inhibió la proliferación celular inducida por FSH (Kayampilly y Menon 2009). Estos efectos están asociados a la inhibición de la vía de señalización de proteincinasa activada por mitógeno y la cinasa regulada extracelularmente (MAPK; ERK1/2).

Muchas de las hormonas metabólicas y algunos metabolitos involucrados en la reproducción, tales como glucosa, leptina y, en menor grado, resistina, adiponectina y ghrelina, pueden actuar a través de la cascada de señalización de AMPK (Mitchell *et al.*, 2005).

Ácidos grasos- Receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPARs)

Hay evidencia de que los ácidos grasos insaturados tienen también un papel en la regulación de la reproducción y, más concretamente, en la función ovárica. En el ganado vacuno, la suplementación dietética con ácidos grasos poliinsaturados produjo cambios en la calidad del ovocito y en varios aspectos de la foliculogénesis. Por ejemplo, aumentó el número total de folículos y el tamaño del folículo dominante (Staples *et al.*, 1998).

Los PPAR son una familia de tres factores de transcripción, α , β , y γ , activados por un ligando, que comparten una estructura común con receptores de hormonas esteroides y están implicados en la regulación del balance energético y metabolismo de los lípidos y actúan como sensores, informando a las células acerca del estatus energético.

Los ligandos endógenos para PPAR γ son compuestos lipofílicos (Komar, 2005), como ácidos grasos poliinsaturados y eicosanoides derivados directamente de la dieta o a través de metabolismo. Algunos ligandos sintéticos para PPAR γ incluyen las tiazolidinedionas (TZDs), una clase de agentes sensibilizadores a la insulina (Forman *et al.*, 1996).

En varias especies, las tres isoformas de PPAR se han detectado en el ovario: PPAR γ se expresa fuertemente en las células de la granulosa y en menor medida, en las células de la teca y el cuerpo lúteo de los roedores y rumiantes (Dupont *et al.*, 2008). El tratamiento con TZD ha producido efectos contradictorios en la secreción de esteroides ováricos (inhibición o estimulación de progesterona y estradiol) en las células de la granulosa. Las TZDs estimulan la secreción *in vitro* de progesterona y estradiol por las células de la granulosa (Komar *et al.*, 2001), mientras que inhiben la secreción de estos esteroides en las células de la granulosa humana (Mu *et al.*, 2000). En ratones, la ausencia de PPAR γ en los ovarios reduce la fertilidad, pero no tuvo efectos sobre la foliculogénesis o tasa de ovulación; sin embargo, hubo menos embriones implantados, probablemente debido a la menor producción de progesterona por el cuerpo lúteo (Cui *et al.*, 2002).

En resumen, aunque el efecto de la nutrición sobre la foliculogénesis y los mecanismos involucrados no se conocen completamente, se estudian dos teorías. Scaramuzzi *et al.* (2006) encontraron que en ovejas suplementadas por 5 días con una infusión intravenosa de glucosa o con grano lupino aumentaban la tasa ovulatoria, la población de folículos pequeños (<3.5mm) (aunque sin cambios en los animales con infusión de glucosa), el número de folículos grandes (>3.5 mm), las concentraciones de FSH de manera transitoria y las concentraciones circulantes de insulina y leptina; disminuían la secreción de estradiol e inhibina, y las concentraciones de hormona del crecimiento, y no se modificaban las concentraciones de IGF-I. En relación con la expresión génica, señalan que la suplementación estimula el sistema intrafolicular de glucosa-insulina y aumenta la entrada de glucosa, pero el sistema de IGF-I está inhibido, la expresión de RNAm para IGF-IR e IGFBP-5 disminuída y el RNAm para IGFBP-2 aumentado. Por otra parte, el sistema intrafolicular de leptina se encuentra estimulado, con incrementos de RNAm para leptina y su receptor. Estos investigadores postulan que el aumento en las concentraciones de leptina inducido por los suplementos de corta

duración disminuye la capacidad del IGF-I para estimular la producción folicular de estradiol. Esto, por lo tanto, disminuye el mecanismo de retroalimentación negativo ejercido por el estradiol, permitiendo un aumento en la concentración de FSH y el desarrollo de más folículos (Ver figura 1.3) (Kendall *et al.*, 2004; Scaramuzzi *et al.*, 2006).

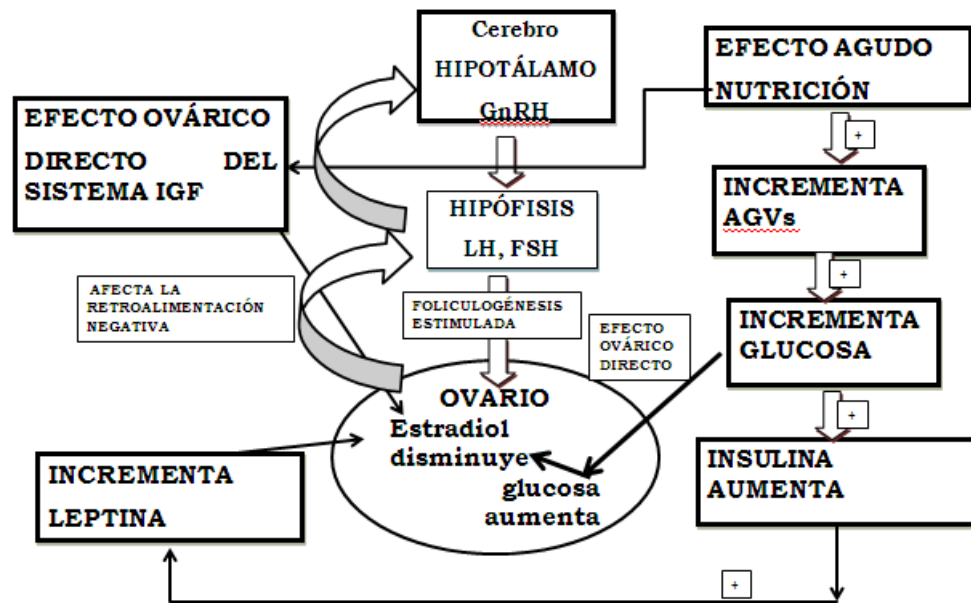


Figura 1. 3. Modelo para la regulación nutricional de la foliculogénesis y la tasa ovulatoria en ovejas. Adaptado de Scaramuzzi *et al.*, 2006.

Por su parte, Viñoles *et al.* (2005) proponen que la respuesta a la suplementación nutricional está mediada por la acción directa de la glucosa, insulina, leptina e IGF-I, y probablemente otras hormonas metabólicas, sobre los folículos ováricos (Muñoz-Guérrez *et al.*, 2002, 2004, 2005; Scaramuzzi *et al.*, 2006). Estos estímulos metabólicos parecen ejercer sus efectos durante las fases finales de crecimiento de los folículos dominantes, cuando las concentraciones de FSH son bajas, pero altas concentraciones de glucosa y hormonas metabólicas aumentarían la respuesta de los folículos a la FSH. Esto permite a los folículos

continuar creciendo a pesar de que el apoyo gonadotrópico haya disminuido. De igual forma, sostienen que el efecto de la nutrición no implica cambios en el sistema de retroalimentación hipófisis-hipotálamo-gónada (Ver Figura 1.4).

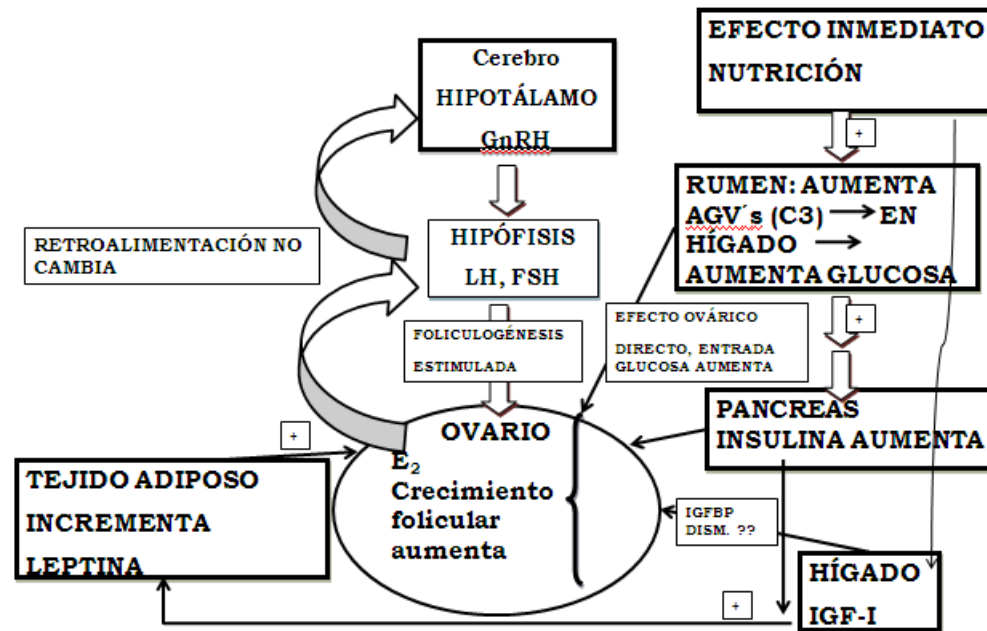


Figura 1.4. Representación esquemática del efecto inmediato de la nutrición sobre la actividad ovárica en la oveja. Adaptado de Viñoles *et al.*, 2005.

Aunque no está completamente entendido el mecanismo de acción de la nutrición sobre la reproducción, las evidencias encontradas indican que tiene efectos directos a nivel ovárico (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2004), es independiente de las concentraciones de gonadatropinas (Downing *et al.*, 1995a; Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002) y se relaciona con un incremento en los niveles sanguíneos de glucosa e insulina (Downing *et al.*, 1995; Martínez 2004; Viñoles *et al.*, 2005).

Scaramuzzi *et al.* (2010b) proponen ciertos mecanismos y vías integradoras entre los diferentes sistemas analizados, que consisten en una cascada de múltiples y divergentes vías de señalización intracelular, que modifican una amplia

gama de funciones celulares y que se activa cuando las gonadotropinas estimulan las células foliculares (Richards *et al.*, 2002; Hunzicker-Dunn y Maizels 2006). Es importante destacar que la insulina y el IGF-I también pueden activar estas vías, con excepción de la vía AMPc-PKA. Por lo tanto, es posible que la insulina y el IGF-I puedan modificar muchas de las respuestas de las células a FSH y viceversa. Detalles de las vías intrafoliculares de señalización de la insulina están empezando a surgir, pero el conocimiento de cómo las vías de señalización de la insulina interactúan e influyen en la esteroidogénesis estimulada por gonadotropinas es especulativo (Fig. 1. 5). En estudios recientes, se ha observado que un estímulo nutricional a corto plazo con grano de lupino aumentó el IRS-2 y el IRS-4 en las células de la granulosa, pero redujo la aromatasa (Somchit, 2008). En otro experimento, una infusión a corto plazo de glucosa aumentó el número total de folículos, pero disminuyó el nivel de Akt fosforilada y AMPK, así como la aromatasa en lisados de células de la granulosa (Gallet *et al.*, 2009).

Nuestro limitado conocimiento del efecto de la nutrición sobre el desarrollo folicular y los perfiles hormonales impiden que una suplementación particular sea aplicada en forma masiva por los productores (Martin *et al.*, 2004). Hasta que no podamos explicar esta variación la suplementación de corto plazo es demasiado impredecible para ser incorporada dentro del manejo comercial de los rebaños.

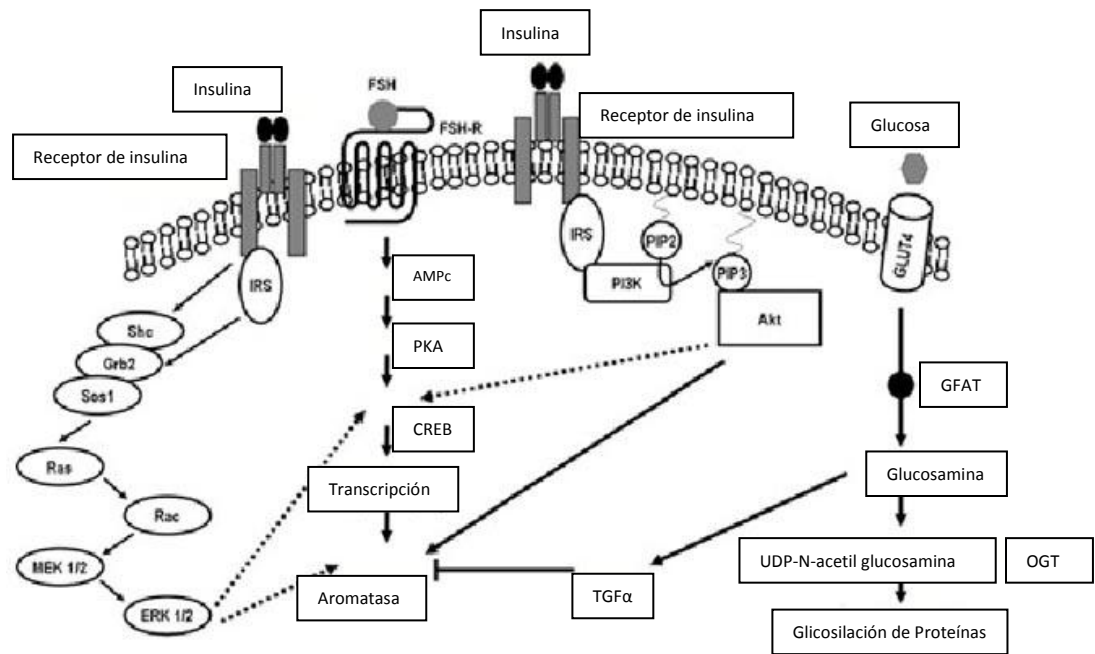


Figura 1.5. Sitios establecidos (líneas sólidas) y potenciales (líneas discontinuas) entre las vías de señalización de FSH (PKA-AMPc) e insulina (ERK y PI3K) en células de la granulosa y vías de comunicación cruzada entre la vía de señalización de FSH y la vía de hexosaminas. Akt, proteínquinasa de serina/treonina; AMPc, monofosfato de adenosina; CREB, proteína de unión con el elemento de respuesta al AMPc; ERK 1/2, proteínquinas reguladas por señales extracelulares; FSH, hormona foliculoestimulante; FSH-R, receptor de FSH; Grb2, proteína adaptadora; GFAT, enzima glutamina fosfato amido transferasa; IRS, sustrato del receptor de insulina; OGT, enzima O-glucosamil-N-acetil transferasa; MEK 1/2, cinasa de MAP cinasa; PI3K, cinasa de fosfato de inositol 3; PIP2, difosfato de inositol; PIP3, trifosfato de inositol; PKA, proteínquinasa A; Rac, proteína GTPasa; Ras, proteína G de unión a GTP; Shc, proteína de colágeno homóloga a Src; Sos 1, factor intercambiador de nucleótidos; TGF α , factor de crecimiento transformante alfa. Adaptado de Scaramuzzi *et al.*, 2010b.

USO Y METABOLISMO DE SUSTANCIAS GLUCOGÉNICAS EN RUMIANTES

Algunas de las sustancias glucogénicas que se han utilizado en la dieta de los rumiantes incluyen al glicerol y al propilenglicol y algunas soluciones de mezclas entre ellas.

El glicerol o propanotriol es un alcohol que puede obtenerse de la producción de biodiesel y por hidrólisis de triglicéridos y, aunque en general se utiliza para productos de cuidado personal y alimentos, algunos autores mencionan que el exceso de producción podría dirigirse a la alimentación de los rumiantes (Schroeder y Sudekum, 1999; Trabue *et al.*, 2007).

En el mismo sentido, los estudios con relación a la utilización del propilenglicol o propanodiol, que puede obtenerse del glicerol, también mencionan su uso como aditivo alimenticio energético en la dieta de rumiantes por sus propiedades anticetogénicas y glucogénicas (Rémond *et al.*, 1993; Kristensen y Raun, 2007; Trabue *et al.*, 2007).

Hippen *et al.* (2008) mencionan que la adición de glicerol a las dietas de vacas en período de transición mejora las características de fermentación y eficiencia de la alimentación, mejora la palatabilidad de los alimentos, incrementa el consumo de agua y es un suplemento esencialmente energético, que incrementa las concentraciones sanguíneas de glucosa. Por su parte, el propilenglicol es usado comúnmente como aditivo en vacas lecheras en lactación temprana para disminuir las concentraciones sanguíneas de ácidos grasos libres y betahidroxibutirato e incrementar las concentraciones sanguíneas de insulina (Nielsen y Ingvarzen, 2004; Chiofalo *et al.*, 2005). Sin embargo, el uso de propilenglicol por períodos largos y en dosis mayores a 500 g/día, debe hacerse con precaución, ya que altas concentraciones de esta sustancia pudieran ser tóxica para algunos microorganismos ruminales (Trabue *et al.*, 2007).

La utilización del glicerol y propilenglicol como precursores glucogénicos se ha basado en algunos estudios *in vitro* e *in vivo*, en los cuales se menciona que aumentan el ácido propiónico como producto de su fermentación (Johns 1953, Garton 1961; Emery *et al.*, 1967; Kristensen y Raun 2007, Rémond *et al.*, 1993). El propionato es el único ácido graso volátil glucogénico; se estima que puede ser extraído de la sangre por el hígado con un 95% de eficacia (Bergman, 1990) y se considera la principal fuente de energía para el rumiante. De lo anterior, se deduce que en la práctica veterinaria se haya adoptado el uso de precursores glucogénicos, como propionato de calcio (Goff *et al.*, 1996), propilenglicol, glicerol y combinaciones de algunos de ellos, para incrementar la glucosa y, principalmente, para resolver problemas en vacas lecheras en período de transición o lactancia temprana, como disminuir los efectos del balance energético negativo causado por las altas demandas energéticas de la producción de leche y el desorden metabólico que en algunos casos esto conlleva (Hippen *et al.*, 2008; Rukkwamsuk *et al.*, 2005).

La fermentación ruminal y el metabolismo del glicerol y del propilenglicol difieren. La administración oral del glicerol puede resultar en su fermentación ruminal y ser convertido a propionato. Si el glicerol es absorbido o administrado directamente a la circulación puede ser convertido a glucosa en el hígado, entrando a una vía glucogénica al nivel de la dihidroxiacetona fosfato y 3 fosfogliceraldehído. La ventaja que se le atribuye al glicerol como precursor glucogénico es que entra en rutas metabólicas más cercanas a la glucosa, específicamente en la vía de las triosas fosfato. En el mismo sentido, el propilenglicol tiene actividad glucogénica si es fermentado a propionato en el rumen o si es absorbido y metabolizado en hígado. El metabolismo hepático del propilenglicol depende principalmente de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, enzima que se encarga de la conversión de lactato, sustrato común en la gluconeogénesis en rumiantes, en piruvato; el piruvato restaura el ciclo del ácido cítrico, permitiendo que la gluconeogénesis aumente (Hippen *et al.*,

2008; Nielsen e Ingvarsten, 2004). Además de promover un aumento en ácido propiónico y entrar en rutas gluconeogénicas que dan como resultado glucosa, de igual forma, se ha señalado que tanto el glicerol como el propilenglicol aumentan las concentraciones sanguíneas de glucosa (Linke *et al.*, 2004; Martínez 2004; Chung *et al.*, 2007) e insulina en la sangre (Aguilar 2006, Butler *et al.*, 2006; Nielsen y Ingvarsten, 2004).

Otro ingrediente energético que se utiliza en la alimentación de los rumiantes es la melaza. La melaza es fuente concentrada de carbohidratos rápidamente fermentables en forma de azúcares simples (Wiedmeier *et al.*, 1992) y como subproducto de la industria azucarera, se usa en la alimentación del ganado para mejorar la palatabilidad y reducir el polvo en los alimentos. Cuando la melaza se incluye en cantidades por encima del 15%, se reduce el propionato y hay un incremento anormal de ácido butírico (Marty y Preston, 1970; Olbrich y Wayman, 1972). Sin embargo, niveles más bajos en la dieta no modifican el patrón de fermentación que es similar al observado con dietas altas en granos (Martin y Wing, 1966; Hatch y Beeson, 1972).

CAPÍTULO 2

Producción de gas *in vitro* y fermentación ruminal de glicerol, propilenglicol y melaza

Artículo publicado:

Animal Feed Science and Technology 154 (2009) 112–118

Short communication

In vitro gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses

S.M. Ferraro^{a,b}, G.D. Mendoza^{c,*}, L.A. Miranda^d, C.G. Gutiérrez^a

^a *Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Mexico*

^b *Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela, Mexico*

^c *Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México DF, Mexico*

^d *Universidad Autónoma de Chapingo, Laboratorio Microbiología Ruminal, Chapingo, Mexico*



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Feed Science and Technology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/anifeedsci



Short communication

In vitro gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses

S.M. Ferraro^{a,b}, G.D. Mendoza^{c,*}, I.A. Miranda^d, C.G. Gutiérrez^a

^a Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, México

^b Universidad Comarcional Tuxtla Altamira, Veracruz, México

^c Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México D.F., México

^d Universidad Autónoma de Chapingo, Laboratorio Microbiología Ruminal, Chapingo, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2008

Received in revised form 2 June 2009

Accepted 22 July 2009

Keywords:

Glycerol

Propylene glycol

Molasses

Ruminal fermentation

ABSTRACT

Ruminal fermentation pattern and *in vitro* gas production was determined for three energy sources for ruminants: glycerol, propylene glycol and molasses with ruminal fluid from sheep. Substrates incubated were alfalfa, corn silage, glycerol (320 and 640 μ l), propylene glycol (320 and 640 μ l) and molasses (320 μ l). The greater volume of gas produced was observed at the highest dose of glycerol which also showed the slowest rate of gas production and the longest lag time ($P<0.05$). Propylene glycol presented the minor volume of gas and was rapidly metabolized with short lag time. Molasses presented typical characteristics of a rapidly available substrate, with the fastest rate of gas production ($P<0.05$). Glycerol fermentation resulted in a reduction of acetate, a slight increase in propionate and an increment in percentage of butyrate. Incubations with propylene glycol also reduced acetate and butyrate, but increased propionate ($P<0.05$). Molasses fermentation reduced acetate and increased propionate and butyrate. Increasing dose of energy sources resulting in a greater volume of gas produced. In conclusion, glycerol fermentation reduced acetate and increased the molar proportion of butyrate and propionate was the main product of fermentation of propylene glycol.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: V, total volume of gas produced; p, volume; s, rate of gas production; t, time; L, lag time; VFA, volatile fatty acid.

* Corresponding author. Tel.: +52 5656225856; fax: +52 5656225856.

E-mail address: gmendoza@correo.xoc.uam.mx (C.G. Gutiérrez).

0377-8401/\$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.anifeedsci.2009.07.009

1. Introduction

Glycerol, propylene glycol and molasses are substances often used as energy additives in ruminant nutrition. Glycerol and propylene glycol in particular, are used for their glycogenic and anti-ketogenic properties (Rémond et al., 1993; Kristensen and Ravn, 2007). In dairy cows, their addition in early lactation decreased non esterified free fatty acids and β hydroxybutyrate whilst increasing blood glucose concentrations. (Nielsen and Ingvarsen, 2004; Chiofalo et al., 2005). Furthermore, propylene glycol is also used to reduce the risk of fatty liver in dairy cows during the transition period (Rukkwamsuk and Rungruang, 2005).

Glycerol or propanetriol is ingested by ruminants with phospholipids in the cell wall or lipids in the seeds and is part of the lipidic fraction of the diet (Roger et al., 1992). Glycerol has been used as an energy source for the prevention of ketosis in dairy cattle (Griffiths, 1952; Johnson, 1954; Roger et al., 1992; Rémond et al., 1993) and as a feed additive in beef and dairy cattle (Parsons et al., 2009; Roger, 1992). Glycerol is considered to be rapidly fermented within the rumen thus its low concentration as free glycerol in ruminal fluid (Wright, 1969; Rémond et al., 1993). However, there is scarce information regarding the rate of fermentation and its fermentation products. There is some controversy regarding to the biochemical pathway and the end products of glycerol fermentation by ruminal microbes. Some authors have proposed that propionic acid is the main volatile fatty acid derived from glycerol, supporting the glycogenic role of glycerol in ruminants (Johns, 1953; Carlton 1961).

Trabue et al., 2007 studied the fermentation of propylene glycol and glycerol in anaerobic conditions *in vitro*. They found that after 24 h of culture all propylene glycol and approximately 80% of glycerol were metabolized. Addition of glycerol and propylene glycol decreased acetate formation, while addition of propylene glycol increased propionate formation but decreased butyrate. The main routes of disappearance of them from the rumen are absorption and fermentation (Nielsen and Ingvarsen, 2004). In addition, fermentation of propylene glycol may produce sulfur-containing gases which may contribute to the toxic effects seen in cattle when high doses are administered for therapeutic purposes (Trabue et al., 2007).

