



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**EFFECTO DE UN TRATAMIENTO PROLONGADO CON INSULINA
SOBRE LAS POBLACIONES FOLICULARES Y LA FUNCIÓN OVÁRICA EN
CABRAS**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA:
CRISTINA HUERTA LECONA**

TUTOR PRINCIPAL:

DR. HÉCTOR JIMÉNEZ SEVERIANO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. HÉCTOR R. VERA ÁVILA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM

DR. ALEJANDRO VILLA GODOY

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

Cuautitlán Izcalli, Edo. Méx. Enero 2015



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.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II.HIPÓTESIS.....	3
III. OBJETIVO.....	3
III.I OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 Desarrollo folicular	4
4.1.1 Desarrollo folicular embrionario	4
4.1.2 Desarrollo folicular temprano	5
4.1.3 Desarrollo folicular antral	7
4.1.4 Dinámica folicular	7
4.2 Insulina	9
4.2.1 Señalización intracelular de insulina	10
4.2.2 MAP cinasas	12
4.2.3 Factores de transcripción	13
4.3 Función de insulina en el folículo ovárico.....	14
4.3.1 Regulación de la esteroidogénesis por insulina.....	15
4.3.2 P450 aromatasa y Estradiol.....	16

4.3.3 Transportadores de glucosa.....	17
4.4 Atresia folicular.....	18
4.4.1 Regulación de la proliferación y supervivencia celular por insulina...	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
VI. RESULTADOS.....	28
VII. DISCUSIÓN.....	34
VIII. CONCLUSIONES.....	44
IX. REFERENCIAS.....	45

Dedicatoria

A mi familia Ramón Huerta Hernández, Ana María Lecona Ortega y Aideé Huerta Lecona quienes me han apoyado todos estos años incondicionalmente y en especial a mi esposo Luis Hernández Cervantes. Gracias por su cariño.

A mis amigos de posgrado y a mis amigos de toda la vida: Nayeli Alonso Palacios, Claudia Morales Pérez, Isabel Zarate Hernández, Ariadna Castillo Granados, Leonel Ibsan Reyes García, Lily López García, Erick González Larrañaga, Nallely Rivero Caudillo, Anahí Valle Flores, Citlali Roque Nando y Erika Dessire Parra Vargas, como un pequeño agradecimiento a su amistad.

Agradecimientos

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

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

Al CENID Fisiología, INIFAP por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar el experimento que sirvió como tesis de mi maestría

A los doctores Héctor Jiménez Severiano, Héctor Vera Ávila y Alejandro Villa Godoy por su asesoría para desarrollar mi tesis

A las M. en C. Denisse Montoya Flores y Leticia García Casanova por sus valiosos consejos para lograr mi trabajo de laboratorio

Resumen

El presente estudio se realizó para evaluar el efecto de la aplicación prolongada de insulina en el desarrollo folicular en cabras. Se utilizaron 33 cabras que fueron aleatoriamente asignadas a 3 tratamientos: Testigo (T) (n=12); Dosis Baja (DB), 0.30 UI insulina de larga acción/kg (n=10) y Dosis Alta (DA), 0.40 UI insulina de larga acción/kg (n=11) administrados durante 60 días. Posteriormente las cabras fueron ovariectomizadas. El ovario con el folículo mayor se diseccionó y sus folículos y CL se contaron y clasificaron. El otro ovario se utilizó para conteo de folículos primordiales por disector físico y conteo de folículos primarios hasta antrales pequeños. Los datos fueron transformados y analizados con PROC GLM de SAS y se usó correlación de Spearman para número de folículos. Hubo efecto de tratamiento sobre el diámetro de folículos pequeños ($P = 0.02$) donde la DB tuvo el mayor diámetro; también hubo efecto sobre el tamaño del CL ($P = 0.16$) con la DB. No hubo diferencia sobre el número de folículos, de CL, ni en la proporción que aporta cada tipo folicular. No se encontraron correlaciones entre el número de folículos preantrales y antrales. En conclusión, el presente tratamiento prolongado con insulina tuvo efectos mínimos sobre el tamaño de folículos antrales, no modificó la proporción de folículos y no se recomienda correlacionar el número de folículos preantrales con los folículos antrales en cabras.

Palabras clave: desarrollo folicular, insulina, expresión de genes, cabras

Abstract

The present study was developed to assess the long-term insulin administration in follicular development in goats. We used 33 goats randomly assigned into 3 treatments: control (T) (n=12); Low Dose (DB), 0.30 UI long acting insulin/kg (n=10) and High Dose (DA), 0.40 UI long acting insulin/kg (n=11) administered during 60 days. Then the goats were ovariectomized. The ovary with the largest follicle was dissected and its follicles and CL were classified. The other ovary was used for counting primordial follicles by physical dissector and direct counting for primary up to little antral. The data was transformed and analyzed using SAS proc glm and we used Spearman correlation for follicle numbers. There was effect on the diameter of small follicles ($P=0.2$) where the DB had the largest diameter. There was no difference on the follicle number, CL, and the proportion of each follicle type. We don't found any correlation between the pre-antral follicle numbers and antral follicles. In conclusion, the present prolonged treatment with insulin appears to have minimal effects on the size of antral follicles, doesn't modifies follicles proportions, and is not recommended to correlate the pre-antal follicle numbers with antral follicle numbers in goats.

Key words: follicle development, insulin, gene expression, goats

I. Introducción

Existen diversas publicaciones científicas que describen el papel de la insulina en funciones que van más allá del control homeostático de la glucosa, actuando a nivel ovárico para favorecer el desarrollo folicular (Poretsky et al., 1999; Muñoz- Guitiérrez et al., 2002; Shimizu et al., 2008; Padilla, 2009; Estrada, 2010; Scaramuzzi et al., 2010; Zabuli et al., 2010). Scaramuzzi et al. (2010) mencionan que la insulina es un sensor que forma un vínculo entre el estatus nutricional y la foliculogénesis; pero los efectos de insulina sobre la función ovárica en rumiantes han sido menos consistentes, ya que en estudios realizados en borregas administrando insulina durante tres días consecutivos no provocó una estimulación ovárica (Kirkwood *et al.*, 1991), tampoco afectó la tasa de gestación ni de nacimientos administrándola por 5 días (Whitley *et al.*, 2000), de acuerdo a los autores es probable que la duración de la hiperinsulinemia no haya sido suficiente. Por el contrario, Meza Herrera *et al.* (2004) encontraron correlación entre la concentración plasmática de insulina y el número de folículos totales en cabras; de forma similar Zabuli *et al.* (2010) asociaron la concentración plasmática de insulina con la tasa de ovulación en cabras. Adicionalmente, la combinación de un agente gluconeogénico y cromo tuvieron efectos favorables sobre la secreción de insulina en cabras, pero sin afectar en forma consistente la función ovárica, expresada en términos de desarrollo folicular y tasa ovulatoria (Vera *et al.* Datos sin publicar). De tal forma, el uso de la insulina exógena podría considerarse como alternativa para mejorar el desarrollo folicular, pero la información publicada en rumiantes no presenta patrones uniformes de comportamiento.

Respecto a la presente tesis, durante el 2008, se hizo un primer estudio presentado por Padilla (2009), para determinar el efecto de la exposición prolongada de insulina y en diferentes periodos de desarrollo folicular sobre las poblaciones foliculares y la tasa ovulatoria en cabras en ciclos estrales consecutivos. En base a sus resultados se concluyó que la insulina tiene la capacidad de regular el desarrollo folicular en cabras criollas, ya que hubo

mayor número total de folículos antrales, quedando dudas de cómo es que la insulina logra este efecto. Por lo cual, así como el trabajo de Padilla (2009), esto es una continuación de la línea de investigación de insulina con anterioridad planteada. La presente investigación se diseñó para estudiar los efectos de un tratamiento prolongado de insulina exógena sobre las poblaciones foliculares ováricas en cabras.

II. Hipótesis

El tratamiento prolongado con insulina exógena actúa a nivel folicular modificando la distribución de las poblaciones foliculares en cabras.

III. Objetivo

Determinar a nivel ovárico la distribución de las poblaciones foliculares bajo un tratamiento prolongado con insulina.

III.I Objetivos particulares

1. Determinar a nivel macroscópico la distribución de los folículos pequeños, medianos y el folículo mayor, durante un tratamiento prolongado de insulina.
2. Determinar a nivel microscópico la distribución de los folículos del tipo primordial, primario, preantral pequeño, preantral grande y antral pequeño, durante un tratamiento prolongado de insulina.