Molasses is a byproduct of the sugar cane industry used widely in ruminants as a source of soluble carbohydrates, rapidly fermentable in the rumen, improves food palatability and reduces dustiness (Wiedmeier et al., 1992). The effects of molasses on VFA production is related to its level in the diet. Lower dietary levels of molasses (<15% DM) do not modify the fermentation pattern and VFA production is similar to that observed with grain diets (Martin and Wing, 1965; Hatch and Deeson, 1972) with the desirable production of propionate as gluconeogenic substrate for the liver. In contrast, when molasses inclusion exceeds 15%, propionate production is reduced and an abnormal increment in butyric acid is observed (Marty and Preston, 1970; Olrich and Wayman, 1977).

Recently, biodiesel production has increased and with it the availability of, its byproduct, glycerol (Trabue et al., 2007). Schroeder and Sudekum, 1999 suggest that surplus glycerol could be incorporated as a feed additive and perhaps may play a new role as an energy ingredient in ruminant feeds considering that grains costs are rising.

Therefore, we characterized the fermentation pattern of glycerol propylene glycol and molasses using *in vitro* gas production including the production of volatile fatty acids.

2. Materials and methods

2.1. Substrates for fermentation

Samples of alfalfa and corn silage were oven dried at 60°C for 24 h and ground (1 mm). Alfalfa (0.5 g), corn silage (0.5 g), and liquid additives glycerol (90% wt/v), propylene glycol (90% wt/v) and molasses were incubated in two inclusion levels (320 and 640 μ l) in 90 ml total volume, equivalent to 0.36 and 0.72 g of glycerol, 0.30 and 0.60 g of propylene glycol, and 0.480 g of molasses.

2.2. Culture medium

The culture medium described by Cubas and Yokoyama, 1995 consisted of: (a) mineral solution I (6.0 g K_2HPO_4 per liter of distilled water); (b) mineral solution II (6.0 g KH_2PO_4 ; 6.0 g $(NH_4)_2SO_4$;

12.0 g NaCl, 2.45 g $MgSO_4$ and 1.6 g $CaCl_2 \cdot H_2O$ per liter of distilled water); (c) Sodium carbonate buffer solution at 8%; (d) Cysteine sulphur reduced solution (2.5 g of L-cysteine in 15 ml of NaOH (2N), 2.5 g of Na_2S and 0.1 ml of Rezarsurine 1%).

2.3. Inoculum and inoculation

Ruminal fluid was obtained from three Suffolk sheep using a vacuum pump. The ruminal fluid was filtered through layers of gauze, and maintained at 39 °C until inoculation. The ruminal fluid was added to the culture medium to a 10% final dilution (Menke and Steingass, 1988). Samples (500 mg) of dry feedstuffs or liquid additives (320 or 640 μ l) were accurately weighted into 120 ml flasks and fitted with stoppers and sealed. Buffered ruminal fluid (90 ml) was pipetted into each flask containing the samples, and immediately placed into the water bath at 39 °C. Blank samples contained only buffered ruminal fluid.

2.4. Gas production

At determined times of incubation a needle connected to a pressure gauge with a scale 0–1 $kg\ cm^{-2}$ was inserted through the stopper, and the gas pressure was recorded at 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 26, 32, 44, 56, 68, 80 and 92 h of culture. The units of pressure ($kg\ cm^{-2}$) were transformed to volume and the cumulative gas production was adjusted to the model proposed by Menke and Steingass, 1988: $Y = v(1 - \exp(-k \times (t - L)))$, where Y = total volume of gas produced, v = volume, k = rate of gas production, t = time and L = lag time.

2.5. Volatile fatty acid concentration

Samples of 1 ml of culture fluid were collected from the flasks at 0, 12 and 26 h of fermentation, and were acidified with 4 ml of 25% metaphosphoric acid and frozen until analyses. Samples were centrifuged at 2500 $g \times 20$ min and the supernatant was used to determine volatile fatty acid concentration by gas chromatography (Foxlin et al., 1981).

2.6. Statistical analyses

The experiment was performed twice and each assay contained three replicates per substrate tested and their respective blanks. Data were analyzed as a completely randomized block design using the incubation as blocking criteria (repeated twice), using the Proc GLM from SAS (1999). Means were compared with Tukey's test. The VFA concentration was determined in one incubation; therefore, results were analyzed as a Completely Randomized Design (SAS, 1999). Maximum volume, rate of gas production and lag time *in vitro* were estimated with the PROC NLIN BEST (SAS, 1999).

3. Results

Glycerol, propylene glycol and molasses gas production as a result of ruminal bacteria fermentation is shown in Table 1. Glycerol, at both of the concentrations tested, showed the lower rate of gas production ($P < 0.05$) and the largest lag time ($P < 0.05$) of all the substrates tested. In contrast, propylene glycol presented the lowest volume of gas production and was rapidly metabolized (s) with short lag time. Molasses showed a fastest rate of gas production ($P < 0.001$) and the short lag time. Alfalfa fermented more rapidly than corn silage ($P < 0.05$), although both manifested similar initial lag time and final volume.

Volatile fatty acid production after fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses are shown in Table 2. Glycerol fermentation resulted in reduced acetate and increased butyrate concentration ($P < 0.001$), while propionate showed a quadratic ($P < 0.0001$) effect, increasing at 12 h and decreasing at 26 h of incubation. Incubation of propylene glycol reduced acetate and butyrate with time ($P < 0.01$), and increased propionate ($P < 0.001$). Molasses fermentation reduced acetate and increased

Table 1

Cumulative gas production and estimated kinetic parameters model for forages and liquid energetic sources.

Substrate	Maximum volume (V _∞) (ml)	Rate of gas production (λ) (h ⁻¹)	Lag time (T) (h)
Alfalfa	17.18 ^{ab}	0.076 ^b	2.74 ^c
Corn silage	150.6 ^c	0.049 ^d	2.00 ^c
Glycerol 320 μl	176.4 ^d	0.024 ^e	10.22 ^d
Glycerol 640 μl	203.2 ^d	0.019 ^e	12.85 ^d
Propylene glycol 320 μl	22.6 ^{de}	0.052 ^c	1.81 ^d
Propylene glycol 640 μl	20.5 ^{de}	0.057 ^c	2.66 ^d
Molasses 320 μl	161.5 ^{de}	0.061 ^c	1.86 ^d
SEM	4.03	0.001	0.12
R ²	0.98	0.98	0.99
P-value of regression model	0.0001	0.0001	0.0001

^{abcde} Means within column with different superscript differ (P<0.05).

SEM: Standard error of the mean.

Table 2Residual fermentation pattern *in vitro* from forages and energetic sources.

	Alfalfa	Corn Silage	Glycerol		Propylene glycol		Molasses 320 μl
			320 μl	640 μl	320 μl	640 μl	
VFA (mmol/ml)							
Acetate							
0h	745 ^a	721 ^a	717 ^a	748 ^a	731 ^a	707 ^a	732 ^a
12h	721 ^a	696 ^a	667 ^a	659 ^a	664 ^a	599 ^a	674 ^a
26h	712 ^a	419 ^a	517 ^a	539 ^a	423 ^a	426 ^a	673 ^a
SEM	3.49	4.47	4.38	2.63	3.20	1.79	2.64
Propionate							
0h	171 ^a	182 ^a	162 ^a	162 ^a	176 ^a	163 ^a	171 ^a
12h	183 ^a	188 ^a	181 ^a	184 ^a	316 ^b	310 ^b	221 ^a
26h	167 ^a	177 ^a	174 ^a	158 ^a	512 ^b	494 ^b	222 ^a
SEM	3.50	3.95	3.80	2.63	0.26	3.71	2.74
Butyrate							
0h	82 ^a	83 ^a	89 ^a	88 ^a	91 ^a	128 ^a	90 ^b
12h	90 ^a	115 ^a	154 ^b	160 ^b	88 ^a	80 ^a	144 ^a
26h	87 ^a	206 ^b	282 ^b	302 ^b	63 ^a	77 ^a	149 ^a
SEM	2.93	2.99	2.66	2.51	3.27	4.18	3.0
Total VFA (mmol)							
0h	876 ^a	926 ^a	937 ^a	931 ^a	917 ^a	906 ^a	945 ^a
12h	25.04 ^d	34.07 ^d	6.48 ^b	6.76 ^b	6.72 ^b	4.78 ^a	20.39 ^c
26h	28.49 ^d	11.93 ^c	9.83 ^c	8.52 ^c	10.76 ^c	10.15 ^c	23.68 ^c
SEM	0.006	0.072	0.028	0.052	0.055	0.082	0.086

^{abcde} Means within column with different superscript differ (P<0.05).

SEM: Standard error of the mean.

propionate and butyrate (P<0.0001). Alfalfa showed a typical fermentation pattern for forages, but corn silage showed an abnormal butyrate formation after 12 h incubation.

4. Discussion

Glycerol fermentation *in vitro* showed a long lag time and a low gas production. Similarly, propylene glycol had a low gas production. This suggests that both of these compounds exert their glycogenic effects *in vivo* by being absorbed either intact or as propionate. In contrast, molasses had a large gas production and a short lag time, thus it is rapidly converted in the rumen into VFA and thus having lesser glycogenic capacity.

Results from this study indicate that glycerol has a long lag time, and a slow rate of degradation, which contrasts with the results from Rémond et al., 1993 who reported a rapid *in vitro* fermentation,

between 4 and 6 h, in animals fed two weeks previously with glycerol. Results from Trabue et al., 2007 indicate that 80% of glycerol is metabolized by ruminal microbes after 24 h *in vitro*. From the rate of gas production observed in this study it was estimated between 28 and 36 h to produce the half of maximum volume indicating that the fermentation by ruminant microbes is slow. Hence, if glycerol is used as a drench, its fermentation can be slow as observed in this study. However, if glycerol is fed continuously in the diet, the microbial adaptation may change the fermentation kinetics, particularly in the rate of gas production and its lag phase. Therefore, the adaptation of the rumen microbiota may explain the faster rate of degradation and the lack of lag phase reported by Rémond et al., 1993.

With regards to the fermentation pattern, Trabue et al., 2007 also observed that glycerol reduced production of acetate. In post-partum cows, DeFrais et al., 2004 also observed that with a dose of 430 g/d glycerol, acetate tended to be reduced ($P=0.15$), but propionate was increased ($P<0.05$) without changes in butyrate. In cows consuming corn silage diets supplemented with glycerol (Rémond et al., 1993) VFA pattern was similar to the observed in this study. Propionic and butyric acid increased ($P<0.05$) whilst acetic acid concentration decreased. Most of glycerol was fermented to VFA through the glycolic pathway with a minor production of lactate (Trabue et al., 2007), although fermentation of glycerol also produced some amounts of valerate, caproate. Therefore, independent of the rate of fermentation VFA production pattern for glycerol remains similar whether animals had or had not been consuming glycerol previously in the diet.

Kijona et al., 1998 demonstrated that some glycerol can be escaping rumen fermentation, as glycerol content in plasma was significantly higher than in the rumen 12 h following the intraruminal glycerol administration (200 g/d), at days 3 and 7 (glycerol infusion days) compared to day 1 (control, without glycerol). According to the lag phase and the rate of gas production in this study, some amount of glycerol could pass through the rumen, and absorbed in the lower tract to act as glucogenic precursor. Therefore, glycerol in the treatment and prevention of ketosis in dairy cattle, may act either by increasing the pool of propionate or directly as a glucose precursor in the liver (Lin, 1977).

The metabolization of propylene glycol resulted in a greater proportion of propionate, with minimal gas production, suggesting a possible production of lactate from propionate, which has been observed *in vivo* (Kristensen and Rasmussen, 2007). The estimated half time to obtain the maximum gas volume of gas produced from propylene glycol in the rumen was between 11 and 12 h, indicating that most of propylene glycol can be absorbed and used as a glucogenic precursor in the ruminant. These fermentation pattern is similar to that obtained by Trabue et al., 2007 for 5-propylene glycol which was fermented in 24 h, however, the *n*-propylene glycol was metabolized by rumen fluid more rapidly and was depleted after 8 h of incubation. Although, most of propylene glycol is fermented to propionic acid in anaerobic conditions (Velman et al., 1998) it may also be metabolized to propanal forming some sulfur containing materials (Trabue et al., 2007).

Propylene glycol represents an important glucogenic precursor for ruminants. Propionate provides between 27 and 90% of the carbon in the glucose body reserves (Amaral et al., 1990; Chow and Jesse, 1992). Nonetheless, lesser amounts glucose synthesis is also expected from glycerol escaping rumen degradation or that resulting from lipolysis in adipose tissue in fasting animals (Bergman, 1973).

The fermentation pattern of the main VFA from propylene glycol was similar to the observed by Trabue et al., 2007. Propionate concentrations were highest when *n*- and 5-propylene glycol were added, indicating that they were converted to propionate during the fermentation, with reductions in acetate and butyrate concentrations. These *in vitro* results are similar to those obtained *in vivo*. Propylene glycol can be absorbed either in its original form through the rumen wall or first converted to propionate in the rumen before its absorption (Emery et al., 1967). However, propylene glycol infusions into the rumen increased propylene glycol concentration in plasma together with ethanol, propanol, propanal, glucose, L-lactate, propionate, and reduced the plasma concentrations of acetate and β -hydroxybutyrate (Kristensen and Rasmussen, 2007).

Molasses fermentation was characteristic of a rapidly fermented substrate, with a minimum lag time, and high gas production associated to the sucrose concentration (Wiedmeier et al., 1992). There are several studies confirming that ruminal fermentation of molasses increase butyrate (Marty and Preston, 1970; Olbrich and Wayman, 1972), however, specific changes in protozoal population (Bond et al., 1982) or bacteria (Preston, 1982) which explain this particular fermentation pattern has not been found.

5. Conclusions

Glycerol is slowly fermented to propionate by ruminal microbes or absorbed as glycerol escaping from rumen fermentation. Propylene glycol is metabolized at a faster rate than glycerol mainly to propionic acid. In contrast, molasses is rapidly degraded in the rumen, to acetate and butyrate, even when propionate may be increased.

Acknowledgments

This research was supported partially by Pappit IN223907 research grant, UNAM and UAM Xochimilco. We thank the technical assistance of Braulio Sanchez and José Pascual Espinoza at the Microbiology Laboratory of Experimental Unit in the University of Chapinpa, and to Dr. Magda Crosby and Andres Lee at the Laboratory of Animal Nutrition, Colegio de Postgraduados.

References

- Amund, M.D., Veerinkaten, J.J., Drackley, J.K., Covey, M.H., McGilliard, A.B., Young, J.W., 1996. Metabolism of propionate, glucose and carbon dioxide as affected by exogenous glucose in dairy cows at energy equilibrium. *J. Dairy Sci.* 79, 1254–1254.
- Bergman, E.N., 1973. Glucose metabolism in ruminants as related to hypoglycemia and ketosis. *Cornell Vet.* 63, 311–382.
- Bond, J., Iverson, D.O., Gutierrez, J., Warwick, E.J., 1992. Feed intake and gains of beef cattle as affected by source and level of nitrogen in high-energy rations. *J. Anim. Sci.* 74, 728–733.
- Clotfelter, V., Tokoro, M., Dotla, L., Mangalika, S., Manzo, T., Iqbal, G., 2005. Effect of propylene glycol on pre- and postpartum performance by dairy ewes. *Small Ruminant Res.* 58, 107–114.
- Chow, J.C., Jesse, E.W., 1992. Interactions between gluconeogenesis and fatty acid oxidation in isolated sheep hepatocytes. *J. Dairy Sci.* 75, 2142–2148.
- Cobos, M., Yokoyama, M., 1995. *Clostridium paraputrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. Wallen, R., Lahlou-Khalil, A. (Eds.), *Rumen ecology research planning. Proceedings of a Workshop, Addis Ababa, Ethiopia, International Livestock Research Institute*, pp. 151–161.
- Dehrain, J., Hippo, A., Kalscheur, K., Jordan, P., 2004. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. *J. Dairy Sci.* 87, 419–420.
- Emery, R., Brown, R., Black, A., 1967. Metabolism of *n*-1,2-propanediol-2-¹⁴C in a lactating cow. *J. Nutr.* 92, 348–355.
- Erwin, F., Mann, G., Emery, F., 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44, 1765–1771.
- Ganton, G., Leigh, A., Woop, F., 1961. Glycerol hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. *J. Gen. Microbiol.* 25, 215–225.
- Griffiths, W.R., 1957. Treatment of pregnancy toxemia in ewes by oral administration of glycerol. *Vet. Rec.* 64, 714.
- Hatch, C.F., Seeson, W.M., 1972. Effect of different levels of cane molasses on nitrogen and energy utilization in urea rations for steers. *J. Anim. Sci.* 35, 851–858.
- Johns, A., 1953. Fermentation of glycerol in the rumen of sheep. *N.Z. J. Sci. Technol.* 35, 262–269.
- Johnson, R., 1954. The treatment of ketosis with glycerol and propylene glycol. *Cornell Vet.* 44, 6–21.
- Kyortz, C., Bergner, H., Gotz, K.P., Bortel, J., Szlacs, J., Sommer, A., 1998. Investigation on the metabolism of glycerol in the rumen of bulls. *Arch. Tierernähr.* 51, 341–348.
- Kubzenek, N., Rupp, B., 2007. Ruminant and intermediary metabolism of propylene glycol in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4707–4717.
- Lin, E.C., 1977. Glycerol utilization and its regulation in mammals. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 765–795.
- Marlin, R.J., Wing, J.M., 1966. Effect of molasses level on digestibility of a high concentrate ration and on molar proportions of volatile fatty acid produced in the rumen of dairy steers. *J. Dairy Sci.* 49, 846–849.
- Marly, R.J., Preston, T.R., 1970. Molar proportions of the short chain volatile fatty acids (VFAs) produced in the rumen of cattle given high-molasses diets. *Cuban J. Agric. Sci.* 4, 183–186.
- Menke, K.H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from the chemical analysis and the *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.* 28, 0–52.
- Preston, I.R., 1982. Nutritional limitations associated with the feeding of tropical forages. *J. Anim. Sci.* 54, 874–884.
- Nielsen, N., Ingvarsen, K., 2004. Propylene glycol for dairy cows. A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 191–212.
- Ulbricht, S.E., Wynnman, D., 1972. Effect of feeding raw sugar on growth performance and rumen fluid parameters of fattening beef cattle. *J. Anim. Sci.* 34, 820–825.
- Parsons, G.L., Shuler, M.K., Drossillard, S., 2008. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerine. *J. Anim. Sci.* 107, 653–659.
- Wimand, K., Smid, E., Joustra, J.H., 1981. *In vitro* and *in vivo* fermentation of glycerol by rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 41, 121–132.
- Riger, V., Timry, G., Andre, C., Guier, P., 1997. Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulosytic bacteria and anaerobic fungi. *Curr. Microbiol.* 25, 199–201.
- Bakewell, T., Bunting, S., 2005. Effect of propylene glycol on fatty liver development and hepatic fructose 1,6-bisphosphatase activity in periparturient dairy cows. *Law. Prod. Sci.* 95, 95–102.
- SAS, 1999. *SAS User's Guide: Statistics*. SAS Institute, Cary, NC, USA, 956 p.

- Schroeder, A., Sudekum, K., 1999. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: Wratten, N., Salisbury, P.A. (Eds.), *New Horizons for an Old Crop*. Proc. 10th Int. Rapeseed Congr., Canberra, Australia, Paper No.241.
- Trabue, S., Scoggin, K., Tjandrakusuma, S., Rasmussen, M.A., Reilly, P.J., 2007. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7043–7051.
- Velman, S., Schoenberg, T., Switzenbaum, M.S., 1998. Alcohol and acid formation during the anaerobic decomposition of propylene glycol under methanogenic conditions. *Bioregradation* 9, 113–118.
- Wiedmeier, R., Tanner, B., Bair, J., Shenton, H., Arambel, M., Walters, J., 1992. Effects of a new molasses byproduct. Concentrated separator byproduct, on nutrient digestibility and ruminal fermentation in cattle. *J. Dairy Sci.* 70, 1936–1940.
- Wright, D., 1969. Fermentation of glycerol by rumen microorganisms. *N.Z. J. Agric. Res.* 12, 281–286.

CAPITULO 3

Cinética de la producción de gas y fermentación ruminal *in vitro* de glicerol, propilenglicol y melaza combinados con forrajes. Efecto de una sola dosis oral en las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina en ovejas

Artículo para ser enviado a la revista: Animal

Cinética de la producción de gas y fermentación ruminal *in vitro* de glicerol, propilenglicol y melaza combinados con forrajes. Efecto de una sola dosis oral en las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina en ovejas

SM Ferraro^{12*}, GD Mendoza³, LA Miranda⁴, CG Gutiérrez¹

¹Departamento de Reproducción Animal, UNAM, México. ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Venezuela.

³Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México. ⁴Universidad Autónoma de Chapingo, México

RESUMEN

Se determinó la cinética de fermentación ruminal *in vitro* para glicerol, propilenglicol y melaza combinados con forrajes, y se estudió el efecto de su administración oral en las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina en ovejas. En el estudio 1, la combinación de ensilado de maíz con glicerol (4.31 h) y propilenglicol (2.18 h) retrasó el inicio de la producción de gas ($P < 0.01$). Independientemente del forraje utilizado, los tratamientos con propilenglicol, mostraron los menores volúmenes de producción de gas ($P < 0.01$), ya fuera combinado con alfalfa (295.68 ml g^{-1}) o con ensilado de maíz (266.51 ml g^{-1}). El glicerol mostró el mayor tiempo lag ($P < 0.01$) y la melaza, el menor ($P < 0.01$). La fermentación de glicerol redujo la producción de acetato e incrementó la de butirato con el tiempo ($P < 0.01$), mientras que el propionato mostró un incremento lineal en el tratamiento con alfalfa ($P < 0.01$), pero un efecto cuadrático ($P < 0.01$) con ensilado de maíz. La combinación de alfalfa y propilenglicol redujo la producción de acetato y butirato con el tiempo e incrementó la de propionato ($P < 0.01$). El patrón de fermentación fue diferente con ensilado de maíz, observándose un efecto cuadrático con acetato y propionato ($P < 0.01$). La fermentación de la melaza fue similar con los dos forrajes; presentó una disminución en la producción de acetato y un incremento en la de butirato con el tiempo ($P < 0.01$); el propionato incrementó desde las 0 a las 12 h. En el estudio 2,

las concentraciones sanguíneas de glucosa aumentaron a los 30 ($P < 0.01$) y 60 minutos ($P < 0.001$) después de la administración de glicerol o propilenglicol, respectivamente y permanecieron elevadas hasta los 120 minutos para el glicerol y 180 minutos para el propilenglicol. Las concentraciones sanguíneas de insulina incrementaron significativamente desde los 30 ($P < 0.05$) a los 720 minutos en el grupo tratado con glicerol y desde los 90 ($P < 0.001$) a los 720 minutos en el grupo de propilenglicol. La fase lag más larga del glicerol pudiera permitir su paso a través del rumen y su absorción, ofreciendo al hígado un sustrato gluconeogénico que incrementará las concentraciones de glucosa e insulina en la sangre. Adicionalmente, el glicerol pudiera incrementar la glucosa a partir de su conversión a propionato. El propilenglicol actúa básicamente como precursor gluconeogénico a partir de su fermentación a propionato. La combinación de glicerol y propilenglicol con forrajes cambia la cinética de producción de gas y muestra la asociación entre los forrajes y las fuentes energéticas empleadas.

Introducción

El uso de sustancias con propiedades anticetogénicas y glucogénicas, como el glicerol y propilenglicol se ha estudiado extensivamente en rumiantes (Griffiths, 1952; Rémond, 1993; Goff y Horst 2001; Hoedemaker *et al.*, 2004; Nielsen e Ingvarsten 2004; Chung *et al.*, 2007; Kristensen y Raun 2007; Hippen *et al.*, 2008; Osman *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2009). El glicerol o propanotriol es un alcohol que puede obtenerse del procesamiento de las grasas y los aceites, así como de la producción del biodiesel. El glicerol puro y refinado con grado nutricional se utiliza para productos de cuidado personal y alimentos, aunque su uso en la dieta de vacas lecheras es costoso. Sin embargo, algunos autores mencionan que un exceso de la producción de glicerol no refinado y crudo podría dirigirse a la alimentación de rumiantes (Schroeder y Sudekum 1999; Trabue *et al.*, 2007; Sudekum *et al.*, 2008).

La utilización de glicerol y propilenglicol como precursores gluconeogénicos se ha basado en algunos estudios *in vitro* e *in vivo*, en los cuales se menciona que aumentan el ácido propiónico como producto de su fermentación (Johns 1953, Garton 1961; Czerkawski y Breckenridge 1972; Rémond *et al.*, 1993; Schroder y Sudekum 1999; De Frain *et al.*, 2004; Linke *et al.*, 2004; Nielsen e Ingvarsten 2004; Kristensen y Raun 2007). El propionato es el único ácido graso volátil gluconeogénico; se estima que puede ser extraído de la sangre por el hígado con 95% de eficacia (Bergman, 1990; Francisco *et al.*, 2002) y se considera la principal fuente de energía para el rumiante. De lo anterior se deduce que en la práctica veterinaria se haya adoptado el uso de precursores gluconeogénicos, como propionato de calcio (Goff *et al.*, 1996; Paton *et al.*, 2004), propilenglicol, glicerol y combinaciones de algunos de ellos, para incrementar la glucosa y, principalmente, para resolver problemas en vacas lecheras en período de transición o lactancia temprana (Miyoshi *et al.*, 2001; Nielsen e Ingvarsten 2004; Chiofalo *et al.*, 2005; Osman *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2009) como disminuir los efectos del balance energético negativo causado por las altas demandas energéticas de la producción

de leche y el desorden metabólico que en algunos casos esto conlleva (Hippen *et al.*, 2008; Rukkwamsuk *et al.*, 2005).

Hippen *et al.* (2008) mencionan que la adición de glicerol a las dietas de vacas en período de transición mejora las características de fermentación, la eficiencia de la alimentación y la palatabilidad de los alimentos, incrementa el consumo de agua y es un suplemento esencialmente energético, que incrementa las concentraciones sanguíneas de glucosa. Por su parte, el propilenglicol o propanodiol puede obtenerse a partir del glicerol (Trabue *et al.*, 2007) y es usado comúnmente como aditivo en vacas lecheras en lactación temprana para disminuir las concentraciones sanguíneas de ácidos grasos libres y betahidroxibutirato, incrementar las concentraciones sanguíneas de insulina, glucosa y ácido propiónico (Nielsen y Ingvarzen, 2004; Chiofalo *et al.*, 2005) y disminuir el riesgo de hígado graso en vacas lecheras en período de transición (Rukkwamsuk *et al.*, 2005). Sin embargo, el uso de propilenglicol por períodos largos y en dosis mayores a 500 g/día debe hacerse con precaución, ya que altas concentraciones de esta sustancia pudieran ser tóxicas para algunos microorganismos ruminales (Trabue *et al.*, 2007). El propilenglicol puede causar efectos como ataxia, salivación, hiperventilación y depresión (Nielsen e Ingvarzen, 2004).

La melaza es un subproducto de la caña de azúcar, usada ampliamente en rumiantes como una fuente de carbohidratos solubles rápidamente fermentables en el rumen; mejora de la palatabilidad y reduce el polvo en los alimentos (Wiedmeier *et al.*, 1992). Los efectos de la melaza en la producción de ácidos grasos volátiles están relacionados con su nivel en la dieta. Bajos niveles de melaza (<15% de materia seca) en la dieta no modifican el patrón de fermentación y la producción de ácidos grasos volátiles es similar a la observada en dietas con granos (Martin y Wing, 1966; Hatch y Beeson, 1972), con una producción deseable de propionato como sustrato gluconeogénico para el hígado. En contraste, cuando la inclusión de melaza excede 15% se observa una reducción

en la producción de propionato y un incremento anormal en la de ácido butírico (Marty y Preston, 1970; Olbrich y Wayman, 1972).

La fermentación de los alimentos por los microbios ruminales produce gas y la tasa en la cual el gas se produce es directamente proporcional a la tasa en la cual el sustrato se degrada. El sistema de producción de gas *in vitro* permite estudiar las características de fermentación de los alimentos en el líquido ruminal y se han desarrollado y validado varias técnicas en diferentes experimentos. Estos estudios han mostrado el valor de medir la producción de gas como una manera de estimar la tasa y la producción de gas durante la fermentación ruminal *in vitro* (Dhanoa *et al.*, 2000; Taghizadeh *et al.*, 2008). Las dietas formuladas para rumiantes generalmente son una mezcla de ingredientes individuales; la alfalfa (*Medicago sativa*) es una de las leguminosas que se utiliza ampliamente debido a su alto contenido de proteína y digestibilidad, comparada con otros forrajes (Engels and Jung 2005). De manera similar, el ensilado de maíz (*Zea mays*) es también un importante componente de la dieta de las vacas lecheras por su alto contenido energético (Sheaffer *et al.*, 2006).

El interés de este estudio fue, primero, determinar la producción de gas y la fermentación *in vitro* de glicerol, propilenglicol y melaza cuando se combinaron con alfalfa o ensilado de maíz y, segundo, determinar los efectos de la administración oral de una dosis única en las concentraciones sanguíneas de insulina y glucosa. Las hipótesis a probar son que cuando el glicerol y el propilenglicol se combinan con forrajes, la producción de gas y las variables de fermentación ruminal cambian y que, además, ambas sustancias son rápidamente degradadas por los microbios ruminales y producen una respuesta insulinémica y glicémica mayor que la melaza.

2. Material y métodos

2. 1 Producción de gas *in vitro* (Experimento 1)

Inóculo e inoculación

El líquido ruminal se obtuvo de tres borregos Suffolk, utilizando una bomba aspiradora, y se almacenó en un termo a temperatura de 39°C; se filtró a través de capas de gasa, se mantuvo a una temperatura de 39°C hasta su inoculación a los frascos y, finalmente, se añadió al medio de cultivo en una proporción de 10%. (Menke y Steingass, 1988). Los sustratos molidos y secos (500 mg) así como los aditivos líquidos, se colocaron en frascos de 120 ml, los cuales se taparon y sellaron. El líquido ruminal con el buffer (90 ml) se pipeteó dentro de cada frasco que contenía los sustratos y aditivos e inmediatamente los frascos se colocaron a baño de María a 39°C. Se utilizaron tres réplicas por tratamiento y tres repeticiones del blanco. Los frascos con el blanco sólo contenían líquido ruminal y el medio de cultivo.

Medio de cultivo

El medio estuvo compuesto por una solución mineral I (6.0 g K_2HPO_4 por litro de agua destilada), una solución mineral II (6.0 g KH_2PO_4 ; 6.0 g $(NH_4)_2SO_4$; 12.0 g NaCl; 2.45 g $MgSO_4$ y 1.6 g $CaClH_2O$ por litro de agua destilada), una solución buffer de carbonato de sodio al 8% y una solución reducida de sulfuro cisteína (2.5 g de L-cisteína en 15 ml de NaOH (2N); 2.5 g de Na₂S y 0.1 ml de rezarsurina 1%) (Cobos y Yokoyama, 1995).

Sustratos para la fermentación

Muestras de alfalfa y ensilado de maíz (0.5 g) se secaron a 60°C por 24 horas, se molieron con una criba de 1 mm y se combinaron con los aditivos líquidos (320 µl), glicerol a 90% (p/v), propilenglicol a 90% (p/v) y melaza, en un volumen total de 90 ml y equivalente a 0.36 g de glicerol, 0.30 g de propilenglicol y 0.48 g de melaza.

Lecturas de producción de gas

Se midió la presión de gas con una aguja acoplada a un manómetro (con escala de 0-1 Kg cm⁻²) e insertada a través del tapón de goma, a las 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10,

12, 16, 20, 26, 32, 44, 56, 68, 80 y 92 h de incubación. Las medidas de presión (Kg cm^{-2}) se transformaron a volumen y los valores de presión y volumen se ajustaron por regresión lineal. La producción acumulada de gas se ajustó al modelo propuesto por Menke y Steingass (1988): $Y = v / (1 + \exp(2 - 4 * s * (t - L)))$, donde Y= volumen total de producción de gas, v= volumen, s= tasa de producción de gas, t= tiempo, L= fase lag.

Determinación de ácidos grasos volátiles en el líquido ruminal

Se tomaron muestras (1 ml) de los frascos a las 0, 12 y 26 horas de incubación y se conservaron en 4 ml de ácido metafosfórico al 25%. Las muestras se centrifugaron a 2500 g por 20 minutos y el sobrenadante se colocó en viales para la determinación de ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases (Erwin *et al.* 1961).

2.2 Determinación de la concentración sanguínea de glucosa e insulina (Experimento 2)

Animales: se utilizaron 16 ovinos, con una condición corporal de 2 y con una alimentación de mantenimiento basada en forrajes, alfalfa y rye grass. Los animales se asignaron al azar en cuatro grupos de tratamientos (n=4).

Tratamientos: al grupo testigo se le suministró agua y los otros tres grupos recibieron cantidades isoenergéticas (1470.83 Kcal EB) de glicerol (270 ml), propilenglicol (246 ml) y melaza (369 ml), en dosis oral única.

Métodos analíticos para glucosa e insulina: las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular a los -30, 0, 30, 90, 120, 150, 180, 210, 360, 540, 720, 1080, 1440 minutos post-administración de los tratamientos. Se centrifugaron a 1500 g x 20 minutos y se almacenaron para determinación de glucosa e insulina. La glucosa se determinó en el plasma por el procedimiento de glucosa oxidasa (Trinder, 1969) y la concentración se expresó en mg dL^{-1} . La insulina se determinó por radioinmunoensayo (RIA) con el Kit Coat-A Count® (Diagnostic product corporation, Los Angeles, CA, USA), con una sensibilidad de 0.064 ng mL^{-1} y un

coeficiente de variación intraensayo de 5.31%; la concentración se expresó en ng mL⁻¹.

2. 3 Análisis estadístico

El estudio de fermentación *in vitro* se realizó por duplicado en cada ensayo, con tres réplicas por tratamiento probado y sus respectivos blancos. El volumen máximo de gas, la tasa de producción de gas y la fase lag *in vitro* se estimaron con el PROC NLIN BEST (SAS, 1999). Los datos se analizaron como un diseño de bloques al azar y se utilizó la incubación como criterio de bloqueo (dos incubaciones) (PROC GLM, SAS, 1999). La comparación de medias se realizó por la prueba de Tukey. La concentración de ácidos grasos volátiles se determinó en una sola incubación y los datos de proporción molar se transformaron a arcoseno de la raíz cuadrada del valor porcentual y se analizaron como un diseño completamente al azar. Los datos de las concentraciones sanguíneas de insulina y glucosa se transformaron a logaritmo y se evaluaron con el procedimiento MIXED para mediciones repetidas de SAS (1999). El modelo estadístico incluyó: animal anidado dentro del tratamiento, tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento x tiempo. Se consideraron significativas las diferencias entre las medias de tratamientos al nivel de $P < 0.05$.

Resultados

Experimento 1

En el cuadro 1 se presentan los efectos de la combinación de alfalfa y ensilado de maíz con glicerol, propilenglicol y melaza en las variables de cinética enzimática *in vitro*. Los tratamientos con propilenglicol produjeron los menores volúmenes máximos de gas y aún más si fue combinado con ensilado ($P < 0.01$). La tasa de producción de gas disminuyó cuando el glicerol (0.0320 h^{-1}), el propilenglicol (0.0341 h^{-1}) y la melaza (0.0583 h^{-1}) se combinaron con el ensilado

de maíz ($P<0.01$). Asimismo, la combinación del ensilado de maíz con el glicerol (4.31 h) y el propilenglicol (2.18 h) retrasó el inicio de la producción de gas ($P<0.01$). Independientemente del forraje utilizado, el glicerol mostró el mayor tiempo lag ($P<0.01$) y la melaza el menor ($P<0.01$).

En las figuras 1 y 2 se observa el patrón de fermentación ruminal del glicerol, propilenglicol y melaza combinados con alfalfa y con ensilado de maíz, respectivamente. La fermentación del glicerol redujo la producción de acetato y aumentó la de butirato con el tiempo ($P<0.01$), mientras que el propionato mostró un incremento lineal en el tratamiento con alfalfa ($P<0.01$) (Figura 1a), pero un efecto cuadrático con ensilado de maíz ($P<0.01$) (Figura 2a).

La combinación de alfalfa y propilenglicol (Figura 1b) redujo la producción de acetato y la de butirato con el tiempo e incrementó la de propionato ($P<0.01$). Sin embargo, el patrón de fermentación fue diferente con ensilado de maíz (Figura 2b): similar a lo observado con alfalfa, disminuyó la producción de butirato ($P<0.01$), pero se observó un efecto cuadrático en acetato y propionato ($P<0.01$).

El patrón de fermentación de la melaza (Figuras 1c y 2c) con los dos forrajes fue similar: presentó una disminución en la producción de acetato y un incremento en la de butirato con el tiempo, pero solamente un incremento en propionato desde las 0 a las 12 h ($P<0.01$); la concentración se mantuvo de las 12 a las 26 horas de incubación.

Cuadro 1. Producción acumulada de gas y variables de cinética enzimática en tratamientos con glicerol, propilenglicol y melaza combinados con forrajes.

Variables de producción de gas						
Fuentes energéticas	Volumen máximo (ml g ⁻¹)		Tasa de producción de gas (h ⁻¹)		Tiempo Lag (h)	
	Forrajes		Forrajes		Forrajes	
	Alfalfa	Ensilado	Alfalfa	Ensilado	Alfalfa	Ensilado
Glicerol	401.71 ^{ax}	393.60 ^{ax}	0.0470 ^{ax}	0.0320 ^{ay}	2.2214 ^{ax}	4.3101 ^{ay}
Propilenglicol	295.68 ^{bx}	266.51 ^{by}	0.0485 ^{bx}	0.0341 ^{ay}	0.7540 ^{bx}	2.1859 ^{by}
Melaza	406.65 ^{ax}	398.62 ^{ax}	0.0688 ^{cx}	0.0583 ^{by}	0.0722 ^{bx}	0.4272 ^{cx}
EEM	6.38		0.002		0.20	

^{abc} Letras diferentes dentro de la columna indican diferencias (P<0.01).

^{xyz} Letras diferentes dentro de la fila indican diferencias (P<0.01)

Los valores representan las medias del cuadrado mínimo ± EEM: Error estándar de la media de los tratamientos.

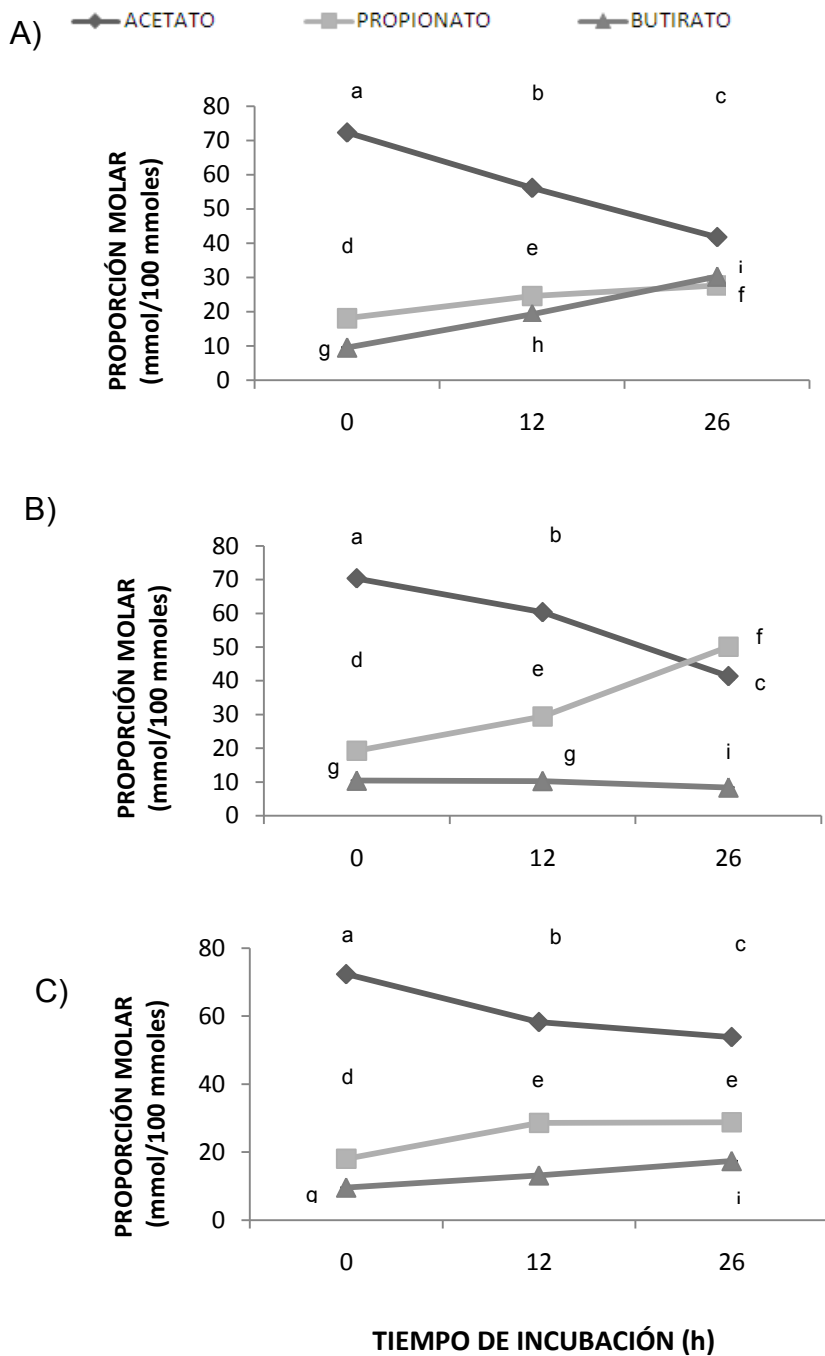


Figura 1. Patrón de fermentación ruminal para los tratamientos: A) Glicerol + alfalfa; B) Propilenglicol + alfalfa; C) Melaza + alfalfa (^{abc} Letras diferentes indican diferencias para acetato, ^{def} Letras diferentes indican diferencias para propionato, ^{ghi} Letras diferentes indican diferencias para butirato, *P<0.05 entre tratamientos). Los valores representan la proporción molar (mmol/100 mmoles) ± error estándar de la media de los tratamientos.

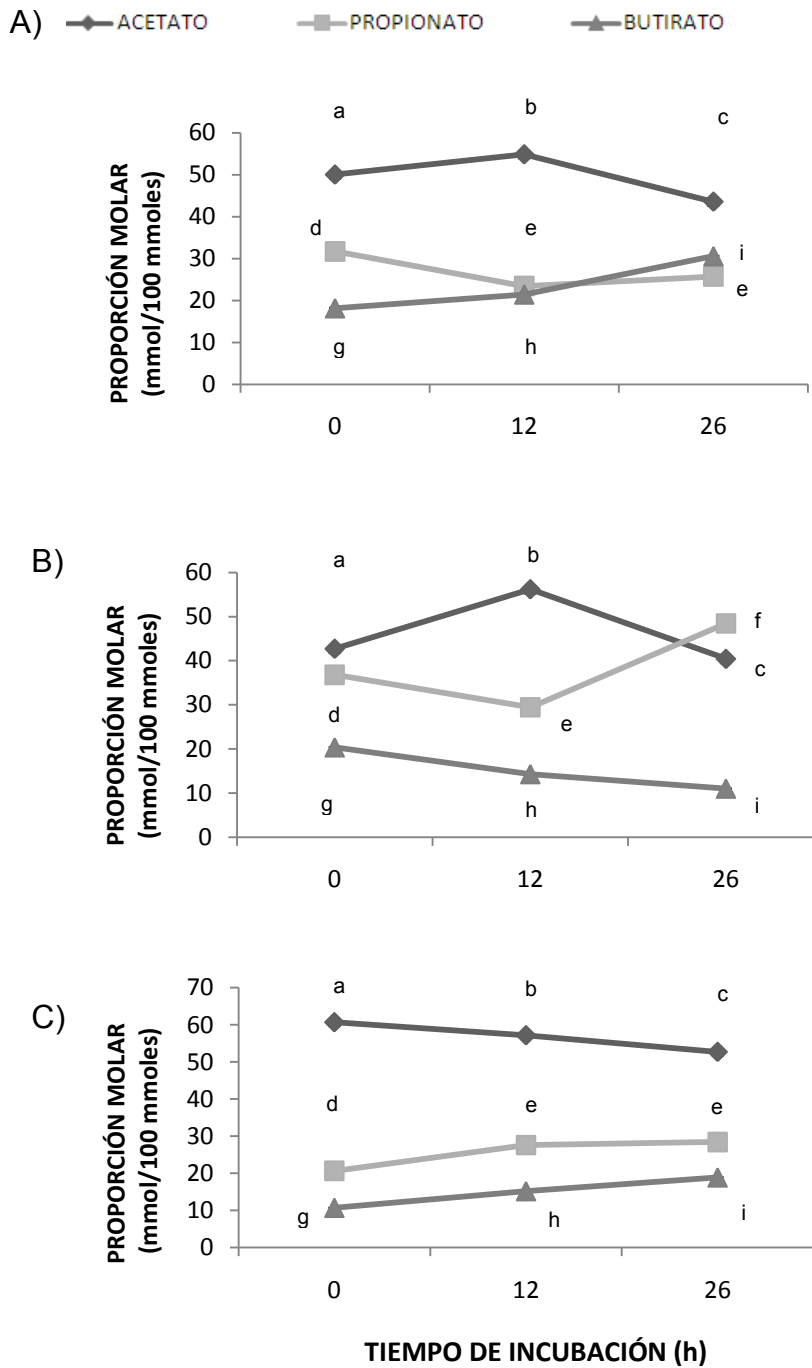


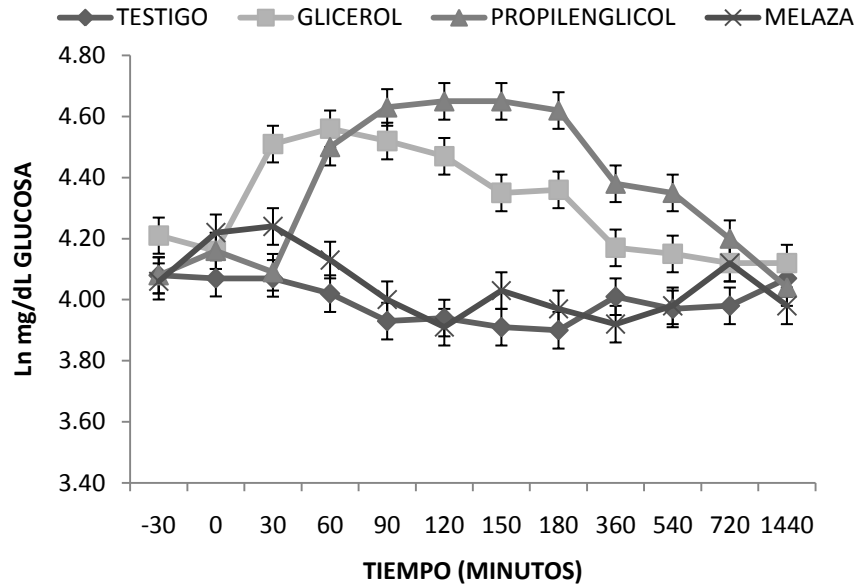
Figura 2. Patrón de fermentación ruminal para los tratamientos: A) Glicerol + ensilado de maíz; B) Propilenglicol + ensilado de maíz; C) Melaza + ensilado de maíz (^{abc} Letras diferentes indican diferencias para acetato, ^{def} Letras diferentes indican diferencias para propionato, ^{ghi} Letras diferentes indican diferencias para butirato, *P<0.05 entre tratamientos). Los valores representan la proporción molar (mmol/100 mmoles) ± error estándar de la media de los tratamientos.

Experimento 2

En la Figura 3a se muestran las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina entre los grupos tratados con glicerol, propilenglicol, melaza y agua (grupo testigo). En las ovejas del grupo testigo no se incrementó significativamente la concentración de glucosa con el tiempo. En el tratamiento con melaza, se incrementó significativamente la glucosa al minuto 0 ($P=0.05$), para posteriormente disminuir significativamente a partir de los 90 minutos ($P<0.01$) y manteniéndose constante hasta los 1440 minutos. En contraste, la administración oral de glicerol y propilenglicol causó un incremento significativo en las concentraciones de glucosa a los 30 ($P<0.01$) y 60 minutos ($P<0.001$), respectivamente, después de su administración; las concentraciones de glucosa permanecieron elevadas hasta los 180 minutos en el caso del tratamiento con propilenglicol y hasta los 120 minutos en el tratamiento con glicerol. En el cuadro 2 se presentan las probabilidades de diferencias entre los tratamientos.

Después de la administración de la dosis, las concentraciones sanguíneas de insulina incrementaron significativamente desde los 30 ($P<0.05$) a los 720 minutos en el grupo tratado con glicerol y desde los 90 ($P<0.001$) a los 720 minutos en el grupo de propilenglicol. Por otro lado, en el grupo con melaza la concentración sanguínea de insulina se incrementó desde los 30 ($P<0.05$) a los 90 minutos postratamiento. En el grupo testigo la concentración de insulina se mantuvo constante hasta los 180 minutos con un aumento significativo a los 360 ($P<0.01$) y 720 minutos ($P<0.01$) (Figura 3b). En el cuadro 3 se presentan las probabilidades de diferencias entre los tratamientos.

A)



B)

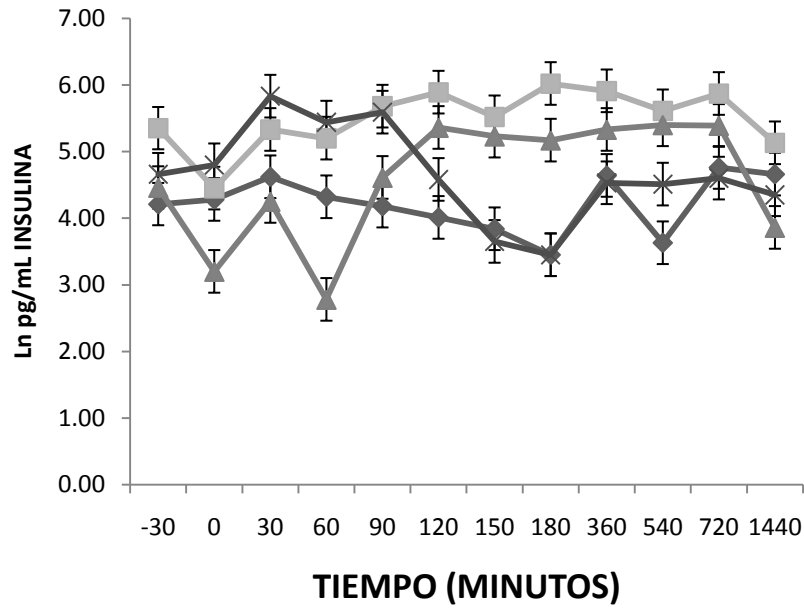


Figura 3. Concentraciones sanguíneas de glucosa (A) e insulina (B) a diferentes tiempos posadministración oral de glicerol, propilenglicol y melaza en ovejas (Letras diferentes indican diferencias, *P<0.05 entre tratamientos). Los valores representan la media del logaritmo natural \pm error estándar de la media de los tratamientos.

Cuadro 2. Probabilidades de diferencias a través del tiempo en la concentración sanguínea de glucosa.

TRATAMIENTO	TIEMPO (MINUTOS)											
	-30	0	30	60	90	120	150	180	360	540	720	1440
TESTIGO-GLICEROL	NS	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.057	0.027	NS	NS
TESTIGO-PROPILENGLICOL	NS	NS	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.009	NS
TESTIGO-MELAZA	NS	NS	0.047	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
GLICEROL-PROPILENGLICOL	NS	NS	<0.001	NS	NS	0.038	0.003	0.002	0.011	0.023	NS	NS
GLICEROL-MELAZA	NS	NS	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.004	0.047	NS	NS
PROPILENGLICOL-MELAZA	NS	NS	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	NS

Cuadro 3. Probabilidades de diferencias a través del tiempo en la concentración sanguínea de insulina.

TRATAMIENTO	TIEMPO (MINUTOS)											
	-30	0	30	60	90	120	150	180	360	540	720	1440
TESTIGO-GLICEROL	0.007	NS	NS	0.040	0.005	<0.001	<0.01	<0.001	0.003	<0.001	0.009	NS
TESTIGO-PROPILENGLICOL	NS	0.011	NS	0.003	NS	0.001	0.001	<0.001	NS	<0.001	NS	NS
TESTIGO-MELAZA	NS	NS	0.004	0.009	0.001	NS	NS	NS	NS	0.036	NS	NS
GLICEROL-PROPILENGLICOL	0.036	0.003	0.011	<0.001	0.012	NS	NS	0.045	NS	NS	NS	0.003
GLICEROL-MELAZA	NS	NS	NS	NS	NS	0.002	<0.01	<0.001	0.001	0.009	0.002	NS
PROPILENGLICOL-MELAZA	NS	0.002	0.002	<0.001	0.020	NS	0.002	<0.001	0.059	0.036	NS	NS

4. DISCUSIÓN

Los resultados del experimento 1 muestran que el glicerol se fermentó con una fase lag mayor con respecto al propilenglicol y la melaza, independientemente del forraje utilizado. Asimismo, la combinación de glicerol o propilenglicol con ensilado de maíz retrasó el inicio de la producción de gas.

La fase lag larga del glicerol y la menor tasa de producción de gas contrastan con los resultados de Rémond *et al.* (1993), quienes consignaron una fermentación rápida entre 4 y 6 horas, en animales adaptados previamente y que consumieron glicerol por dos semanas. En el mismo sentido Trabue *et al.* (2007) en un estudio *in vitro*, indican que luego de 24 horas, 80% del glicerol es metabolizado por los microbios ruminales. En el presente estudio, a partir de la tasa de producción de gas observada, se estimó que la mitad del volumen máximo de gas en el tratamiento de glicerol y alfalfa se produce entre las 12 y 14 horas, y entre las 16 y 18 horas si la combinación fue con ensilado de maíz, lo que resulta en una fermentación lenta del glicerol. Sin embargo, en otro estudio de producción de gas *in vitro* (Ferraro *et al.*, 2009) al utilizar glicerol sin forrajes, se observó que el tiempo lag fue de entre 10 y 12 horas y la mitad del gas se produjo entre 28 y 36 horas. El presente estudio muestra que la asociación entre los forrajes y el glicerol permite una disminución en el tiempo de inicio de la producción de gas.

Aunque la fermentación del glicerol en el presente estudio fue más lenta que la señalada por Rémond *et al.* (1993), hay que considerar la adaptación previa de los animales al consumo de glicerol. Si la administración oral del glicerol se hace en una dosis única, la fermentación puede ser lenta, como se observa en este estudio; sin embargo, si el glicerol es consumido continuamente en la dieta, la adaptación de los microbios puede cambiar la cinética y, así, la tasa de degradación y la fase lag. Al respecto, Kijora *et al.*, (1998) mencionan que en vacas a las cuales se les administraron 200 g de glicerol vía intrarruminal por 6 días, la tasa de degradación fue más rápida en el último día de administración, lo

que indicó un mecanismo de adaptación de los microorganismos ruminales a la utilización del glicerol. Con una fase lag más larga, el glicerol, en teoría, pudiera tomar tres vías para su metabolismo: una ruta de desaparición en el rumen hacia la formación de ácido propiónico, absorción directa a través del rumen y pasaje directo al intestino al escapar de la fermentación ruminal. Al respecto, Holtenius *et al.* (2009) mencionan que la rápida tasa de desaparición del glicerol en el rumen observada *in vivo*, se debió principalmente a la absorción del glicerol y en menor grado, al flujo hacia el intestino y digestión microbiana en el rumen. Igualmente señalan que el glicerol fue absorbido por difusión pasiva sin transportadores.

La fermentación del glicerol redujo la producción de acetato y aumentó la de butirato, mientras que el propionato mostró un incremento lineal en el tratamiento con alfalfa, pero un efecto cuadrático con ensilado de maíz. Estudios realizados por Johns *et al.* (1953) y Garton *et al.* (1961) mostraron que el glicerol fue principalmente fermentado a propionato. Trabue *et al.* (2007) observaron que la fermentación del glicerol reduce la proporción de acetato y produce ciertas cantidades de valerato y caproato. En el mismo sentido, De Frain *et al.* (2004) observaron en vacas posparto que con una dosis de 430 g de glicerol disminuyó la producción de acetato y aumentó la de propionato, sin cambios en la de butirato. Por su parte, Rémond *et al.* (1993) muestran un patrón similar de fermentación comparado con el presente estudio, en el caso del glicerol combinado con alfalfa; estos autores demostraron incrementos significativos en las concentraciones de ácido propiónico y butírico con una disminución significativa en ácido acético. En un experimento *in vivo* con vacas consignaron que las dosis vía intrarruminal de 240 g o 489 g de glicerol aumentaron la proporción de butirato y de propionato aunque en diferente magnitud.

De los experimentos mencionados antes y a partir del presente estudio, se puede concluir que la administración de glicerol cambia el patrón de fermentación de los ácidos grasos volátiles; sin embargo, estos resultados dependen de la vía de administración de la sustancia, así como también del tiempo de adaptación al

compuesto y por tanto, de su utilización por los microbios ruminales. Cómo se observó, en la fermentación del glicerol pueden formarse ciertas cantidades de butirato y entonces su actividad glucogénica probablemente dependa más de su absorción que de su fermentación hacia propionato o butirato.

La fermentación del propilenglicol con alfalfa o ensilado de maíz produjo los menores volúmenes de gas. El volumen máximo de gas producido por el propilenglicol sin forrajes fue 10 veces menor (Ferraro *et al.*, 2009) a lo encontrado en este estudio, sugiriendo que la combinación del propilenglicol con los forrajes cambia la cinética de producción de gas. Por otro lado, el tiempo estimado para obtener la mitad del volumen máximo de gas producido en el tratamiento con propilenglicol fue de entre 10 (si estaba combinado con alfalfa) y 14 horas (con ensilado de maíz) y estos resultados son similares a las de la fermentación *in vitro* observados por Trabue *et al.*, (2007), del S-propilenglicol y R-propilenglicol que se fermentaron completamente a las 24 y 8 horas de incubación, respectivamente. En conjunto, la tasa de producción de gas obtenida en este estudio y el volumen de gas producido pudieran indicar que el propilenglicol puede ser un precursor glucogénico en el rumiante cuando es fermentado en el rumen a propionato y/o cuando es absorbido directamente.

En este estudio el propilenglicol produjo la mayor proporción de propionato, a expensas de una reducción en acetato y butirato. Esto es similar a lo encontrado por Trabue *et al.* (2007) en un estudio *in vitro*. Ellos indican que las concentraciones de propionato fueron mayores cuando se añadió S- y R-propilenglicol al líquido ruminal *in vitro*. El patrón de fermentación observado en el presente experimento, en conjunto con los datos de una menor producción de gas, pudiera indicar que el propilenglicol se fermenta principalmente a propionato en el rumen, aunque algunos autores mencionan su absorción directa y su conversión a glucosa en el hígado. Así, Bruni y Chilibroste (2001) indican que cambios en el patrón de fermentación que aumenten la proporción de propiónico a expensas del

butírico y acético resultarían en menos producción de gas a partir de la fermentación.

La fermentación de melaza en este estudio presentó características de un sustrato rápidamente fermentable en el rumen con una fase lag mínima comparada con los otros dos sustratos (glicerol y propilenglicol); además la melaza presentó una alta producción de gas, debido a su alta concentración en azúcares solubles, principalmente de sacarosa (Wiedmaier *et al.*, 1992). Por otro lado, la adición de melaza aumentó la proporción de butirato, disminuyó la de acetato e incrementó la de propionato sólo desde las 0 a las 12 horas de incubación, independientemente del forraje utilizado. Sin embargo, hay diversos estudios que confirman que la fermentación ruminal de melaza incrementa la proporción de butirato (Marty y Preston, 1970; Olbrich y Wayman, 1972).

La administración de glicerol, propilenglicol y melaza en el presente estudio causó cambios en la concentración sanguínea de glucosa e insulina. En los animales a los cuales se administró glicerol, la respuesta en la concentración de glucosa fue inicialmente más rápida con respecto a los grupos testigo y con melaza, pero la respuesta glicémica causada por el propilenglicol fue mayor y más constante luego de los 60 minutos post-administración. El propilenglicol puede absorberse intacto a través de las paredes del rumen para ser metabolizado en el hígado, mientras que otra fracción puede convertirse a propionato en el rumen antes de su absorción (Emery *et al.*, 1967). Sin embargo, Kristensen y Raun (2007) indican que cierta cantidad de propilenglicol puede metabolizarse a lactato y cuando se infunde en el rumen se consigue un aumento en la concentración plasmática de propilenglicol, etanol, propanol, propanal, glucosa, L-lactato y propionato y se reducen las concentraciones de acetato y β hidroxibutirato. Miyoshi *et al.* (2001) mencionan que en vacas durante la lactación después de la administración de 500 ml de propilenglicol vía oral, se incrementaron rápidamente las concentraciones sanguíneas de insulina y glucosa, a los 30 minutos y continuaron en incremento gradual hasta los 90 minutos. Este incremento tuvo un

efecto lineal en el tiempo para glucosa y un efecto cuadrático para insulina. En el presente estudio, una sola administración oral de propilenglicol produjo una respuesta glicémica constante en el tiempo posdosis y generó una respuesta insulinémica limitada a los 90 minutos postratamiento, cuando se compara con la provocada por el glicerol. A pesar del incremento de insulina, se observó que la respuesta glicémica fue constante. Kristensen y Raun (2007) mencionan que el incremento en la concentración de glucosa luego de una dosis de 650 g de propilenglicol vía intrarruminal, fue causado principalmente por una disminución en la demanda de glucosa por los tejidos periféricos, a pesar del incremento en insulina. En este sentido, la resistencia a insulina causada por la administración del propilenglicol parece estar asociada al efecto que causa el alcohol producto de su metabolismo como el propanol. Diferentes mecanismos de acción del propilenglicol han sido discutidos, sin embargo, parecen diferir en los diferentes experimentos ya que parece estar relacionado con la forma de administración.

Después de la dosis de glicerol, el aumento en la concentración de glucosa reguló en forma positiva la respuesta insulinémica, la cual fue mayor en el tiempo con respecto a la causada por el propilenglicol y melaza o en el grupo testigo. Chung *et al.* (2007) indican que en vacas en período de transición a las que se administró glicerol diariamente (250 g/d), desde el parto hasta los 21 días en lactación, se presentó un estado energético positivo con altas concentraciones plasmáticas de glucosa, bajas concentraciones plasmáticas de betahidroxibutirato y bajas concentraciones de cetonas en la orina durante la segunda semana de lactación. Sin embargo, en este estudio no se observaron cambios en los niveles de insulina. Para tratar de explicar algunas diferencias encontradas en relación a la forma de administración del glicerol y la respuesta de fermentación ruminal y metabólica a su administración, Linke *et al.* (2004) evaluaron tres formas de administración del glicerol, en administración oral mediante una botella, mediante un tubo esofágico y como aditivo combinado con la dieta. Al respecto, encontraron que la concentración plasmática de glucosa e insulina se incrementó cuando el

glicerol se infundió a través de un tubo esofágico o por administración oral comparada con la respuesta causada por administración como aditivo combinado en el alimento y con la respuesta causada en animales controles sin glicerol. Goff y Horst (2001) encontraron que 0.83 kg de glicerol, administrado por tubo esofágico, aumentó la concentración sanguínea de glucosa 16% a los 30 minutos y este incremento se mantuvo durante 8 horas y retornó a niveles basales a las 24 horas. En el presente estudio, una sola dosis oral de glicerol produjo una respuesta glicémica limitada comparada con la obtenida en el grupo que recibió propilenglicol y probablemente se debió a que el incremento inicial en glucosa produjo un aumento en la concentración de insulina, la cual posteriormente reguló las concentraciones sanguíneas de glucosa, disminuyéndola. Las diferencias encontradas en los estudios realizados están relacionadas con la forma de administración del glicerol, como se mencionó anteriormente, y la respuesta de la glucosa y la insulina dependerá de la forma y rapidez con que se libere el glicerol y la adaptación de los microorganismos ruminales al compuesto.

5. Conclusiones

Independientemente del forraje utilizado los tratamientos con propilenglicol mostraron los menores volúmenes de producción de gas, el glicerol presentó el mayor tiempo lag y la melaza, el menor. La fase lag más larga del glicerol pudiera permitir su paso a través del rumen y su absorción ofreciendo al hígado un sustrato gluconeogénico que incrementará las concentraciones de glucosa en insulina en sangre. Adicionalmente, el glicerol pudiera incrementar glucosa a partir de su conversión a propionato. El propilenglicol actúa básicamente como precursor gluconeogénico a partir de su fermentación a propionato y produce una respuesta glicémica más constante en el tiempo. En contraste, la fase lag corta de la melaza y su rápida fermentación hacia ácidos grasos volátiles, menor respuesta glicémica e insulinémica en el tiempo comparada con glicerol y propilenglicol sugiere su menor capacidad glucogénica con respecto a las otras sustancias

estudiadas. La combinación de glicerol y propilenglicol con forrajes cambia la cinética de producción de gas y muestra la asociación entre los forrajes y las fuentes energéticas empleadas.

6. Agradecimientos

Esta investigación fue parcialmente financiada por Proyecto Pappiit IN223907 UNAM y UAM Xochimilco. Agradecemos la asistencia técnica de Braulio Sanchez y José Pascual Espinoza en el Laboratorio de Microbiología en la Universidad de Chapingo y a la Dra. Magda Crosby y Andrés Lee en el Laboratorio de Nutrición Animal en el Colegio de Postgraduados.

7. Bibliografía

- Bergman E. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews* 70 (2), 567-590
- Bruni M, Chilbroste P. 2001. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Arch Latinoam Prod Anim* 9 (1), 43-51
- Chiofalo V, Todaro M, Liotta L, Margiotta S, Manzo T, Leto G. 2005. Effect of propylene glycol on pre- and postpartum performance by dairy ewes. *Small Ruminant Research* 58 (2): 107-114.
- Chung Y, Rico D, Martinez C, Cassidy T, Noirot V, Ames A, Varga G. 2007. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. *J Dairy Sci* 90, 5682-5691
- Cobos M, Yokoyama M. 1995. *Clostridium paraputrificum* var *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. In: Wallace, R. and Lahlou-Kassi, A. (eds.). *Rumen ecology research planning, proceedings of a workshop*. Addis Ababa, Ethiopia. International Livestock Research Institute. Pp 151-161
- Czerkawski J, Breckenridge G. 1972. Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen microorganisms with particular reference to methane production. *British Journal of Nutrition*. 27, 131-146

- DeFrain J, Hippen A, Kalscheur K, Jardon P. 2004. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. *J Dairy Sci.* 87, 4195-4206
- Dhanao MS, Lopez S, Dijkstra J, Davies DR, Sanderson R, Williams BA, Sileshi Z, France J. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: comparison of models. *Br J Nutr.* 83 (2), 131-42
- Emery R, Brown R, Black A. 1967. Metabolism of DL-1, 2-propanediol-2-¹⁴C in a lactating cow. *J Nutrition* 92, 348-356
- Engels F, Jung H. 2005. Alfalfa stem tissues: Impact of lignification and cell length on ruminal degradation of large particles. *Anim Feed Sci and Technol* 120 (3), 309-321
- Erwin E, Marco G, Emery E. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J Dairy Sci* 44, 1768-1771
- Ferraro S, Mendoza M, Miranda L, Gutierrez CG. 2009. *In vitro* gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. *Anim Feed Sci and Technol* 154, 112–118
- Francisco CC, Chamberlain CS, Waldner DN, Wettemann RP, Spicer LJ. 2002. Propionibacteria fed to dairy cow: effects on energy balance, plasma metabolites, and hormones, and reproduction. *J Dairy Sci* 85 (7), 1738-1751.
- Garton G, Lough A, Vioque E. 1961. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. *J Gen Microbiol* 25, 215-225.
- Goff J, Horst R, Jardon P, Borelli C, Wedam J. 1996. Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 79, 378-383
- Goff J, Horst R. 2001. Oral glycerol as an aid in the treatment of ketosis/fatty liver complex. *J Dairy Sci* 84 (Suppl 1): 153 (Abstr.)
- Griffiths WR. 1952. Treatment of pregnancy toxæmia in ewes by oral administration of glycerol. *The Veterinary Record* 64, 734

- Hatch CF, Beeson WM. 1972. Effect of different levels of cane molasses on nitrogen and energy utilization in urea rations for steers. *J Anim Sci* 35, 854–858
- Hippen A, De Frain J, Linke P. 2008. Glycerol and other energy sources for metabolism and production of transition dairy cows. Florida Ruminant Nutrition Symposium. Best Western Gateway Grand, Gainesville, FL
- Hoedemaker M, Prange D, Zerbe H, Frank J, Daxenberger A, Meyer H. 2004. Peripartal propylene glycol supplementation and metabolism, animal health, fertility, and production in dairy cows. *J Dairy Sci* 87, 2136-2145
- Holtenius K, Werner Omazic A, Kronqvist C. 2009. The fate glycerol entering the rumen of dairy cows. In: Chilliard Y, Glasser F, Faulconnier Y, Bocquier F, Veissier I, Doreau M (eds), *Ruminant Physiology*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, pp 80-81
- Johns A. 1953. Fermentation of glycerol in the rumen of sheep. *N Z J Sci Technol* 35, 262-269
- Kijora C, Bergner H, Gotz K, Bartelt J, Szakacs J, Sommer A. 1998. Investigation on the metabolism of glycerol in the rumen of bulls. *Archives of Animal Nutrition* 51, 341-348
- Kristensen N, Raun B. 2007. Ruminal and intermediary metabolism of propylene glycol in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 90, 4707-4717
- Linke P, DeFrain J, Hippen A, Jardon P. 2004. Ruminal and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. *J Dairy Sci* 87 (Suppl.1): 343 (Abstr.)
- Martin RJ, Wing, JM. 1966. Effect of molasses level on digestibility of a high concentrate ration and on molar proportions of volatile fatty acid produced in the rumen of dairy steers. *J Dairy Sci* 49, 846–849
- Marty R, Preston T. 1970. Molar proportions of the short chain volatile fatty acids (VFA) produced in the rumen of cattle given high-molasses diets. *Cuban Journal of Agricultural Science* 4, 183-186
- Menke K, Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from the chemical analysis and the in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Develop* 28, 9-52

- Miyoshi S, Pate J, Palmquist D. 2001. Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 68, 29-43
- Olbrich S, Wayman O. 1972. Effect of feeding raw sugar on growth performance and rumen fluid parameters of fattening beef cattle. *J Anim Sci* 34, 820-825
- Osborne, V, Odongo N, Cant J, Swanson K, McBride B. 2009. Effects of supplementing glycerol and soybean oil in drinking water on feed and water intake, energy balance, and production performance of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 92, 698-707
- Osman M, Allen P, Mehyar N, Bobe G, Coetzee J, Koehler K, Beitz D. 2008. Acute metabolic responses of postpartal dairy cows to subcutaneous glucagon injections, oral glycerol, or both. *J Dairy Sci* 91, 3311-3322
- Paton R, Sorenson C, Hippen A. 2004. Effects of dietary glucogenic precursors and fat on feed intake and carbohydrate status of transition dairy cows. *J Dairy Sci* 87 (7), 2122-2129
- Nielsen N, Ingvarthsen K. 2004. Propylene glycol for dairy cows. A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Anim Feed Sci and Technol*, 115 (3-4), 191-213
- Remond B, Souday E, Jouany J. 1993. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Anim Feed Sci and Technol* 41, 121-132
- Rukkwamsuk T, Rungruang S. 2005. Effect of propylene glycol on fatty liver development and hepatic fructose 1, 6 bisphosphatase activity in periparturient dairy cows. *Livestock Production Science*. 95 (1-2), 95-102
- Statistical Analysis Systems Institute. 2001. SAS[®] Software, Version 8.2. SAS Institute, Inc., Cary, NC
- Schroeder A, Sudekum K. 1999. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: *New Horizons for an Old Crop*. Proc. 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra, Australia, September. 26-29, Paper N°241. N. Wratten and P.A. Salisbury, edit.

- Sheaffer C, Halgerson J, Jung H. 2006. Hybrid and N fertilization affect corn silage yield and quality. *Journal of agronomy and crop science* 192 (4), 278-283
- Sudekum K, Schroder A, Fiebelkorn S, Schwer R, Thalmann A. 2008. Quality characteristics of pelleted compound feeds under varying storage conditions as influenced by purity and concentration of glycerol from biodiesel production. *J Anim and Feed Sci* 17, 120-136
- Taghizadeh A, Janmohamadi H, Moghadam GA, Shodja J. 2008. *In vitro* gas production profiles in some concentrate ingredients. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7 (2), 137-139
- Trabue S, Scoggin K, Tjandrakusuma S, Rasmussen M, Reilly P. 2007. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7043-7051
- Wiedmeier R, Tanner B, Bair J, Shenton H, Arambel M, Walters J. 1992. Effects of a new molasses byproduct. Concentrated separator byproduct, on nutrient digestibility and ruminal fermentation in cattle. *J Dairy Sci* 70, 1936-1940

CAPÍTULO IV

Expresión de genes que regulan la tasa ovulatoria en ovejas en respuesta a un flushing ultracorto

Artículo en preparación

EXPRESIÓN DE GENES QUE REGULAN LA TASA OVULATORIA EN OVEJAS EN RESPUESTA A UN FLUSHING ULTRACORTO

RESUMEN

La selección del folículo ovulatorio obedece a la sincronización refinada de eventos, incluyendo el aumento en la producción de estradiol, que produce una retroalimentación negativa sobre la secreción de FSH, y la aparición de receptores para LH en las células de la granulosa, lo que le permitirá al folículo mantener su crecimiento en concentraciones decrecientes de gonadotropinas. El objetivo del estudio fue determinar si el estímulo de un “flushing” ultracorto tenía efecto sobre la expresión de RNAm para la aromatasa P450, la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y el receptor de LH (LHr) en folículos antrales de ovejas al momento de la luteólisis. Se utilizaron 30 ovejas sincronizadas con progestágenos y tratadas con 300 ml de glicerol a 90% o agua al momento del retiro del progestágeno. Se realizaron ovariectomías a las 0, 12, 24 y 48 h posterior a la luteólisis. Se disecaron los folículos \geq 3 mm de diámetro y de ellos se extrajo RNAm para determinar la expresión de RNAm para aromatasa P450, 3 β -HSD y LHr por PCR de tiempo real. El “flushing” ultracorto disminuyó significativamente la expresión de RNAm para aromatasa 12 horas después de retirar el progestágeno. El tratamiento aumentó el número de folículos \geq 3 mm de diámetro; sin embargo, no hubo efecto en la expresión de RNAm para 3 β -HSD y LHr. En conclusión, el tratamiento con una dosis oral de una solución glucogénica de glicerol aumentó el número de folículos ovulatorios potenciales debido a una disminución de aromatasa P450, lo que afecta la retroalimentación negativa estradiol-FSH.

INTRODUCCIÓN

La prolificidad es un factor clave en la eficiencia reproductiva y está determinada por la tasa ovulatoria y la supervivencia embrionaria. El potencial de la tasa ovulatoria se controla genéticamente en una raza o especie determinadas (Hunter *et al.*, 2004) y depende finalmente del número de folículos seleccionados en la oleada ovulatoria (Webb y Campbell, 2007).

Los estadios tardíos de desarrollo folicular están regulados principalmente por las gonadotropinas, FSH y LH. En la oveja y en la vaca, el reclutamiento de la oleada folicular está precedido de un incremento transitorio en FSH (Webb *et al.*, 2003) y el estradiol y la inhibina derivadas de los folículos reclutados actúan sobre la pituitaria para inhibir gradualmente la secreción de esta gonadotropina (Ginther *et al.*, 2002). La reducción de FSH induce atresia en la mayoría de los folículos que iniciaron su crecimiento en la cohorte; las concentraciones de FSH alcanzan un nadir y el crecimiento del folículo dominante se hace dependiente de LH. De esta forma, cuando el folículo dominante madura hay un cambio de dependencia de FSH a LH. Las características de un folículo ovulatorio maduro involucran alta expresión de aromatasa, altas concentraciones de estradiol en el líquido folicular y la inducción de receptores de LH y 3 β -HSD en células de la granulosa (Bao y Garverick, 1998; Webb *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2011).

En el caso de ovejas de razas prolíficas, la tasa de ovulación y el tamaño de la camada pueden estar genéticamente regulados por la acción de un gen mayor, llamado gen de la fecundidad (*Fec*), o por efectos menores de varios genes, de esta forma, la selección folicular es multigénica (Webb *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2005). Se han identificado cinco puntos de mutación en la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15) y una mutación en el factor de crecimiento diferenciante 9 (GDF-9), que resultan en un incremento en la tasa de ovulación y en el tamaño de la camada en heterocigotos, mientras que los homocigotos son estériles (McNatty *et al.*, 2005a y b). En contraste, el fenotipo Booroola o *FecB* se debe a una mutación

en el receptor de la proteína morfogenética ósea tipo IB (BMPR-IB) o cinasa similar a activina 6 (ALK-6). La presencia de la mutación en *FecB* disminuye la acción proliferativa de las BMPs sobre las células de la granulosa y la acción inhibitoria sobre FSH. Esto genera un incremento en la expresión de RNAm para la aromatasa P450 e inhibina β A en las células de la granulosa (Webb *et al.*, 1999). La consecuencia final es la presencia de folículos maduros más pequeños, con menor número de células de la granulosa, una sensibilidad aumentada a FSH y una mayor expresión de marcadores de diferenciación dependientes de FSH, tales como genes de enzimas esteroideogénicas, subunidades activina/inhibina y receptor de LH en las células de la granulosa (Fabre *et al.*, 2006). El resultado es una desregulación de los mecanismos de selección folicular, un aumento en el número de folículos antrales desarrollados precozmente y un aumento en la tasa de ovulación (Campbell, 2009).

De igual forma, la estimulación nutricional (“flushing”) puede aumentar el número de folículos antrales. En la oveja, la tasa ovulatoria está influenciada por la nutrición y las evidencias encontradas señalan que los mecanismos que la regulan involucran una compleja relación entre mecanismos señalizadores intrafoliculares y la retroalimentación hipotálamo-hipófisis-ovario. La estimulación nutricional inicialmente se realizaba durante 3 semanas antes del empadre; posteriormente, Gherardi y Lindsay (1982) indicaron que tan sólo 9 días de estimulación nutricional antes de la ovulación eran adecuados para promover el aumento en la tasa ovulatoria. Oldham y Lindsay (1984) lo redujeron a 6 días; además, Stewart y Oldham (1986) encontraron que el consumo de lupino causó un efecto positivo, si ocurría entre el día 8 y 5 antes de la ovulación. Después de estos estudios, el período efectivo para tratamientos nutricionales se redujo ampliamente en la oveja.

Se han utilizado diversos tratamientos de “flushing” agudo para aumentar la tasa ovulatoria, que incluyen la suplementación en la dieta con grano lupino (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Somchit *et al.*, 2009) en ovejas sincronizadas y por

un tiempo de 5 días; y las infusiones intravenosas a base de glucosa, glucosamina (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Gallet *et al.*, 2009) y aminoácidos (Downing *et al.*, 1995) durante 3-5 días. Estos tipos de “flushing” se aplicaron en períodos previos a la luteólisis y cercanos a la emergencia de la oleada ovulatoria, probablemente destinados a aumentar el número de folículos reclutados. El período crítico durante el cual la suplementación de corto tiempo estimula la tasa ovulatoria va del día 8 al día 4 antes de la ovulación o de otra forma durante los días 10-14 del ciclo estral (Oldham y Lindsay 1984; Stewart y Oldham 1986; Nottle *et al.*, 1990). Este es el rango de tiempo en el cual la oleada ovulatoria emerge, de tal forma que el tratamiento de “flushing” se ha limitado al período fisiológico crítico de desarrollo folicular para lograr aumentar el número de folículos (Somchit *et al.*, 2007; Gallet *et al.*, 2009; Somchit *et al.*, 2009) y la tasa ovulatoria (Martínez 2004; Letelier *et al.*, 2008).

El “flushing” ultracorto desarrollado para este estudio actúa únicamente a partir del momento de la luteólisis. Se demostró que la administración oral de una dosis de glicerol a 90% al momento de la luteólisis incrementa 80% la tasa ovulatoria en ovejas (Martínez, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2007). Este “flushing” ultracorto tiene la ventaja de identificar el momento de la selección y se asocia con un aumento transitorio en las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina por un período de tiempo aproximadamente de 12 horas. Esto indica que existen períodos críticos cercanos a la luteólisis, durante los cuales puede aumentar la cantidad de folículos ovulatorios y son la ventana fisiológica durante la cual los folículos son susceptibles de ser estimulados y rescatados de la atresia. Se cree, que el mecanismo que produce un aumento en la tasa ovulatoria está a nivel de la selección y dominancia y no en el reclutamiento folicular.

Es probable que el “flushing” cause una maduración temprana de los folículos antrales similar a lo que ocurre en razas prolíficas de ovejas y que esto se vea reflejado en cambios en la expresión de RNAm para marcadores de maduración, como 3 β -HSD, LHr e incluso aromatasa P450. Esto permitiría el

desarrollo precoz de los folículos con la expresión de estos marcadores, antes de lo que ocurriría en condiciones no estimuladas.

En este estudio, se utilizó el modelo de “flushing” ultracorto para determinar la expresión de genes que modulan la tasa ovulatoria en ovejas. Se evaluó la respuesta en la expresión de RNAm para aromatasa P450 y la maduración folicular a través de la expresión de RNAm para 3 β -HSD y LHr en folículos antrales de ovejas sometidas a “flushing” ultracorto al momento de la luteólisis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales experimentales

El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) de la FMVZ de la UNAM aprobó los procedimientos y el manejo de los animales.

Se utilizaron 30 ovejas dentro de la estación reproductiva natural, con un peso promedio de 35 Kg y una condición corporal promedio de 2. Los animales recibieron una dieta de mantenimiento, basada en heno de alfalfa y grano de avena, suministrada en dos períodos, a las 10:00 h y a las 17:00 h.

Diseño experimental

Las ovejas se sincronizaron con esponjas intravaginales impregnadas con fluorogestona (Cronogest) por 10 días y 48 horas antes del retiro de la esponja se les colocó una inyección i.m. de 125 μ g de un análogo de prostaglandina F_{2 α} , cloprostenol, para inducir la luteólisis. Las ovejas se asignaron a un grupo tratado que recibió una dosis oral única (300 ml) de glicerol a 90%; a un grupo testigo, que recibió agua al momento de retirar la esponja; o a un grupo control sincronizados, pero sin tratamiento (control tiempo 0h). Los folículos ováricos se recuperaron por

ovariectomía a las 0, 12, 24 y 48 h posteriores al retiro de la esponja y del tratamiento con glicerol o agua. Los folículos \geq a 3 mm de diámetro se disecaron y conservaron para su posterior procesamiento (Ver figura 1).

Recolección de los ovarios

A las ovejas, bajo anestesia con Ketamina i.v. a una dosis de (2,2 mg/Kg) asociada con Xilacina al 2%, i.v. (0.1 mg/Kg), se les realizó ovariectomías a las 0, 12, 24 y 48 horas de haber retirado el progestágeno y de la administración de los tratamientos. Se obtuvieron los dos ovarios, que se depositaron en placas de petri estériles (Corning, NY, USA), y se realizó la disección de los folículos \geq 3 mm de diámetro. A cada folículo sano macroscópicamente (por color e irrigación) se le midió el diámetro, se hemiseccionó y se colocó en tubos de 1.5 ml estériles, con RNAlater™, reactivo de estabilización de RNA (Qiagen), y se almacenó a -80°C , hasta su posterior procesamiento para la extracción de RNA. Todos los folículos \geq 1 mm de diámetro se contaron bajo una lupa y el resto del ovario se almacenó a -80°C en tubos estériles de 50 mL.

Extracción de RNA, Retrotranscripción y PCR de tiempo real

Los folículos \geq 3 mm de diámetro se homogeneizaron a temperatura ambiente en 1 ml de reactivo Tri[®] (Sigma Chemical Co. Ltd) y usando un homogenizador de tejido Tearor™ de Daigger[®] (Daigger & Company. Inc.). La extracción de RNA total se realizó de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. El RNA obtenido fue disuelto en 50 μl de agua inyectable (Pisa, SA de CV (Mexico)) y, posteriormente, tratado con DNAsas (Kit DNA-free™, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La concentración y pureza se determinaron por la medición de la absorbancia a 230, 260 y 280 nm, así como por las relaciones 260/280, 230/260, en un espectrofotómetro Uv-Vis NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Wilmington DE, USA).

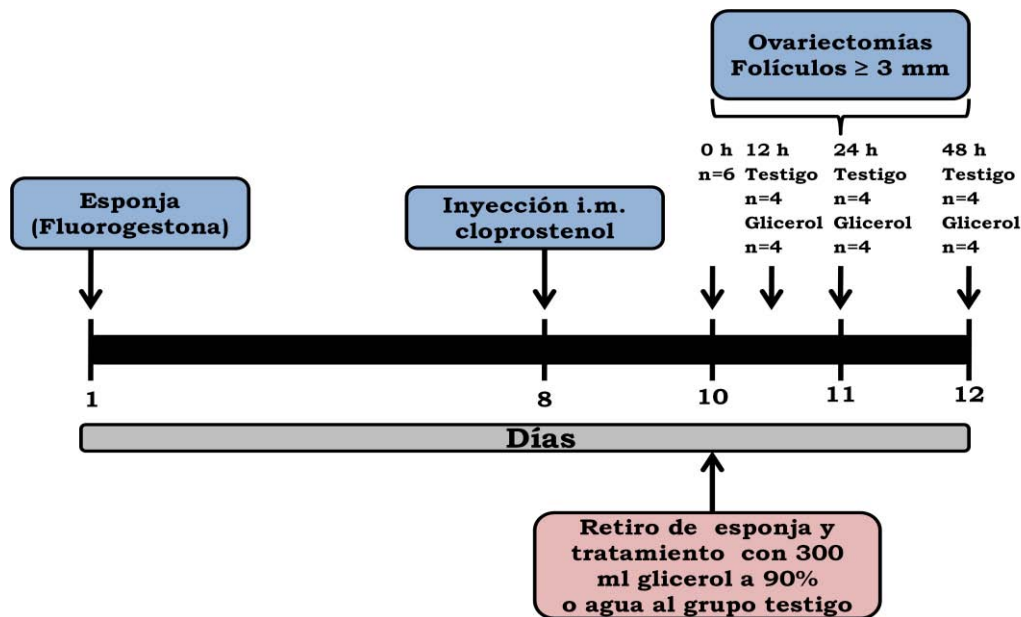


Figura 1. Diseño experimental

El RNA total de cada folículo (1 μg) se utilizó para la transcripción reversa con un volumen total de mezcla de reacción de 21 μl . Se añadió 1 μg de RNA y se utilizaron cebadores aleatorios, de acuerdo con las instrucciones del Kit SuperScript First-Strand (Invitrogen).

La expresión de RNAm para aromatasa P450, $3\beta\text{HSD}$ y LHR en homogeneizados de folículos se cuantificó por PCR en tiempo real y se utilizaron los primers que se muestran en el Cuadro 1. Los cebadores y las sondas Taqman fueron diseñados por Applied Biosystems. Se utilizaron los siguientes ciclos de amplificación: 95°C por 10 min y 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min. Se utilizó TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La cantidad de RNAm expresada en las células foliculares se estimó a través de una curva estándar realizada para cada gen. Se realizó un pool con 2 μl del cDNA de las muestras y se amplificó por PCR con los cebadores indicados antes, a 95 °C por 10 min y 40 ciclos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis a 2.5%; posteriormente, se identificaron con un transiluminador y se extrajeron de los gels con el Kit

QIAquick Gel Extraction. El Kit PCR Purification MinElute (Qiagen) se utilizó para la purificación del producto de PCR. Para la cuantificación de los extractos se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop. El número de copias de cDNA total se calculó de acuerdo con Tricarico *et al.* (2002). El número de copias para las muestras desconocidas se calculó por regresión lineal (Software Step One™) y cada curva estándar se realizó en un rango de 1×10^9 a 1×10^3 copias. Los parámetros de la PCR en tiempo real fueron: para aromatasa, $r^2 = 0.99$ y una eficiencia de 99%; para LHr, $r^2 = 0.99$ y una eficiencia de 102%; para 3β -HSD, $r^2 = 0.99$ y una eficiencia de 97%.

Cuadro 1. Secuencias de las sondas y los cebadores, tamaño del amplicón generado por RT-PCR de tiempo real para el receptor de LH, aromatasa P450 y 3β -HSD de oveja.

Gen	Primers utilizados	Sonda Taqman (5'-3')	Amplicon (pb)	Nº de acceso GenBank
LHr (<i>Ovis aries</i>)	Sentido (5'-3')	FAM-	65	L36329 GI:1196881
	GTCATGCCTTCAATGGGACAAC	CAGCTCCAGGGAAATC		
	Antisentido (5'-3')			
	CTTCTTCAGGTGTGCATTCTCCTT			
P450arom (<i>Ovis aries</i>)	Sentido (5'-3')	FAM-	87	NM_174305 Bovino AJ012153 oveja
	CTCTCCTTCTCAAACCAGACATCTT	ACAGCCAAGAAATCTT		
	Antisentido (5'-3')			
	ATGGCATCTTTCAAGTCCTTGACA			
3β-HSD (<i>Ovis aries</i>)	Sentido (5'-3')	FAM-	77	NM_001135 932
	ACCTTGACTACTTGTGCCTTGAG	ATGGGCTCCCCTCCCC		
	Antisentido (5'-3')			
	CCATGCATGTAGGCAGAAAGGA			

Los primers y las sondas se diseñaron con el Software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, CA, USA), las secuencias se tomaron del GenBank y fueron sintetizadas por Applied Biosystems.

Análisis estadístico

Los datos para las variables aromatasa P450, LHr y 3 β -HSD se transformaron a logaritmo natural para corregir la heterogeneidad de la varianza. Para determinar el efecto de tratamiento, se usó un diseño completamente al azar y se utilizó el procedimiento de modelo lineal general (PROC GLM; SAS, 1999). La comparación de medias se realizó por la prueba de Dunnett, entre los tratamientos y el control tiempo 0h y por el método de medias de mínimos cuadrados entre los tratamientos testigo y glicerol. Para detectar diferencias en el número de folículos entre los tratamientos y entre tratamientos con el control tiempo 0h, se utilizó una prueba no paramétrica (Prueba U-Mann-Whitney; SAS, 1999). Se consideró significativa la diferencia entre las medias al nivel de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Expresión ovárica de RNAm para aromatasa P450

Se encontró efecto de tratamiento en la expresión de la aromatasa P450 en homogeneizados de folículos ≥ 3 mm de diámetro. Se observaron diferencias entre los tratamientos y el control tiempo 0h. En el grupo testigo aumentó la expresión de la enzima a las 12 ($P=0.05$) y a las 48 horas ($P=0.04$) posterior al tratamiento con respecto al control tiempo 0h. No se encontraron diferencias entre el grupo con glicerol y el control tiempo 0h. Se detectó una disminución significativa ($P=0.01$) a las 12 horas en el grupo con glicerol, comparado con el grupo testigo con agua en el mismo tiempo (Figura 2; panel A).

Expresión ovárica de RNAm para 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

No se encontró efecto de tratamiento en la expresión del RNAm que codifica para 3 β -HSD. La cantidad de copias/ μ g RNA fue similar entre el grupo testigo y el grupo tratado con glicerol en los tiempos estudiados. Sin embargo, se encontró un

un aumento desde las 0h hasta las 48h (Figura 2; panel B) tanto en el grupo testigo (P=0.01) como en el grupo con glicerol (P=0.02)

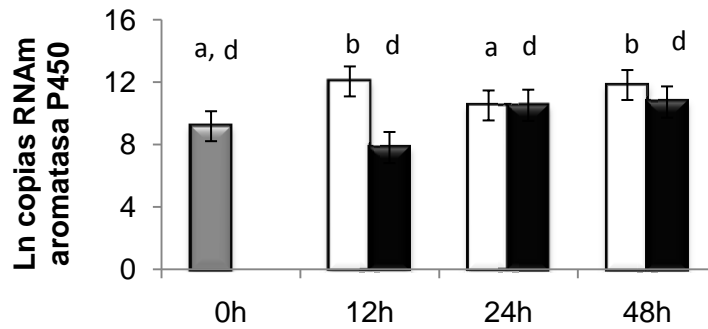
Expresión ovárica de RNAm para LHr

No se encontró efecto de tratamiento en la expresión del RNAm que codifica para LHr y la cantidad de copias/ μ g RNA fue similar entre el grupo testigo y el grupo tratado con glicerol en los tiempos estudiados (Figura 2; panel C).

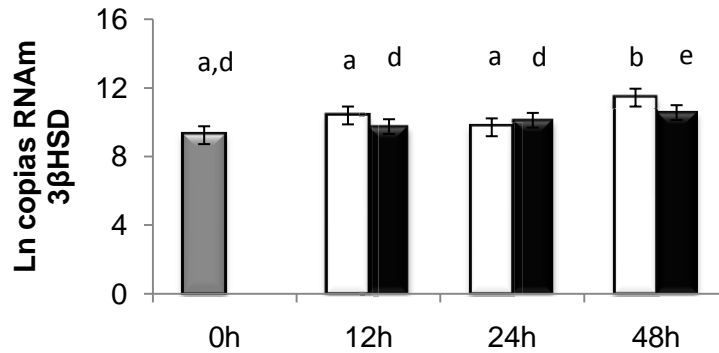
Número de folículos

El tratamiento con glicerol aumentó el número de folículos \geq a 3 mm de diámetro a las 48 horas (Cuadro 2). No se encontraron diferencias en el número de esta clase de folículos a las 12 o 24 horas entre el grupo testigo y el grupo con glicerol. No se encontraron diferencias en el número de folículos $\geq 1 < 3$ mm de diámetro.

A)



B)



C)

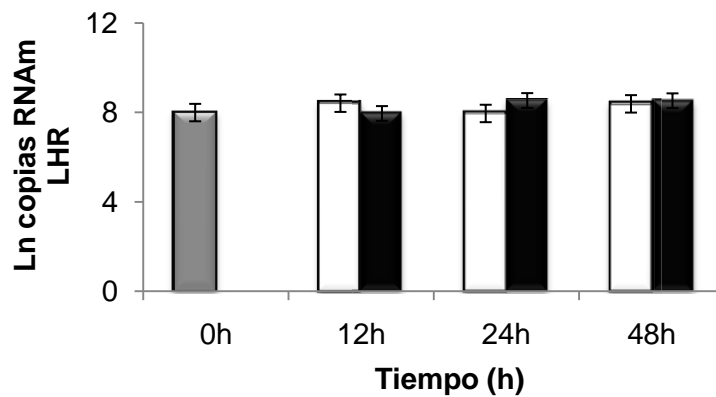


Figura 2. Efecto de la suplementación con glicerol (barras oscuras) o con agua (testigo; barras blancas) y control tiempo 0h (barras grises) sobre las cantidades de RNAm para (A) aromatasa P450, (B) 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3βHSD) y (C) receptor de LH (LHR). Los valores representan la media del logaritmo natural del número de copias de cDNA por microgramo de RNA ± el error estándar de la media de los tratamientos. ^{abc} Letras diferentes indican diferencias entre el grupo testigo y el control tiempo 0h (P < 0.01). ^{def} Letras diferentes indican diferencias entre el grupo glicerol y el control tiempo 0h (P < 0.01).

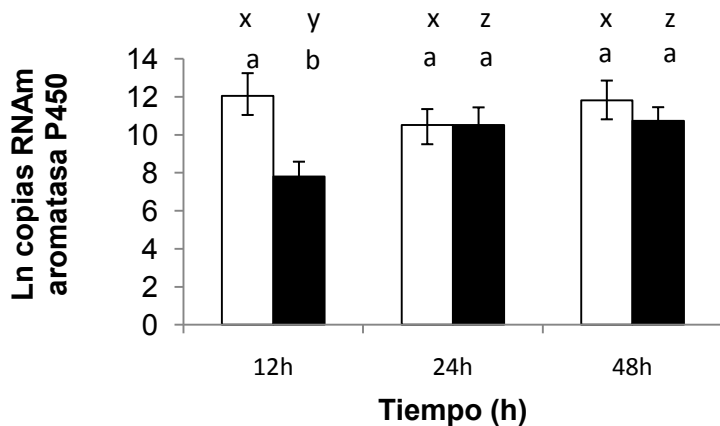


Figura 3. Efecto de la suplementación con glicerol (barras oscuras) o con agua (barras blancas) sobre las cantidades de RNAm para la aromatasa P450. Los valores representan la media del mínimo cuadrado del logaritmo natural del número de copias de cDNA por microgramo de RNA \pm el error estándar de la media de los tratamientos. ^{abc} Letras diferentes indican diferencias entre grupos del mismo tiempo ($P < 0.01$). ^{xyz} Letras diferentes indican diferencias dentro del mismo grupo a través del tiempo ($P < 0.01$).

Cuadro 2. Número de folículos en ovejas suplementadas con y sin glicerol a las 0, 12, 24 y 48 horas postratamiento.

Diámetro del folículo (mm)	Tratamientos							
	Tiempo 0h		Tiempo 12h		Tiempo 24 h		Tiempo 48 h	
	Testigo (n=6)	Glicerol (n=4)	Testigo (n=4)	Glicerol (n=4)	Testigo (n=4)	Glicerol (n=4)	Testigo (n=4)	Glicerol (n=4)
$\geq 1 < 3$	13.29 \pm 2.31	17.50 \pm 1.89	12.83 \pm 2.02	23.00 \pm 4.69	20.00 \pm 3.78	18.00 \pm 4.36	17.33 \pm 4.69	
≥ 3	1.00 \pm 0.22	1.25 \pm 0.25	1.83 \pm 0.30	1.50 \pm 0.28	1.25 \pm 0.25	1.00 ^a \pm 0.00	2.75 ^b \pm 0.75	

^{ab} Letras diferentes dentro de la fila y del tiempo, indican diferencias ($P < 0.01$). Los valores representan la media \pm error estándar de la media.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que el “flushing” ultracorto disminuye significativamente la expresión de RNAm para aromatasa 12 horas después de retirar el progestágeno. Adicionalmente, aumentó el número de folículos ≥ 3 mm de diámetro, sin cambios en la expresión de RNAm para 3β -HSD y LHr.

La disminución en la expresión de RNAm para la aromatasa P450 nos sugiere cambios en la retroalimentación estradiol-FSH, con la consecuente disminución en la secreción de estradiol y en la inhibición que este produce sobre la FSH. Esto afecta el mecanismo de retroalimentación negativa sobre FSH, rescata otros folículos de la atresia y aumenta el número de folículos destinados a ovular.

Estos resultados están de acuerdo con estudios previos sobre el efecto de la suplementación nutricional aguda en los componentes del sistema de retroalimentación negativa en ovejas. Algunas evidencias indican que el aumento de la tasa ovulatoria está fuertemente asociado a una disminución en la concentración de estradiol, lo que permite un incremento transitorio de FSH, lo que a su vez, permite el incremento en el número de folículos destinados a ovular (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Scaramuzzi *et al.*, 2006; Somchit *et al.*, 2007). Sin embargo, los esfuerzos por encontrar correlaciones entre nutrición, cambios en el mecanismo de retroalimentación negativa FSH-estradiol y tasa ovulatoria han producido resultados contradictorios.

Al respecto, en ovejas sincronizadas con progestágenos, una infusión intravenosa de glucosa por 72 horas, aumentó el número de folículos > 2 mm de diámetro, con una disminución significativa en la expresión de aromatasa en células de la granulosa y en la secreción de estradiol a las 27 horas de la infusión, pero no hubo efecto en las concentraciones de FSH en sangre (Gallet *et al.*, 2009). De igual forma, Somchit *et al.* (2009) indican que la suplementación con

grano lupino por 5 días, en ovejas, aumentó el número de folículos > 1 mm de diámetro, disminuyó la concentración de estradiol y la expresión de aromatasa y no afectó la concentración de FSH. De estos estudios, se puede concluir que probablemente los cambios en FSH circulante son rápidamente corregidos por el sistema de retroalimentación esteroide-gonadotropinas y no alcanzan a ser detectados. Es conocido el papel central de las gonadotropinas en la regulación de la foliculogénesis, sin embargo, hay fuertes evidencias que muestran que el folículo responde a acciones directas de la nutrición, pero hay pocas evidencias que muestran que la nutrición afecta la foliculogénesis indirectamente por incrementar la secreción de gonadotropinas (Scaramuzzi *et al.*, 2010)

Las evidencias previas han relacionado los cambios en los componentes del sistema de retroalimentación y el aumento en el número de folículos con aumentos en las concentraciones de glucosa e insulina. En primer lugar, estudios *in vitro* de cultivos de células de la granulosa (Campbell *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1997) y de la teca (Campbell *et al.*, 1998) señalan que la insulina incrementa la esteroidogénesis y la proliferación celular inducida por las gonadotropinas. En segundo lugar, *in vivo*, se ha visto que la insulina o los tratamientos que causan aumentos agudos en la insulina, aumentan el número de folículos y disminuyen la expresión de la aromatasa en folículos estrogénicos (Gallet *et al.*, 2009), así como las concentraciones circulantes de estradiol (Letelier *et al.*, 2008; Gallet *et al.*, 2009). Además, se detectó la presencia de transportadores GLUT4 tanto en células de la granulosa como de la teca en folículos antrales de oveja (Williams *et al.*, 2001). Así mismo, las células foliculares en medio de cultivo carente de glucosa tienen menor producción de esteroides que las células cultivadas con glucosa (Stewart *et al.*, 1995). En conjunto, las evidencias indican que el sistema glucosa-insulina está implicado en la regulación nutricional de la foliculogénesis y de la tasa de ovulación en la oveja.

Sin embargo, poco se conoce acerca de la vía de señalización utilizada por la insulina o sus efectos sobre la señalización de FSH en las células de la

granulosa. Al respecto, en un estudio en ovejas con una infusión intravenosa de glucosa por 72 horas, los niveles de Akt (cinasa de serina/treonina) y AMPK (cinasa de monofosfato de adenosina) fosforiladas se encontraron reducidos. Los autores sugieren que la disminución en las proteínas podría indicar que la vía de señalización de la cinasa 3 de fosfatidilinositol (PI3K) se inhibió en respuesta a la infusión continua de glucosa y, probablemente, la disminución en PI3K afectó a la Akt, una de las proteínas en la vía de señalización de la insulina. La probable participación de Akt afectaría la producción de aromatasa y los autores sugieren que pueden existir vías de comunicación cruzada entre las vías de señalización de insulina (ERK/PI3K) y las de FSH (AMPc/PKA) en las células de la granulosa (Gallet *et al.*, 2009). Sin embargo, no está claro si estos efectos de la nutrición, mediados por la insulina, alteran las vías de señalización estimuladas por FSH a nivel intracelular o la actividad de la aromatasa estimulada por FSH (Scaramuzzi *et al.*, 2006; Somchit *et al.*, 2007).

En los resultados de nuestro estudio, también se observa que la expresión de RNAm para la enzima aromatasa P450 en el grupo testigo aumenta a las 12 y a las 48 horas y en el grupo con glicerol lo hace a las 48 horas, comparados con el tiempo 0h. Estudios previos han demostrado la correlación positiva entre las concentraciones séricas de estradiol y la cantidad de aromatasa en las células de la granulosa en folículos que crecen desde 3 a ≥ 5 mm de diámetro (Duggavathi *et al.*, 2006). De igual forma, se sabe que a medida que el folículo dominante madura, tiene una alta expresión de aromatasa en las células de la granulosa, altas concentraciones de estradiol en el líquido folicular y se inducen los receptores de LH en las células de la granulosa (Campbell *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 2003). En este sentido, los resultados del presente estudio indican que el aumento en la expresión de aromatasa, aumenta la producción de estradiol a medida que el folículo madura. Todo lo anterior, confirma el hecho de que el folículo ovulatorio tiene una máxima actividad de aromatasa, tiene los niveles más

altos de estradiol intrafolicularmente (Hsueh *et al.*, 1984) y es el responsable del 90% de las concentraciones circulantes de esta hormona (Baird *et al.*, 1991).

El modelo de flushing ultracorto que utilizamos en el presente estudio tiene la ventaja de identificar el momento de la selección e indica la ventana fisiológica durante la cual los folículos son susceptibles de ser estimulados y rescatados de la atresia. En este estudio propusimos como hipótesis que el aumento en la concentración de insulina provocado por el flushing, producía cambios en la expresión de RNAm aromatasa P450 como uno de los componentes del sistema de retroalimentación negativa estradiol-FSH y en la expresión de RNAm de marcadores de maduración folicular como 3 β -HSD y LHr en folículos antrales.

Se encontró un aumento en la expresión de RNAm para 3 β -HSD, desde las 12 a las 48 horas postratamiento en ambos grupos, aunque el tratamiento no afectó la expresión de RNAm para 3 β -HSD. Nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos que indican que hay un aumento progresivo en la expresión de RNAm para 3 β -HSD en células de la granulosa y de la teca en folículos que crecen desde 3 a \geq 5 mm de diámetro (Duggavathi *et al.*, 2006). Además, está demostrado que a medida que el folículo crece produce altas cantidades de progesterona (Hanukoglu, 1992) y que el incremento en RNAm que codifican para P450scc, P450c17 y 3 β -HSD, pero no de aromatasa P450, está asociado con la diferenciación de los folículos preovulatorios durante la fase folicular en la vaca (Tian *et al.*, 1995). En estudios previos, en ovejas (White *et al.*, 1987; Spicer *et al.*, 1995; Jolly *et al.*, 1997) y en vacas (Fortune y Hansel, 1985), el folículo preovulatorio después del pico de LH tuvo una alta concentración en progesterona. Duggavathi *et al.* (2006) indican que la mayor producción de progesterona por el folículo dominante se debe a la mayor abundancia de transcritos de 3 β -HSD en células de la granulosa. En conjunto esto pudiera indicar que los folículos que crecen en una oleada folicular además de producir estradiol pueden iniciar la producción de progesterona y prepararse para la luteinización. En nuestro estudio, el aumento en la expresión de RNAm para 3 β -

HSD, desde las 0h hasta las 48 horas de retiro del progestágeno, sugiere el inicio de la producción de progesterona por las células foliculares antes de la ovulación.

Medimos otro marcador de maduración LHr. Durante el desarrollo folicular los receptores para LHr primeramente se detectan en células de la teca y a medida que el folículo se desarrolla uno de los eventos que marca la selección folicular es la aparición de receptores de LHr sobre las células de la granulosa (Bao *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 2011). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontró efecto de tratamiento ni de tiempo sobre la expresión de RNAm para LHr, probablemente debido a que se realizó un homogeneizado del folículo completo y no se realizó una separación de las células foliculares. Quizás, la abundancia de transcriptos en las células de la teca no permitió que se encontrara una diferencia significativa en los folículos, en los tiempos estudiados y en respuesta al tratamiento.

Finalmente, el efecto del “flushing” ultracorto sobre la expresión de RNAm para aromatasa P450, probablemente es causado por el aumento transitorio en las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina producido por el glicerol. Al respecto, estudios previos (Ferraro *et al.*, 2009a), de producción de gas *in vitro*, han demostrado que el glicerol presenta una fase lag mas larga comparado con propilenglicol y melaza. Asi mismo, el glicerol y propilenglicol son fermentados principalmente a propionato. *In vivo*, (Ferraro *et al.*, 2009b) una dosis de glicerol y propilenglicol en cantidades isoenergéticas provocan una respuesta glicémica mayor que la observada en el grupo con melaza. Sin embargo la respuesta insulinémica es mayor en el grupo con glicerol, comparado con tratamientos con propilenglicol o melaza. De tal forma, que las evidencias indican que el glicerol se fermenta lentamente y que esto permite su paso al intestino o su absorción, ofreciendo al hígado un sustrato glucogénico que incrementará las concentraciones sanguíneas de glucosa y por tanto de insulina. De esta forma, el glicerol puede aumentar la producción hepática de glucosa, bien sea por su conversión a propionato o directamente a partir de glicerol absorbido.

Conclusión

El “flushing” ultracorto aumenta el número de folículos potenciales ovulatorios, al disminuir la expresión de RNAm para la aromatasa P450. Este efecto parece estar mediado por el sistema glucosa-insulina. Se propone que esta respuesta al “flushing”, está mediada por el efecto de insulina sobre las vías de señalización de FSH en las células de la granulosa. Sin embargo, determinar si el efecto de insulina es permisivo o determinante en el aumento de la tasa ovulatoria abre las perspectivas de estudio, en relación con la vía de señalización de insulina involucrada en el aumento de la tasa ovulatoria, vía la señalización de FSH o en la actividad de aromatasa.

REFERENCIAS

- Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1991; 43: 125-138.
- Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles *Biol Reprod* 1997; 56: 1158–1168.
- Bao B, Garverick HA. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci* 1998; 76: 1903-1921.
- Campbell BK, Scaramuzzi R, Webb R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 1995; 49: 335-350.
- Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum free media. *J Reprod Fertil* 1996; 106: 7–16.

Campbell BK, Baird DT, Webb R. Effects of dose of LH on androgen production and luteinization of ovine theca cells cultured in a serum-free system. *J Reprod Fertil* 1998; 112: 69–77.

Campbell BK. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Anim Reprod* 2009; 6 (1): 159-171.

Davis GH. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol* 2005; 37 (Suppl 1): S11-S23.

Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. A mixture of the branched chain amino acids leucine, isoleucine and valine increases ovulation rate in ewes when infused during the late luteal phase of the oestrous cycle: An effect that may be mediated by insulin. *Journal of Endocrinology* 1995; 145: 315-323.

Duggavathi R, Janardhan K, Singh J, Singh B, Barrett D, Davies K, Bagu E, Rawlings N. Patterns of expression of steroidogenic enzymes during the first wave of the ovine estrous cycle as compared to the preovulatory follicle *Animal Reproduction Science* 2006; 91: 345–352.

Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Persani L, Monget P and Monniaux D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive biology and endocrinology* 2006; 4: 20-31.

Ferraro S, Mendoza M, Miranda L, Gutierrez CG. *In vitro* gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. *Animal Feed Science and Technology* 2009a; 154: 112–118.

Ferraro S, Mendoza G, Miranda L, Gutiérrez CG. Kinetics of ruminal fermentation *in vitro* of glycerol, propylene glycol, molasses and their drenching effect in blood concentrations of glucose and insulin in ewes. In: Chilliard Y, Glasser F, Faulconnier Y, Bocquier F, Veissier I, Doreau M (eds), *Ruminant Physiology*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 2009b: 176-177.

Fortune J and Hansel W. Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol Reprod* 1985; 32: 1069–1079.

Gallet C, Dupont J, Monniaux D, Campbell BK, Scaramuzzi RJ. The infusion of glucose reduces circulating concentrations of oestradiol and the level of aromatase in granulosa cells of ewes in the luteal phase of the oestrous cycle. In: Chilliard Y, Glasser F, Faulconnier Y, Bocquier F, Veissier I, Doreau M (eds), Ruminant Physiology. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 2009: 742–743.

Gherardi PB and Lindsay D. Response of ewes to lupin supplementation at different times of the breeding season. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 1982; 22: 264-267.

Ginther O, Beg M, Bergfelt D, Kot K. Activin A, estradiol and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. Biol Reprod 2002; 67: 14-19.

Gutiérrez CG, Campbell B, 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.

Gutiérrez CG, Martínez V, Saharrea A, Rangel L, Lassala A, Pérez H. Increased ovulation rate after a single drench with glicerol solution at the time of luteolysis in sheep. In: Proceedings Society study for reproduction; 2007 Julio 21-25; San Antonio, Texas. USA. Abstract 225, p 130.

Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. J Steroid Biochem Mol Biol 1992; 43: 779–804.

Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. Endocrinology Review 1984; 5: 76-127.

Hunter M, Robinson R, Mann G, Webb R. 2004. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. Animal Reproduction Science 2004; (82-83): 461-477.

Jolly P, Tisdall D, De'ath G, Heath D, Lun S, Hudson N, McNatty K. Granulosa cell apoptosis, aromatase activity, cyclic adenosine 3',5'- monophosphate response to

gonadotropins, and follicular fluid steroid levels during spontaneous and induced follicular atresia in ewes. *Biol Reprod* 1997; 56: 830–836.

Letelier C, Mallo F, Encinas T, Ros JM, Gonzalez-Bulnes A. Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without effects on ghrelin secretion. *Reproduction* 2008; 136: 65–72.

Luo W, Gumen A, Haughian J, and Wiltbank M. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biol Repro* 2011; 84: 369–378.

Martínez V. 2004. Efecto del tratamiento con una solución glucogénica oral sobre la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 107 p.

McNatty J, Galloway S, Wilson T, Smith P, Hudson N, O'Connell A, Bibby A, Heath D, Davis G, Hanrahan J and Juengel J. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol* 2005a; 37 (Suppl. 1): S25–S38.

McNatty K, Smith P, Moore L, Reader K, Lun S, Hanrahan J, Groome N, Laitinen M, Ritvos O, Juengel J. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005b; 234: 57–66.

Muñoz-Gutierrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction* 2002; 124: 721-731.

Oldham C and Lindsay DR. The minimum period of intake of lupin grain required by ewes to increase their ovulation rate when grazing dry summer pasture. In: *Reproduction in sheep*. Lindsay D.R., Pearce D.T. (eds), Australian Academy of Science Australian Wool Corporation, 1984: 274-276.

Scaramuzzi R, Campbell B, Downing J, Kendall N, Muhammad K, Muñoz-Gutiérrez 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 Dev* 2006; 46: 339-354.

Scaramuzzi R, Brown H and Dupont J. Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: A Perspective. *Reprod Dom Anim* 2010; 45 (Suppl. 3): 32–41.

Somchit A, Khalid M, Campbell BK, Scaramuzzi RJ. The effects of short-term nutritional supplementation with lupins (*Lupinus luteus*) on the number of ovarian follicles and the concentrations of follicular hormones and glucose in ewes during the luteal phase of the oestrous cycle. *Theriogenology* 2007; 68: 1037–1046.

Somchit A, Campbell B, Khalid M, Scaramuzzi R. Short-term nutritional supplementation with lupin grain increases total IRS-2 and IRS-4 and decreases aromatase in ovine granulosa cells. In: Chilliard Y, Glasser F, Faulconnier Y, Bocquier F, Veissier I, Doreau M (eds), *Ruminant Physiology*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 2009: 780-781.

Spicer L, Echtenkamp S, Wong E, Hamilton D, Vernon R. Serum hormones, follicular fluid steroids, insulin-like growth factors and their binding proteins, and ovarian IGF mRNA in sheep with different ovulation rates. *J Anim Sci* 1995; 73: 1152–1163.

Statistical Analysis Systems Institute. SAS[®] Software, Version 8.2. 2001. SAS Institute, Inc., Cary, NC

Stewart R and Oldham CM. Feeding lupins to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 1986; 16: 367-370.

Stewart R, Spicer L, Hamilton T, Keefer B. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J Anim Sci* 1995; 73: 3719-3731.

Tian XC, Berndtson AK and Fortune JE. Differentiation of bovine preovulatory follicles during the follicular phase is associated with increases in messenger

ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase, but not P450 aromatase *Endocrinology* 1995; 136: 5102–5110.

Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin S, and Orlando C. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry* 2002; 309: 293–300.

Webb R, Braincourt M, Hanrahan J. Ovulation rate in ewe: mechanisms underlying genetic variation. In: *Proceedings of the 6th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production* 1998; 27: 3-10.

Webb R, Gosden R, Telfer E and Moor R. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim Sci* 1999; 68: 257-284.

Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl* 2003; 61:71-90.

Webb R and Campbell B. 2007. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007; **64**: 141–163.

White L, Keisler D, Dailey R, Inskeep E. Characterization of ovine follicles destined to form subfunctional corpora lutea. *J Anim Sci* 1987; 65: 1595–1601.

Williams S, Blache D, Martin G, Foot R, Blackberry M and Scaramuzzi R. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction* 2001; 122: 947-956.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

El “flushing” ultracorto con glicerol en dosis oral única causa disminución en la expresión de RNAm para aromatasas P450 y aumenta el número de folículos potenciales ovulatorios asociado al aumento en las concentraciones de glucosa e insulina por un período transitorio de aproximadamente 12 horas. El glicerol y propilenglicol pueden ser absorbidos intactos o metabolizados a propionato, ofreciendo al hígado un sustrato para la conversión a glucosa. Ambos causan aumentos en insulina, aunque el glicerol causa una respuesta insulinémica mayor.

El “flushing” ultracorto utilizado en el presente estudio actúa únicamente desde el momento de la luteólisis. Ya se demostró que la administración oral de una dosis de glicerol a 90% al momento de la luteólisis incrementa la tasa ovulatoria en ovejas en 80% (Martínez, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2007). Sin embargo, se desconocía la forma en que el glicerol causaba un aumento en el número de folículos seleccionados. Así, se planteó realizar estudios de fermentación *in vitro* (capítulos 2 y 3), e *in vivo* (capítulo 3) para determinar los productos de su fermentación y su acción en la concentración sanguínea de glucosa e insulina. De igual forma, se midió el efecto del propilenglicol y de la melaza, a fin de determinar diferencias y ventajas entre las fuentes energéticas disponibles.

En el capítulo 2 y 3 de la tesis se mostró que el glicerol y el propilenglicol son sustancias glucogénicas. La fermentación lenta del glicerol con una fase lag mayor, comparado con propilenglicol y melaza, sugieren que, *in vivo*, el glicerol puede tener efecto glucogénico al ser absorbido intacto o en su conversión a propionato. Similar actividad glucogénica puede ser adjudicada al propilenglicol, ya que produjo el menor volumen máximo de gas, asociado con una mayor fermentación a propionato. Asimismo, los datos del patrón de fermentación confirmaron el efecto glucogénico de estas dos sustancias, ya que la fermentación

del glicerol aumentó la producción de propionato y butirato y el propilenglicol se fermentó mayormente a propionato.

El glicerol, en condiciones *in vitro*, se fermentó lentamente y aumentó la producción de propionato y butirato. La fase lag más larga y la tasa lenta de degradación del glicerol (capítulos 2 y 3) contrastan con los resultados de Rémond *et al.* (1993), quienes consignaron una fermentación rápida entre 4 y 6 horas del glicerol, en animales adaptados previamente y que consumieron glicerol por dos semanas. En el mismo sentido, Trabue *et al.* (2007), en un estudio *in vitro*, indican que luego de 24 horas, 80% del glicerol es metabolizado por los microbios ruminales. En el primer estudio de esta tesis (capítulo 2) se estimó que se necesitaron entre 28 y 36 horas para producir la mitad del volumen máximo de gas, lo que indicó una fermentación lenta. En el capítulo 3, a partir de la tasa de producción de gas observada, se estimó que la mitad del volumen máximo de gas en el tratamiento de glicerol y alfalfa se produce entre las 12 y 14 horas, y entre las 16 y 18 horas si la combinación fue con ensilado de maíz. Sin embargo, ese estudio mostró que la asociación entre los forrajes y el glicerol permite una disminución en el tiempo de inicio de la producción de gas, comparado con lo obtenido en el primer estudio.

Aunque la fermentación del glicerol en el presente estudio fue más lenta que la señalada por Rémond *et al.* (1993), hay que considerar la adaptación previa de los animales al consumo de glicerol. Si se considera la administración oral del glicerol en una dosis única, la fermentación puede ser lenta, como se observa en este estudio; sin embargo, si el glicerol es consumido continuamente en la dieta, la adaptación de los microbios puede cambiar la cinética y, así, la tasa de degradación y la fase lag. Al respecto Kijora *et al.* (1998) mencionan que en vacas a las cuales se les administraron 200 g de glicerol vía intrarruminal por 6 días, la tasa de degradación fue más rápida en el último día de administración, lo que indicó un mecanismo de adaptación de los microorganismos ruminales a la utilización del glicerol.

Con respecto al patrón de fermentación, el glicerol aumentó la producción de propionato y butirato. Trabue *et al.* (2007) también observaron que la mayor parte del glicerol fue convertido a ácidos grasos volátiles, por la vía glicolítica, disminuyó la producción de acetato y se produjeron ciertas cantidades de valerato y caproato. Estudios realizados por Johns *et al.* (1953) y Garton *et al.* (1961) mostraron que el glicerol fue principalmente fermentado a propionato. La fermentación en el tratamiento de glicerol con alfalfa linealmente redujo la producción de acetato y aumentó la de butirato con el tiempo, o si la combinación fue con ensilado de maíz, el efecto fue cuadrático. La adición de glicerol cambió el patrón de fermentación de los ácidos grasos volátiles; sin embargo, la cinética de producción de gas y el patrón de fermentación del glicerol, cuando se combinó con forrajes, específicamente con ensilado de maíz o alfalfa (capítulo 3), fue similar a lo encontrado en el capítulo 2 y confirmó su lenta fermentación, así como, el aumento en propionato y butirato producto de su fermentación. Con una fase lag más larga el glicerol, en teoría, podría tomar tres vías para su metabolismo: una ruta de desaparición en el rumen hacia la formación de ácido propiónico, absorción directa a través del rumen y pasaje directo al intestino al escapar de la fermentación ruminal. Al respecto, Holtenius *et al.* (2009), mencionan que la rápida tasa de desaparición del glicerol en el rumen observada *in vivo*, fue principalmente debida a la absorción del glicerol y en una menor extensión debida a flujo hacia el intestino y digestión microbiana en el rumen.

Por otra lado, la metabolización *in vitro* del propilenglicol (capítulos 2 y 3) produjo un menor volumen máximo de gas y una mayor proporción en propionato, independientemente de su combinación con alfalfa o ensilado de maíz (capítulo 3). Sin embargo, el volumen máximo de gas producido por el propilenglicol sin forrajes fue 10 veces menor (capítulo 2) a lo encontrado en el segundo estudio (capítulo 3), sugiriendo que la combinación del propilenglicol con los forrajes cambia la cinética de producción de gas. El tiempo medio estimado para obtener el volumen máximo de gas producido por el propilenglicol fue de 11 a 12 horas

(capítulo 2) y de 10 a 14 horas (capítulo 3). Esto fue similar a lo obtenido por Trabue *et al.* (2007), para S- propilenglicol, que se fermentó en 24 horas; sin embargo el R-propilenglicol fue metabolizado más rápidamente y disminuyó en 8 horas. La mayoría del propilenglicol se convierte a ácido propiónico (Velman *et al.*, 1998). Esto fue confirmado en nuestros estudios (capítulos 2 y 3) y fue similar a lo observado en estudios *in vitro* con R- y S- propilenglicol, que se metabolizaron principalmente a propionato, con reducción en acetato y butirato (Trabue *et al.*, 2007). En conjunto, las evidencias indican que la mayoría del propilenglicol puede ser absorbido y utilizado como precursor glucogénico en el rumiante, con algunas diferencias con el glicerol.

El glicerol en dosis oral única aumentó las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina (capítulo 3). La respuesta glicémica fue mayor en los grupos con una sola dosis oral de glicerol y propilenglicol; sin embargo, inició antes en el grupo con glicerol. La respuesta glicémica por glicerol reguló en una forma positiva el aumento en insulina, que inició desde el minuto 30 y se mantuvo por un período aproximado de 12 horas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Goff y Horst (2001), quienes, al administrar 0.83 Kg del glicerol, consiguieron un aumento en la concentración sanguínea de glucosa a los 30 minutos, que permaneció elevada durante 8 horas y retornó a niveles basales a las 24 horas. De igual forma, Linke *et al.* (2004) demostraron que cuando el glicerol se administra a través de un tubo esofágico o con la ayuda de una botella, las concentraciones sanguíneas de glucosa aumentan a las 3 y 1.5 horas respectivamente, mientras que las concentraciones sanguíneas de insulina aumentaron a las 1.1 y 1.4 horas. En el presente estudio, una sola dosis oral de glicerol produjo una respuesta glicémica limitada comparada con la obtenida en el grupo que recibió propilenglicol, y probablemente se debió a que el incremento inicial en glucosa produjo aumento en insulina, la cual posteriormente reguló las concentraciones sanguíneas de glucosa, disminuyéndola.

El propilenglicol, en forma similar al glicerol, aumentó las concentraciones sanguíneas de glucosa e insulina. Miyoshi *et al.* (2001) mencionan que en vacas durante la lactación, después de la administración de 500 ml de propilenglicol vía oral, se incrementaron rápidamente las concentraciones sanguíneas de insulina y glucosa a los 30 minutos y continuaron en incremento gradual hasta los 90 minutos. Este incremento tuvo un efecto lineal en el tiempo para glucosa y un efecto cuadrático para insulina. En nuestro estudio, una sola administración oral de propilenglicol produjo una respuesta glicémica constante en el tiempo posdosis y generó una respuesta insulinémica limitada a los 90 minutos postratamiento, cuando se comparó con la provocada por el glicerol. A pesar del incremento de insulina, se observó que la repuesta glicémica fue constante. Kristensen y Raun (2007) mencionan que el incremento en glucosa, luego de una dosis de 650 g de propilenglicol vía intrarruminal, fue causado principalmente por una disminución en la demanda de glucosa por los tejidos periféricos, a pesar del incremento en insulina. La resistencia a insulina causada por la administración del propilenglicol parece estar asociada al efecto que causa el alcohol producto de su metabolismo, como el propanol.

En el presente trabajo, se comparó directamente la respuesta glicémica e insulinémica entre los tratamientos con glicerol y propilenglicol. Ambos causaron aumento en la concentración sanguínea de glucosa e insulina; sin embargo, se presentaron algunas diferencias entre el glicerol y el propilenglicol en su efecto glucogénico. Aunque ambas sustancias aumentaron la glucosa y la insulina en sangre, la cinética de producción de gas y el patrón de fermentación fue diferente. El glicerol produjo una respuesta glicémica rápida y una respuesta insulinémica mayor con respecto al propilenglicol y la melaza (capítulo 3) y puede ser considerado como un importante precursor glucogénico en los rumiantes. Sin embargo, estudios del patrón de fermentación ruminal del glicerol indican que pueden formarse ciertas cantidades de butirato y otros productos, lo que puede atribuirse a la vía y velocidad de liberación de esta sustancia, lo que afecta su uso

por los microbios ruminales. Entonces, la actividad glucogénica del glicerol depende más de su absorción que de su fermentación a butirato o propionato. Una de las ventajas del glicerol con respecto al propilenglicol es la entrada en una vía gluconeogénica más cercana a la glucosa, la vía de las triosas fosfato. Por otro lado, el propilenglicol presenta características de un sustrato glucogénico basado en una respuesta glicémica constante (capítulo 3) después de su administración, un patrón de fermentación que básicamente incrementa el propionato. El propilenglicol, con un menor volumen máximo de producción de gas (capítulo 2), puede transformarse en ácido propiónico o absorberse intacto a través de las paredes ruminales para metabolizarse en otros compuestos intermediarios en el hígado. A pesar de sus propiedades gluconeogénicas algunos autores mencionan que este compuesto debe ser usado con precaución debido a su toxicidad cuando aumentan los niveles de gases sulfúricos. En contraste, la melaza es un sustrato de rápida fermentación, con una fase lag muy corta y una tasa de producción de gas rápida, asociada a una alta concentración de carbohidratos, especialmente sacarosa (capítulo 2).

La información obtenida de los capítulos 2 y 3 permitió determinar las ventajas de usar glicerol en el “flushing” ultracorto para aumentar la tasa ovulatoria. De esta forma, se diseñó un tercer estudio (capítulo 4) para determinar el efecto de la expresión de genes que modulan la tasa ovulatoria en ovejas. En este sentido, se evaluó la respuesta en la expresión de RNAm para aromatasa P450 y la maduración folicular a través de la expresión de RNAm para 3 β -HSD y LHr en folículos antrales de ovejas sometidas a “flushing” ultracorto al momento de la luteólisis.

La disminución encontrada en la expresión de RNAm para aromatasa P450 en los folículos dominantes después del flushing ultracorto, sugiere cambios en la retroalimentación estradiol-FSH, con la consecuente disminución en la secreción de estradiol y en la inhibición que produce el esteroide sobre la FSH, lo que afecta

el mecanismo de retroalimentación negativa sobre FSH, rescata otros folículos de la atresia y aumenta el número de folículos destinados a ovular.

Estos resultados están de acuerdo con estudios previos sobre el efecto de la suplementación nutricional aguda en los componentes del sistema de retroalimentación negativa en ovejas. Algunas evidencias indican que el aumento de la tasa ovulatoria está fuertemente asociado a una disminución en la concentración de estradiol, que permite un incremento transitorio de FSH, lo que, a su vez, permite el incremento en el número de folículos destinados a ovular (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Scaramuzzi *et al.*, 2006; Somchit *et al.*, 2007). Sin embargo, los esfuerzos por encontrar correlaciones entre nutrición, cambios en el mecanismo de retroalimentación negativa FSH-estradiol y tasa ovulatoria, han producido resultados contradictorios.

Al respecto, en ovejas sincronizadas con progestágenos, con una infusión intravenosa de glucosa por 72 horas, se encontró un aumento en el número de folículos > 2 mm de diámetro, una disminución en la secreción de estradiol a las 27 horas de la infusión, que permaneció reducida hasta el final de la infusión, una disminución significativa en la expresión de aromatasa en las células de la granulosa y no hubo efecto sobre las concentraciones de FSH en sangre venosa yugular (Gallet *et al.*, 2009). De igual forma, Somchit *et al.* (2009) indican que la suplementación con grano lupino por 5 días, en ovejas, aumentó el número de folículos > 1 mm de diámetro, disminuyó la concentración de estradiol y la expresión de aromatasa y no afectó la concentración de FSH.

Evidencias previas han relacionado los cambios en los componentes del sistema de retroalimentación y el aumento en el número de folículos con aumentos en las concentraciones de glucosa e insulina. En primer lugar, estudios *in vitro* de cultivos de células de la granulosa (Campbell *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1997) y de la teca (Campbell *et al.*, 1998) señalan que la insulina incrementa la esteroidogénesis y la proliferación celular inducida por las gonadotropinas.

Segundo, *in vivo*, la insulina o tratamientos que causan aumentos agudos en insulina aumentan el número de folículos y disminuyen la expresión de aromatasa en folículos estrogénicos (Gallet *et al.*, 2009), así como las concentraciones circulantes de estradiol (Letelier *et al.*, 2008; Gallet *et al.*, 2009). Además, se detectó la presencia de transportadores GLUT4 tanto en células de la granulosa como de la teca en folículos antrales de oveja (Williams *et al.*, 2001) y, en conjunto, las evidencias indican que el sistema glucosa-insulina está implicado en la regulación nutricional de la foliculogénesis y de la tasa de ovulación en la oveja.

Sin embargo, poco se conoce acerca de la vía de señalización utilizada por la insulina o sus efectos en la señalización de FSH en las células de la granulosa. Al respecto, en un estudio en ovejas con una infusión intravenosa de glucosa por 72 horas, los niveles de Akt (cinasa de serina/treonina) y AMPK (cinasa de monofosfato de adenosina) fosforiladas se encontraron reducidos. Los autores sugieren que la disminución en las proteínas podría indicar que la vía de señalización de la cinasa 3 de fosfatidilinositol (PI3K) fue inhibida en respuesta a la infusión continua de glucosa. De igual forma, sugieren que pueden existir vías de comunicación cruzada entre las vías de señalización de la insulina y las de FSH en las células de la granulosa (Gallet *et al.*, 2009). Sin embargo, no está claro si estos efectos de la nutrición, mediados por la insulina, alteran las vías de señalización estimuladas por FSH a nivel intracelular o la actividad de la aromatasa estimulada por FSH (Scaramuzzi *et al.*, 2006; Somchit *et al.*, 2007).

El “flushing” ultracorto aumentó el número de folículos potenciales ovulatorios, al disminuir la expresión de RNAm para la aromatasa P450. Este efecto parece estar mediado por el sistema glucosa-insulina. Se propone que esta respuesta al “flushing”, está mediada por el efecto de la insulina en las vías de señalización de FSH en las células de la granulosa. Sin embargo, determinar si el efecto de insulina es permisivo o determinante en el aumento de la tasa ovulatoria abre las perspectivas de estudio, en relación con la vía de señalización de insulina

involucrada en el aumento de la tasa ovulatoria, vía la señalización de FSH o en la actividad de aromatasa.

Finalmente, el efecto que provoca la estimulación nutricional aguda en la tasa ovulatoria parece estar mediado por dos mecanismos: i) por efectos directos de nutrientes o factores intrafoliculares que actúan directamente a nivel del folículo, como glucosa, insulina, leptina o factores de la familia de IGF-I. Este efecto se ha denominado actualmente efecto de señalización de nutrientes. Bajo este efecto, el aumento de la tasa ovulatoria estaría dado por un efecto de señalización de nutrientes sobre el folículo, que lo sensibilizan para promover su crecimiento y desarrollo, aún cuando el soporte gonadotrófico de FSH ha disminuido, debido a la alta secreción de estradiol por parte del folículo dominante (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2002; Viñoles *et al.*, 2005; Viñoles *et al.*, 2010). Este efecto no involucra cambios en las concentraciones circulantes de FSH. ii) Por cambios en el sistema de retroalimentación negativa estradiol-FSH, que conllevan a una disminución en la secreción de estradiol y aumentos en FSH circulante, lo que produciría un aumento en la tasa ovulatoria. Una tercera opción sería, el efecto combinado de la señalización de nutrientes, que a su vez provoca cambios en el sistema de retroalimentación negativa estradiol-FSH.

Referencias

- Abecia J, Lozano J, Forcada F, Zarazaga L. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim Reprod Sci* 1997; 48: 209-218.
- Acosta TJ, Hayashi KG, Matsui M, Miyamoto A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *J Reprod Dev* 2005; 51:273–280.
- Adams GP. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1999; 54: 17-32.
- Aerts JMJ, Bols PEJ. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Dom Anim* 2010a; 45: 171–179.
- Aerts JMJ, Bols PEJ. Ovarian Follicular Dynamics. A review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects. *Reprod Dom Anim* 2010b; 45: 180-187.
- Aguilar C. Evaluación de la administración de glicerol por vía oral en la tasa de ovulación y prolificidad en cabras. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2006; 61 p.
- Anderson R, Fassler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J, Wylie C. Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 1999; 126: 1655–1664.
- Armstrong DG, Gong JG, Webb R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction Suppl* 2002; 61: 403-414.
- Baillet A, Mandon-Pépin B, Cabau C, Poumerol E, Pailhoux E, Cotinot C. Identification of transcripts involved in meiosis and follicle formation during ovine ovary development. *BMC Genomics* 2008; 9:436.
- Baird D, Scaramuzzi R. The source of ovarian oestradiol and androstenedione in the sheep during the luteal phase. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)* 1976; 83: 402-409.
- Baird DT, Swanston IA, McNeilly AS. 1981. Relationship between LH, FSH, and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biol Reprod* 1981; 24:1013-1025.
- Baird DT. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *J Reprod Fertil* 1983; 69:343-352.

Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1991; 43: 125-138.

Ballow DJ, Xin Y, Choi Y, Pangas SA, Rajkovic A. Sohlh2 is a germ cell-specific bHLH transcription factor. *Gene Expr Patterns* 2006; 6: 1014–1018.

Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci* 1998; 76:1903-1921.

Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci M, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod* 2000; 63: 858-864.

Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings NC. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil* 1998; 113: 275-285.

Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC. 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.

Bartlewski P, Vanderpol J, Beard A, Cook S, Rawlings N. Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in anoestrous Finnish Landrace ewes. *Anim Reprod Sci* 2000; 58: 273-291.

Beg MA, Ginther OJ. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 2006; 132: 365-377.

Bendel-Stenzel MR, Gomperts M, Anderson R, Heasman J, Wylie C. The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mech Dev* 2000; 91: 143-152.

Bergman E. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews* 1990; 70 (2): 567-590.

Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 2000; 167: 371–382.

Berisha B, Sinowatz F, Schams D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev* 2004; 67: 162–171.

Bilby TR, Block J, do Amaral BC, Sa O, Silvestre FT, Hansen PJ, et al. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3891–903.

- Binelli M, Murphy B. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reproduction, Fertility and Development* 2009; 22(1): 1–12.
- Bister JL, Paquay R. Fluctuations in the plasma levels of folliclestimulating hormone during estrous cycle, anestrus, gestation and lactation: evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology* 1983; 19: 565- 582.
- Bindon B, Blanc M, Pelletier J, Terqui M, Thimonier J. Periovarian gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep breeds with different fecundity. *J Reprod Fertil* 1979; 55: 15-25.
- Blache D, Chagas LM, Blackberry MA, Vercoe PE, Martin GB. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. *J Reprod Fertil* 2000; 120: 1-11.
- Bondy CA, Chin E, Zhou J. Significant species differences in local IGF-I -II gene expression. *Adv Exp Med Biol* 1993; 343: 73–77.
- Buehr M, McLaren A, Bartley A, Darling S. Proliferation and migration of primordial germ cells in WeWe mouse embryos. *Dev Dyn* 1993; 198: 182–189.
- Buratini J, Price C. Follicular somatic cell factors and follicle development. *Reproduction, Fertility and Development*, 2011, 23, 32–39.
- Butler, WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 2000; 60 – 61: 449–457.
- Butler S, Pelton S, Butler W. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J Dairy Sci* 2006; 89: 2938-2951.
- Campbell B, Scaramuzzi R, Evans G, Downing J. Increased ovulation rate in androstenedione-immune ewes is not due to elevated plasma concentrations of FSH. *J Reprod Fertil* 1991; 91: 655-666.
- Campbell BK, Gordon BM, Scaramuzzi RJ. The effect of ovarian arterial infusion of transforming growth factor α on ovarian follicle populations and ovarian hormone secretion in ewes with an autotransplanted ovary. *J Endocrinol* 1994; 143: 13–24.
- Campbell B, Dobson H, Scaramuzzi R. Ovarian function in ewes made hypogonadal with GnRH antagonist and stimulated with FSH in the presence or absence of low amplitude LH pulses. *J Endocrinol*, 1998a; 156: 213-222.
- Campbell BK, Harkness LM, Armstrong DG, Garverick HA, Webb R, Baird DT. Expression of markers of differentiated cell function in the ovarian follicles of sheep carrying the FecB gene. *Biol Reprod* 1998b; 58: 130.
- Campbell BK, Dobson H, Baird DT, Scaramuzzi RJ. 1999a. Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J Reprod Fertil* 1999a; 117:355-367.

- Campbell BK, Gutiérrez CG, Armstrong DG, Webb R, Baird DT. Leptin: in vitro and in vivo evidence for direct effects on the ovary in monovulatory ruminants. *Human Reproduction* 1999b; 14: 15-16.
- Campbell BK, Telfer EE, Webb R, Baird DT. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. *Molecular and Cell Endocrinology* 2000; 163, 137-139.
- Campbell BK, Souza C, Gong J, Webb R, Kendall N, Marsters P, Robinson G, Mitchell A, Telfer EE, Baird DT. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reprod Suppl* 2003; 61: 429-443.
- Campbell BK, Telfer EE, Webb R, Baird DT. 2004. Evidence of a role for follicle-stimulating hormone in controlling the rate of preantral follicle development in sheep. *Endocrinology* 2004; 145:1870-1879.
- Campbell BK, Kendall NR, Baird DT. 2007. The effect of the presence and pattern of luteinizing hormone stimulation on ovulatory follicle development in sheep. *Biol Reprod* 2007; 76:719-727.
- Campbell BK. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Anim Reprod* 2009; 6 (1): 159-171.
- Carling D, Zammit VA, Hardir DG. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 1987; 223: 217-222.
- Chase C, Kirby C, Hammond A, Olson T, Lucy M. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency *J Anim Sci* 1998; 76: 212-219.
- Chiofalo V, Todaro M, Liotta L, Margiotta S, Manzo T, Leto G. Effect of propylene glycol on pre- and postpartum performance by dairy ewes. *Small Ruminant Res* 2005; 58: 107-114.
- Choi Y, Ballow DJ, Xin Y, Rajkovic A. Lim homeobox gene, *lhx8*, is essential for mouse oocyte differentiation and survival. *Biol Reprod* 2008a; 79: 442-449.
- Choi Y, Yuan D, Rajkovic A. Germ cell-specific transcriptional regulator sohlh2 is essential for early mouse folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Biol Reprod* 2008b; 79: 1176-1182.
- Chung Y, Rico D, Martinez C, Cassidy T, Noirov V, Ames A, Varga G. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. *J Dairy Sci* 2007; 90: 5682-5691.
- Coyral-Castel S, Ramé C, Fatet A, Dupont J. Effects of unsaturated fatty acids on progesterone secretion and selected protein kinases in goat granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology* 2010; 38: 272-283.

- Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, Wagner KU, Hennighausen L. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPAR gamma) does not affect mammary development and pro- pensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J Biol Chem* 2002; 277: 17830–1783.
- Davis GH. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol* 2005; 37 Suppl 1: S11-S23.
- De Felici M, Dolci S. Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers. *Dev Biol* 1991; 147: 281-284.
- Di Carlo A, De Felici M. A role for E-cadherin in mouse primordial germ cell development. *Dev Biol* 2000; 226: 209-219.
- Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 2078–2086.
- Downing JA, 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* 1995a; 146: 403-410.
- Downing JA, Joss J, Connell P, Scaramuzzi RJ. Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Reprod Fertil* 1995b; 103: 137-145.
- Downing JA, Joss J, Scaramuzzi RJ. A mixture of the branched chain amino acids leucine, isoleucine and valine increases ovulation rate in ewes when infused during the late luteal phase of the oestrous cycle: An effect that may be mediated by insulin. *J Endocrinol* 1995c; 145: 315-323.
- Driancourt M, Cahill L, Bindon B. Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and Merino ewes. *J Reprod Fertil*, 1985; 73:93-107.
- Driancourt MA, Gauld IK, Terqui M, Webb R. Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep *J Reprod Fertil* 1986; 78: 565-575.
- Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 2001; 55: 1211-1239.
- Drummond AE. TGFbeta signalling in the development of ovarian function. *Cell Tissue Res* 2005; **322**: 107–115.
- Dupont J, Chabrolle C, Rame´ C, Tosca L, Coyral-Castel S. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors, adenosine monophosphate-activated kinase, and adiponectin in the ovary. *PPAR Res* 2008; 176275

- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, and Themmen AP. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; **143**: 1076–1084.
- Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL, Keisler DH. cDNA cloning and tissue-specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor, and NPY-Y2 receptor. *Domestic Animal Endocrinology* 1997; **14**: 295-303.
- Ebling FJ, Wood RI, Karsch FJ, Vannerson LA, Suittie JM, Bucholtz DC, Schall RE, and Foster OL. Metabolic interphases between growth and reproduction III. Central mechanisms controlling pulsatile luteinizing hormone secretion in the nutritionally growth-restricted female lambs. *Endocrinology* 1990; **126**: 2719 –2727.
- Echternkamp S, Roberts A, Lunstra D, Wise T, Spicer L. Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births *J Anim Sci* 2004; **82**: 459-471.
- Emery R, Brown R, Black A. Metabolism of DL-1,2-propanediol-2-¹⁴C in a lactating cow. *J Nutr* 1967; **92**: 348-356.
- Espinosa MA. 2010. Análisis de la relación funcional entre los estados energéticos estático y dinámico y su papel en la regulación reproductiva en ruminantes. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 153 p.
- Evans AC, Fortune JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 1997; **138**, 2963-2971.
- Evans AC, Duffy P, Hynes N, Boland MP. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 2000; **53**: 699-715.
- Evans, A.C. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Animal Reproduction Science* 2003; **78**, 289-306.
- Forcada F, Abecia J. The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes. *Reprod Nutr Dev* 2006; **46**: 355-365.
- Forman BM, Chen J, Evans RM. The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Anal NY Acad Sci* 1996; **804**, 266–275.
- Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994; **50**: 225-232.
- Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003; **78**, 135–163.

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

Fowler PA, Flannigan S, Mathers A, Gillanders K, Lea RG, et al. Gene expression analysis of human fetal ovarian primordial follicle formation. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 1427–1435.

Gallet C, Dupont J, Monniaux D, Campbell BK, Scaramuzzi RJ. The infusion of glucose reduces circulating concentrations of oestradiol and the level of aromatase in granulosa cells of ewes in the luteal phase of the oestrous cycle. In: Chilliard Y, Glasser F, Faulconnier Y, Bocquier F, Veissier I, Doreau M (eds), *Ruminant Physiology*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, 2009; pp. 742–743.

Galloway S, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen M, Juengel J, Jokiranta S, McLaren R, Luiro K, Dodds K, Montgomery G, Beattie A, Davis G, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000; 25: 279–283.

García A, Hernández J, Valencia J. Efecto de la administración de líquido folicular equino libre de esteroides durante la fase lútea sobre la tasa de ovulación en ovejas Rambouillet. *Vet Méx* 2001; 32: 1-5.

Garcia-Castro MI, Anderson R, Heasman J, Wylie C. Interactions between germ cells and extracellular matrix glycoproteins during migration and gonad assembly in the mouse embryo. *J Cell Biol* 1997; 138: 471-480.

Garor R, Abir R, Erman A, Felz C, Nitke S, Fisch B. Effects of basic fibroblast growth factor on *in vitro* development of human ovarian primordial follicles. *Fertil Steril* 2009; 91, 1967–1975.

Garton G, Lough A, Vioque E. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. *J Gen Microbiol* 1961; 25: 215-225.

Garverick HA, Baxter G, Gong J, Armstrong DG, Campbell BK, Gutierrez CG, Webb R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* 2002; 123:651-661.

Gherardi PB, Lindsay D. Response of ewes to lupin supplementation at different times of the breeding season. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 1982; 22: 264-267.

Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 1995; 43: 689-703.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. *Theriogenology* 1999; 52: 1079–1093.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod* 2000; 63: 383–389.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 2001; 65 638–647.

Goff J, Horst R, Jardon P, Borelli C, Wedam J. Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 1996; 79: 378-383.

Gong J, Bramley T, Webb R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol Reprod* 1991; 45: 941-949.

Gong J, Campbell B, Bramley T, Gutiérrez CG, Peters A, Webb R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 1996a; 55: 68-74.

Gong J, Campbell B, Webb R. Effects of infusion with FSH, with or without LH, on ovarian follicle growth and development in GnRH agonist-treated heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 1996b; Abstract Series 18 Abstract 9.

Gong JG. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 229–241.

Guo MW, Mori E, Xu JP, Mori T. Identification of Fas antigen associated with apoptotic cell death in murine ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1438-1446.

Gutiérrez CG, Oldham J, Bramley TA, Gong JG, Campbell BK, Webb R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *J Anim Sci* 1997a; 75:1876-1884.

Gutiérrez CG, Campbell B, 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.* 1997b; 56: 608-616.

Hall JB, Schillo KK, Hileman SM, Boling JA. Does tyrosine act as a nutritional signal mediating the effects of increased feed on luteinizing hormone patterns in growth restricted lambs? *Biol Reprod.* 1992; 46: 573 –579.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM. Mutations in the genes for oocytederived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 2004; 70: 900–909.

Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway– new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 2004; 117: 5479–5487.

Harlow CR, Cahill DJ, Maile LA, Wardle PG, Hull MG. Time-dependent effects of transforming growth factor alpha on aromatase activity in human granulosa cells. *Hum Reprod* 1995; 10: 2554–2259.

Hastie PM, Haresing W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2006; 92: 284-299.

Hatch CF, Beeson WM. Effect of different levels of cane molasses on nitrogen and energy utilization in urea rations for steers. *J Anim Sci* 1972; 35: 854-858.

Heape W. Abortion, barrenness and fertility in sheep. *Journal of the Royal Agricultural Society* 1899;10:217-248.

Henderson K, Prisk M, Hudson N, Ball K, McNatty K, Lun S, et al. Use of bovine follicular fluid to increase ovulation rate or prevent ovulation in sheep. *J Reprod Fertil* 1986; 76: 623-635.

Hernandez ER. Regulation of the genes for insulin-like growth factor (IGF) I and II and their receptors by steroids and gonadotropins in the ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 219–221.

Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod* 1994; 9:188-191.

Hillier S. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 179:39-46.

Hippen A, De Frain J, Linke P. Glycerol and other energy sources for metabolism and production of transition dairy cows. *Florida Ruminant Nutrition Symposium*. Best Western Gateway Grand, Gainesville, FL. 2008.

Horie K, Takakura K, Taii S, Narimoto K, Noda Y, Nishikawa S, Nakayama H, Fujita J, Mori T. The expression of *c-kit* protein during oogenesis and early embryonic development. *Biol Reprod* 1991; 45: 547-552.

Horie K, Fujita J, Takakura K, Kanzaki H, Suginami H, Iwai M, Nakayama H, Mori T. The expression of *c-kit* protein in human adult and fetal tissues. *Human Reprod* 1993; 8: 1955-1962.

Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrinology Review* 1984; 5: 76-127.

Hsueh AJ, Billig H, Tsafiri A. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrinology Review* 1994; 15: 707-724.

- Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. FSH signalling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal* 2006; 18: 1351–1359.
- Johns A. Fermentation of glycerol in the rumen of sheep. *N Z J Sci Technol* 1953; 35: 262-269.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428: 145–150.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005; 122: 303–315.
- Joyce IM, AT Clark, FL Pendola, JJ Eppig. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* 2000; 63: 1669-1675.
- Karsch FJ, Legan SJ, Ryan KD and Foster DL. Importance of estradiol and progesterone in regulating LH secretion and estrous behavior during the sheep estrous cycle. *Biol Reprod* 1980; 23:404-13.
- Karsch FJ. Endocrine and environmental control of the oestrous cyclicity in sheep. En: *Reproduction in sheep*. Lindsay DR, Pearce DT. Cambridge Univ. Press 1984; pp-10-15.
- Kawase E, Yamamoto H, Hashimoto K, Nakatsuji N. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Dev Biol* 1994; 161: 91-95.
- Kayampilly PP, Menon KM. Follicle stimulating hormone inhibits AMPK activation and promotes cell proliferation of primary granulosa cells in culture through an dependent pathway. *Endocrinology* 2009; 150: 929–935.
- Kendall NR, Guitierrez CG, Scaramuzzi RJ, Baird DT, Webb R, Campbell BK. Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction* 2004; 128: 757–765.
- Keshet E, Lyman S, Williams D, Anderson D, Jenkins N, Copeland N, Parada L. Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J* 1991; 10: 2425-2435.
- Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod* 2005; 73: 967–973.
- Kim J, Prawitt D, Bardeesy N, Torban E, Vicaner C, Goodyer P, Zabel B, Pelletier J. The Wilms' tumor suppressor gene (*wt1*) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2289-2299.

Kiyama Z, Alexander BM, Van Kirk EA, Murdoch WJ, Hallford DM, Moss GE. Effects of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in ewes. *J Anim Sci* 2004; 82: 2548-2557.

Knight P, Glister C. Focus on TGF- β Signalling. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction review* 2006; 132: 191-206.

Komar CM, Braissant O, Wahli W, Curry TE Jr. Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology* 2001; 142: 4831–4838.

Komar CM. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodelling. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 41.

Kosior-Korzecka U, Bobowiec R, Lipecka Cz. Fasting-induced changes in ovulation rate, plasma leptin, gonadotropins, GH, IGF-I and Insulin concentrations during oestrus in ewes. *J Vet Med* 2006; A 53: 5–11.

Kostecka Z, Blahovec J. Insulin-like growth factor binding proteins and their functions (minireview). *Endocrine regulations* 1999; 33: 90-94.

Kristensen N, Raun B. Ruminal and intermediary metabolism of propylene glycol in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2007; 90: 4707-4717.

Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*, 15:201-204.

León Velasco Horacio. Efecto de la condición corporal, sobre hormonas metabólicas y leptina en la función reproductiva de las vaquillas. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2003.

León HV, Hernández-Ceron J, Keisler DH, and Gutierrez CG. Plasma concentrations of leptin, IGF-I, and insulin in relation to changes in body condition scores in heifers. *J Anim Sci* 2004; 82: 445-451.

Letelier C, Mallo F, Encinas T, Ros JM, Gonzalez-Bulnes A. Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without effects on ghrelin secretion. *Reproduction* 2008; 136: 65–72.

Leyva V, Buckrell BC, Walton J. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* 1998; 50 395-416.

Lindsay D, Knight T, Smith J, Oldham C. Studies in ovine fertility in agricultural regions of western Australia: ovulation rate, fertility and lambing performance. *Aust J Agric Res* 1975; 26: 189-198.

- Lindsay DR. Reproduction in the sheep and goat. In: Cupps PT, Editor. Reproduction in domestic animals. California Academic Press, Inc., 1991; 491-515.
- Lindsay D, Martin, G, Williams I. Nutrition and reproduction. *Reproduction in Domesticated Animals: World Animal Sciences Series* Ed. GJ King. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1993; 459-491.
- Linke P, DeFrain J, Hippen A, Jardon P. Ruminal and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. *Journal of Dairy Science* 2004; 87 (Suppl.1): 343 (Abstr.).
- Lucy MC. The bovine dominant ovarian follicle. *Journal of Animal Science* 2007; 85 (E.Suppl.): E89-E99.
- Luo W, Gumen A, Haughian J, Wiltbank M. The Role of Luteinizing Hormone in Regulating Gene Expression During Selection of a Dominant Follicle in Cattle. *Biol Reprod* 2011; 84: 369-378.
- Luo X, Ikeda Y, Parker K. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994; 77: 481-490.
- Marie M, Findlay P, Thomas L, Adam C. Daily patterns of plasma leptin in sheep: Effects of photoperiod and food intake. *J Endocrinol* 2001; 170: 277-286.
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating desensitisation of the glucose transport system: role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* 1991; 266: 4706-4712.
- Martin G, Milton J, Davidson R, Banchemo Hunzicker G, Lindsay D, Blache D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Animal Reproduction Science* 2004; 82-83: 231-246.
- Martin G, Kadokawa H. Clean, green and ethical animal production. Case study: reproductive efficiency in small ruminants. *J Reprod Dev* 2006; 52, (1): 145-152.
- Martin RJ, Wing JM. Effect of molasses level on digestibility of a high concentrate ration and on molar proportions of volatile fatty acid produced in the rumen of dairy steers. *J Dairy Sci* 1966; 49: 846-849.
- Martínez V. Efecto del tratamiento con una solución glucogénica oral sobre la tasa de ovulación en ovejas Pelibuey. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2004. 107 p.
- Marty RJ, Preston TR. Molar proportions of the short chain volatile fatty acids (VFA) produced in the rumen of cattle given high-molasses diets. *Cuban J Agric Sci* 1970; 4: 183-186.
- Matos MH, Lima-Verde IB, Bruno JB, Lopes CA, Martins FS, Santos KD, Rocha RM, Silva JR, Bão SN, Figueiredo JR. Follicle-stimulating hormone and fibroblast growth factor-2

interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19: 677–684.

Matsui Y, Zsebo K, Hogan B. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the *Sf* locus and the ligand for *c-kit*. *Nature* 1990; 347, 667-669.

Matzuk MM, Lamb DJ. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol* 2002; 4:41–49.

Mazerbourg S, Bondy CA, Zhou J, Monget P. The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? a comparative species study. *Reprod Domest Anim* 2003; 38: 247–258.

McGee E, Hsueh A. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* 2000; 21 (2): 200-214.

McNatty KP, Gibb M, Dobson C, Ball K, Coster J, Heath D, Thurley D. Preovulatory follicular development in sheep treated with PMSG and/or prostaglandin. *J Reprod Fertil* 1982; 65: 111-123.

McNatty KP, Heath DA, Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, Smith P, Groome N, Tisdall DJ. Control of early ovarian follicular development. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54, 3–16.

McNatty K, Fidler A, Juengel J, Quirke L, Smith P, Heath D, Lundy T, O'Connell A, Tisdall D. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163:11-20.

McNatty J, Galloway S, Wilson T, Smith P, Hudson N, O'Connell A, Bibby A, Heath D, Davis G, Hanrahan J, Juengel J. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 2005a; 37 (Suppl. 1): S25–S38.

McNatty K, Smith P, Moore L, Reader K, Lun S, Hanrahan J, Groome N, Laitinen M, Ritvos O, Juengel J. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol* 2005b; 234: 57–66.

McNeilly A, Crow W, Brooks J, Evans G. Luteinizing-hormone pulses, follicle-stimulating hormone and control of follicle selection in sheep. *J Reprod Fertil Suppl*, 1992; 45: 5-19.

Mihm M, Austin EJ. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 155–166.

Mihm M, Baker PJ, Ireland JL, Smith GW, Coussens PM, Evans AC, Ireland JJ. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biol Reprod* 2006; 74: 1051–1059.

Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 2005; 130: 583–597.

Monget P, Martin GB. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Human Reproduction* 1997; 12 Supplement 1: 33-52.

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

Monniaux D, Pisselet C. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor- 1 and follicle-stimulating hormone *in vitro*. *Biol Reprod* 1992; 46, 109-119.

Montgomery G, Lord E, Penty J, Dodds K, Broad T, Cambridge L, Sunden S, Stone R and Crawford A. The Booroola fecundity (FecB) gene maps to sheep chromosome 6. *Genomics*. 1994; 22: 148-153.

Montgomery GW, Galloway SM, Davis GH & McNatty KP. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* 2001; 121: 843-852.

Mu YM, Yanase T, Nishi Y, Waseda N, Oda T, Tanaka A, Takayanagi R, Nawata H. Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 710–713.

Muñoz-Gutierrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction* 2002; 124: 721-731.

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

Muñoz-Gutiérrez M, Finlay P, Adam CL, Wax G, Campbell BK, Kendall NR, Khalid M, Forsberg M, Scaramuzzi RJ. The effect of leptin on folliculogenesis and the follicular expression of mRNA encoding aromatase, IGF-IR, IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-5, leptin receptor and leptin in ewes. *Reproduction* 2005; 130: 869–881.

Muscatelli F, Strom T, Walker A, Zanaria E, Recan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W, Achwart H, Kaplan J, Camerino G, Meitinger T, Monaco A. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 1994; 372: 672-676.

Nicholas B, Scougall RK, Armstrong DG, Webb R. Changes in insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) isoforms during bovine follicular development. *Reproduction* 2002; 124: 439-446.

Nielsen N, Ingvarsten K. Propylene glycol for dairy cows. A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Anim Feed Sci Technol* 2004; 115: 191-213.

Nilsson E, Skinner MK. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis *J Soc Gynecol Invest* 2001; 8: 17-20.

Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 175: 123–130.

Nottle MB, Armstrong DT, Setchell BP, Seamark RF. 1985. Lupin feeding and folliculogenesis in the Merino ewe. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia* 1985; 10: 145.

Nottle MB, Seamark RF, Setchell BP. Feeding lupin grain for six days prior to a cloprostenol-induced luteolysis can increase ovulation rate in sheep irrespective of when in the oestrous cycle supplementation commences. *Reproduction Fertility and Development* 1990; 2: 189-192.

Nottle M, Kleeman D, Seamark R. Effect of previous undernutrition on the ovulation rate of Merino ewes supplemented with lupin grain. *Anim Reprod Sci* 1997; 49: 29-36.

Ohkura S, Ichimaru T, Itoh F, Matsuyama S, Okamura H. Further evidence for the role of glucose as a metabolic regulator of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. *Endocrinol* 2004; 145: 3239-3246.

Oktem O, Oktay K. Stem cells: a perspective on oocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 20–26.

Olaso RC, Pairault, B. Boulogne, P. Durand, R Habert. Transforming growth factor beta1 and beta2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis. *Endocrinology* 1998; 139: 733-740.

Olbrich SE, Wayman O. Effect of feeding raw sugar on growth performance and rumen fluid parameters of fattening beef cattle. *J Anim Sci* 1972; 34: 820-825.

Oldham C, Lindsay DR. The minimum period of intake of lupin grain required by ewes to increase their ovulation rate when grazing dry summer pasture. In: *Reproduction in sheep*. Lindsay D.R., Pearce D.T. (eds), Australian Academy of Science Australian Wool Corporation, 1984; pp 274-276.

Oldham CM, Lindsay DR, Martin GB. Effects of seasonal variation in live weight on the breeding activity in Merino ewes. In: *Reproductive physiology of Merino sheep. Concepts and consequences*. Oldham C.M., Martin G.B., Purvis I.W. (eds), School of Agriculture (Animal Science). The University of Western Australia, Perth, 1990; pp 41-58.

Otsuka F, Shimasak S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: Its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8060-8065.

O'Callaghan DO, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil* 2000; 118: 303-313.

Parr RA, Davis IF, Squires TJ, Miles MA. Influence of lupin feeding before and after joining on plasma progesterone and fertility in Merino ewes. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 1992; 19: 185-187.

Parrott JA, Skinner MK. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 55-64.

Pelletier J, Schalling M, Buckler A, Rogers A, Haber D, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* 1991; 5: 1345-1356

Peluso JJ, Downey MC, Gruenberg ML. Role of LH pulse amplitude in controlling rat ovarian oestradiol-17 beta secretion in vitro. *J Reprod Fertil*, 1984; 71:107-112.

Peluso JJ, Delidow BC, Lynch J, White BA. Folliclestimulating hormone and insulin regulation of 17betaestradiol secretion and granulosa cell proliferation within immature rat ovaries maintained in perfusion culture. *Endocrinology* 1991; 128: 191-196.

Perks CM, Denning-Kendall PA, Gilmour RS, Wathes DC. Localization of messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and the type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 1995; 136: 5266-5273.

Perks CM, Peters AR, Wathes DC. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1999; 116: 157-165.

Pesce M, Farrace M, Piacentini M, Dolci S, De Felici M. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development* 1993; 118: 1089-1094.

Pesce M, Di Carlo A, De Felici M. The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture. *Mech Dev* 1997; 68: 37-44.

Picton HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 2001; 55: 1193-1210.

Pierson RA and Ginther, OJ. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 1984; 21: 495-504.

Pisani LF, Antonini S, Pocar P, Ferrari S, Brevini TA, Rhind SM, Gandolfi F. Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels of developmentally relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells. *Reproduction* 2008; 136: 303-312.

Pisarska MD, Bae J, Klein C, Hsueh AJ. Forkhead I2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology* 2004; 145: 3424-3433.

- Plendl J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat Histol Embryol* 2000; 29: 257–266.
- Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 1999; 20: 535–582.
- Poretsky L, Kalin MF. The gonadotropic function of insulin. *Endocr Rev* 1987; 8: 132–141.
- Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, van Heyningen V, Hastie N. The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990; 346: 194-197.
- Qu J, Godin PA, Nisolle M, Donnez J. Distribution and epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Human Reproduction* 2000; 15: 302–310.
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 2004; **305**: 1157–1159.
- Randel RD. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *J. Anim. Sci.* 1990; 68: 853 – 862.
- Rawlings NC, Jeffcoate IA, Rieger DL. The influence of estradiol-17 β and progesterone on peripheral serum concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the ovariectomized ewe. *Theriogenology* 1984; 22: 473-88.
- Rémond B, Souday E, Jouany JP. *In vitro* and *in vivo* fermentation of glycerol by rumen microbes. *Anim Feed Sci Technol* 1993; 41: 121-132.
- Resnick JL, Ortiz M, Keller J, Donovan P. Role of fibroblast growth factors and their receptors in mouse primordial germ cell growth. *Biol Reprod* 1998; 59: 1224-1229.
- Rhind SM, Leslie LD, Gunn RG, Doney JM. Plasma FSH, LH, prolactin and progesterone profiles of Cheviot ewes with different levels of intake before and after mating, and associated effects on reproductive performance. *Anim Reprod Sci* 1985; 8: 301-313.
- Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. Novel signalling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. *Recent Progress in Hormone Research* 2002; 57: 195–220.
- Rivera GM, Fortune JE. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *Biol Reprod* 2001; 65: 112-118.

Rivera GM, Chandrasekher YA, Evans AC, Giudice LC, Fortune JE. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. *Biol Reprod* 2001; 65: 102-111.

Rivera GM, Fortune JE. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. *Endocrinology* 2003; 144: 437-446.

Robinson JJ, Rooke JA, McEvoy TG. 2002. Nutrition for conception and pregnancy. In: *Sheep nutrition* Freer M., Dove H. (eds), CABI Publishing CSIRO Publishing, Canberra, pp 189-211.

Roche JF, Mackey D, Diskin MD. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci* 2000; 60 – 61: 703 – 712.

Rubianes E. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. *Actas de Fisiología* 2000; 6: 93-103.

Rukkwamsuk T, Rungruang S. Effect of propylene glycol on fatty liver development and hepatic fructose 1,6 bisphosphatase activity in periparturient dairy cows. *Liv Prod Sci* 2005; 95: 95-102.

Ryan KE, Casey SM, Canty MJ, Crowe MA, Martin F, Evans AC. Akt and Erk signal transduction pathways are early markers of differentiation in dominant and subordinate ovarian follicles in cattle. *Reproduction* 2007; 133: 617–626.

Ryan KE, Glister C, Lonergan P, Martin F, Knight PG, Evans AC. Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. *J Ovarian Res* 2008; 1: 2.

Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod* 2002; **66**: 1134–1150.

Scaramuzzi RJ, Radford HM. Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J Reprod Fertil* 1983; 69: 353-367.

Scaramuzzi, R.J. Reproduction research in perspective. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 1988; 17, 57-73.

Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 459-478.

Scaramuzzi RJ, Downing JA. The in vivo effects of fibroblast growth factor and epidermal growth factor on the secretion of oestradiol, androstenedione and progesterone by the autotransplanted ovary in the ewe. *J Endocrinol* 1995; 146: 301–311.

Scaramuzzi RJ, Murray JF, Downing JA, Campbell BK. The effects exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 1999; 17: 269–277.

Scaramuzzi R, Campbell B, Downing J, Kendall N, Muhammad K, Muñoz-Gutiérrez 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 Dev* 2006; 46: 339-354.

Scaramuzzi R, Campbell B, Souza C, Baird D. Glucose uptake and lactate production by the autotransplanted ovary of the ewe during the luteal and follicular phases of the oestrous cycle. *Theriogenology* 2010a; 73: 1061–1067.

Scaramuzzi R, Brown H, Dupont J. Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: A Perspective. *Reprod Dom Anim* 2010b; 45 (Suppl. 3): 32–41.

Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier A, Treier M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 2004; **131**: 933–942.

Schroeder A, Sudekum K. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: Wratten, N., Salisbury, P.A. (Eds.), *New Horizons for an Old Crop*. Proc. 10th Int. Rapeseed Congr., Canberra, Australia. 1999; Paper N°241.

Seekallu S, Toosi B, Rawlings N. LH pulse frequency and the emergence and growth of ovarian antral follicular waves in the ewe during the luteal phase of the estrous cycle. *Reproductive biology and endocrinology* 2009; 7: 78.

Seekallu S, Toosi B, Duggavati R, Barrett D, Davies K, Waldner C, Rawlings N. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. *Theriogenology* 2010; 73: 670-680.

Shimizu T, Jiang JY, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E. Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol Reprod* 2003; 69:1388–1393.

Simpson JL. Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes. *Ann NY Acad Sci*, 2008; 1135:146-154.

Sirois J, Fortune, J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 1988; 39: 308-317.

Sirotkin AV, Mlyncek M, Kotwica J, Makarevich AV, Florkovicová I, Hete'nyi L. Leptin directly controls secretory activity of human ovarian granulosa cells: possible inter-relationship with the IGF/IGFBP system. *Horm Res* 2005; 64: 198–202.

Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. Hum. Reprod. Update 2005; 11: 461–471.

Smith AJ, Stewart RD. 1990. Effects of nutrition on the ovulation rate of ewes. In: *Reproductive physiology of Merino sheep concepts and consequences*. Oldham C.M., Martin G.B., Purvis I.W. (eds), School of Agriculture (Animal Science). The University of Western Australia, pp 85-101.

Somchit A, Khalid M, Campbell BK, Scaramuzzi RJ. The effects of short-term nutritional supplementation with lupins (*Lupinus luteus*) on the number of ovarian follicles and the concentrations of follicular hormones and glucose in ewes during the luteal phase of the oestrous cycle. Theriogenology 2007; 68: 1037–1046.

Somchit A. 2008. The physiological regulation of folliculogenesis by the insulin-glucose system and by perturbation of the follicular negative feedback system. PhD Thesis, University of London, London, UK.

Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin a in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant. Journal of Endocrinology 1998; 156: 563-572.

Souza CJ, MacDougall C, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT. The booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 b (BMPRIb) gene. Journal of Endocrinology 2001; 169: R1-6.

Soyal S, Amleh A, Dean J. FIG α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. Development 2000; 127: 4645-4654.

Spicer LJ, Chamberlain CS, Francisco CC. Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I stimulated function of granulosa and thecal cells. Endocrine 2000; 12: 53–59.

Spicer LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. Domestic Animal Endocrinology 2001; 21: 251-270.

Spicer LJ. The effect of leptin on ovarian steroidogenesis. In: *Leptin and reproduction*. Henson M.C., Castracane V.D. (eds), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003; pp 97-104.

Staples CR, Burke JM, Thatcher WW. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. J Dairy Sci 1998; 81: 856–871.

Steiner, RA. Cameron JC. Mcneill TH. Clifton DK. and Bremmer WJ. 1983. Metabolic signals for the onset of puberty In: *Neuroendocrine Aspects of Reproduction* Edited by Norman RL 183 – 227. Academy Press New York USA.

- Stewart R, Oldham CM. Feeding lupins to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production* 1986; 16: 367-370.
- Tanaka T, Akaboshi N, Inoue Y, Kamomae H, Kaneda Y. Fasting-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy status in ovariectomized goats. *Anim Reprod Sci* 2002; 72: 185-196.
- Teleni E, Rowe JB, Croker KP, Murray PJ, King WR. Lupins and energy-yielding nutrients in ewes. II. Responses in ovulation rate in ewes to increased availability of glucose, acetate and amino acids. *Reprod Fertil Dev* 1989; 1: 117-125.
- Thomas FH, Campbell BK, Armstrong DG, Telfer EE. Effects of IGF-I bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro. *Reproduction* 2007; 133: 1121–1128.
- Toosi B, Seekallu S, Pierson R, Rawlings N. Evaluation of the ultrasound image attributes of developing ovarian follicles in the four follicular waves of the interovulatory interval in ewes. *Theriogenology* 2009; 72: 902-909.
- Tosca L, Chabrolle C, Dupont J. AMPK: a link between metabolism and reproduction? *Med Sci (Paris)* 2008; 24: 297–300.
- Trabue S, Scoggin K, Tjandrakusuma S, Rasmussen MA, Reilly PJ. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 7043 -7051.
- Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation. *Endocrinology* 2009; **150**: 1014–1024.
- Turnbull K, Braden A, Mattner P. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust J Biol Sci*, 1977; 30: 229-241.
- Vanderhyden B. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience* 2002; 7: 2006-2022.
- Viñoles C, Banchemo G, Rubianes E. Follicular wave pattern and progesterone concentrations in cycling ewes with high and low body condition score. *Theriogenology* 1999; 51: 437.
- Viñoles C, Forsberg M, Martin G, 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.
- Viñoles C, Paganoni B, Glover K, Milton J, Martin G. Alimentación focalizada para aumentar la eficiencia reproductiva en ovinos: modelo de una oleada folicular para estudiar su efecto en el desarrollo folicular y los perfiles hormonales. *Curso Reproducción de Rumiantes, Colegio de Posgraduados Texcoco, México*. 2007; Pp 152-172.

Walters DL, Schallenberger E. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *J Reprod Fertil* 1984; 71:503-512.

Walters KA, Binnie JP, Campbell BK, Armstrong DG, Telfer EE. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reproduction* 2006; 131:515-523.

Webb R, Armstrong DG. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Production Science* 1998; 53: 95-112.

Webb R, Braincourt M, Hanrahan J. Ovulation rate in ewe: mechanisms underlying genetic variation. En: *Proceedings of the 6th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production*, 1998; vol. 27, pp 3-10.

Webb R, Campbell B, Garverick H, Gong J, Gutiérrez CG, Armstrong D. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1999a; 54: 33-48.

Webb R, Gosden R, Telfer E, Moor R. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim Sci* 1999b; 68: 257-284.

Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl* 2003; 61:71-90.

Webb R and Campbell BK. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007a; **64**: 141–163.

Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK, Hunter MG. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology* 2007b; 68S: S22-S29.

Wheaton J, Carlson K, Kusina N. Active and passive immunoneutralization of inhibin increases follicle-stimulating hormone levels and ovulation rate in ewes. *Biol Reprod* 1992; 47: 361-367.

Wiedmeier R, Tanner B, Bair J, Shenton H, Arambel M, Walters J. Effects of a new molasses byproduct. Concentrated separator byproduct, on nutrient digestibility and ruminal fermentation in cattle. *Journal of Dairy Science* 1992; 70: 1936-1940.

Williams S, Blache D, Martin G, Foot R, Blackberry M and Scaramuzzi R. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction* 2001; 122: 947-956.

- Yang M, Fortune JE. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Mol Reprod Dev* 2007; 74:1095–1104.
- Yang M, Fortune JE. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod* 2008; 78: 1153–1161.
- Yen HW, Jakimiuk AJ, Munir I, Magoffin DA. Selective alterations in insulin receptor substrates-1, -2 and -4 in theca but not granulosa cells from polycystic ovaries. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 473–479.
- Ying Y, Qi X, Zhao G. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:7858-7862.
- Zachow RJ, Magoffin DA. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1997; 138: 847–850.
- Zachut M, Arieli A, Lehrer H, Argov N, Moallem U. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. *Reproduction* 2008; 135: 683–92.
- Zeleznik AJ, SchulerHM, Reichert LE, Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: Role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1981; 109: 356–362.
- Zeleznik AJ, Saxena D, Little-Ihrig L. Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 2003; 144: 3985–3994.
- Zimmermann RC, Xiao E, Bohlen P, Ferin M. Administration of antivascular endothelial growth factor receptor 2 antibody in the early follicular phase delays follicular selection and development in the rhesus monkey. *Endocrinology* 2002; 143: 2496–2502.
- Zhou J, Adesanya OO, Vatzias G, Hammond JM, Bondy CA. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology* 1996; 137: 4893–4901.
- Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, and Sun K, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 631–636.