IV. Revisión de literatura

4.1 Desarrollo folicular

4.1.1 Desarrollo folicular embrionario

El desarrollo de las células germinales embrionarias involucra la migración de células germinales primordiales a las crestas genitales, en donde ya bien establecidas se conocen como ovogonias. La ovogonia hace contacto con la célula de la pregranulosa, formando un complejo de célula germinal y somática que da lugar a estructuras parecidas a tubos llamados cordones ovígeros y se observa su máximo desarrollo entre el día 38-75 de la gestación en fetos de ovejas (Sawyer *et al.*, , 2002). La ovogonia se divide y forma los quistes germinales, los cuales quedan encerrados en los cordones ovígeros. Los quistes germinales se producen por la división por mitosis del núcleo de células germinales sin completar la citocinesis para formar un sincitio multinucleado o quiste conectado por canales intercelulares (Tingen, 2009). Entre el día 55 y 90 de gestación, en el feto de oveja las células epiteliales y ovogonias proliferan. Al mismo tiempo dentro de los cordones ovígeros sucede el inicio de la meiosis (profase I) y la apoptosis de células germinales que desencadena la ruptura de los quistes (Sawyer *et al.*, 2002). Alrededor de 2 tercios de las células mueren en la ruptura de los quistes y lo hacen para transferir componentes celulares como mitocondrias, ribosomas y retículo endoplásmico a aquellas que sobreviven (Pepling y Spradling, 2001). Tras la ruptura de los quistes germinales el tercio de los ovocitos que sobreviven a la apoptosis son rodeados por una capa de células de la pregranulosa escamosas para formar al folículo primordial (Kezele *et al.*, 2005; Pepling y Spradling, 2001; Pepling, 2012). A partir del día 75 de gestación, en el feto de oveja ocurre la formación de los folículos primordiales que consisten en un ovocito rodeado por una capa de células de la granulosa y posteriormente la desaparición de los cordones ovígeros se presenta en el día 100 (Sawyer *et al.*, 2002).

4.1.2 Desarrollo folicular temprano

Morfológicamente en la transición de folículo primordial a primario, las células de la granulosa toman una apariencia cuboidal y proliferan. El ovocito adquiere mayor talla y las células de la teca se encuentran detenidas en el estroma (Kezele *et al.*, 2005).

El inicio del desarrollo folicular está regulado por factores producidos localmente. Entre estos se encuentran factores de crecimiento de la familia TGF β , factor de crecimiento de diferenciación (GDF9) y algunas proteínas morfogénicas del hueso (BMP) que son producidos por el ovocito (Tingen, 2009). El sistema c-kit tirosin cinasa es importante para el crecimiento de folículos primordiales que consiste en la activación del receptor tirosina cinasa, c-kit y su ligando SCF (stem cell factor) que se localizan en ovocitos y células de la granulosa respectivamente. (Mc Natty *et al.*, 1999).

En cabras en la transición de folículo primordial a primario, se expresa en las células de la granulosa el ligando de kit (KL) y en el ovocito se expresan activina-A, folistatina, GDF-9 y BMP-15, aunque esta última también se expresa en células de la granulosa pero en menor cantidad (Silva *et al.*, 2006); en ratonas destaca la expresión de VEGF y IGF-I (Kezele *et al.*, 2005); en ovejas, algunas proteínas morfogénicas del hueso (BMP) como BMP-1 y BMP-4 que se sintetizan en células de la granulosa participan en esta etapa (Canty-Laird *et al.*, 2010). El BMP-4 en la rata se deriva de células que rodean el estroma-intersticio y actúan de forma parácrina en el ovocito y células de la granulosa de folículos primordiales para promover la sobrevivencia celular en folículos en desarrollo, los cuales tendrán un mayor tamaño folicular e histológicamente estarán más organizados (Nilsson *et al.*, 2003).

Cuando el desarrollo folicular avanza, los folículos superiores pueden participar en el desarrollo de los subordinados. El BMP-7 se expresan en células de la teca de los folículos más desarrollados y sus receptores están en las células de la granulosa donde estimulan el crecimiento de folículos primordiales adyacentes (Lee *et al.*, 2001).

Otro evento importante a considerar es la esteroidogénesis. En las células de la granulosa de folículos primordiales se empieza a producir el factor esteroidogénico 1 (SF-1) y la enzima 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3 β -HSD) y en el ovocito se estimula la expresión de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) (Logan *et al.*, 2002). En esta etapa participan diversos factores de crecimiento como factor de crecimiento parecido a la Insulina del tipo I (IGF-I), el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor transformante de crecimiento α (TGF α), la inhibina y la activina (Tingen, 2009). En la granulosa de los folículos pequeños la BMP4 y la activina A son potentes reguladores de la expresión de BMP1: BMP1 es inhibida por BMP4 y estimulada por activina A (Canty-Laird *et al.*, 2010; Fiona *et al.*, 2003). La expresión de los factores de crecimiento cambia mientras avanza el desarrollo folicular como es VEGF, IGF II (Kezele *et al.*, 2005). Las células de la teca modulan su proliferación y diferenciación de forma autócrina utilizando IGF-II (Duleba *et al.*, 1997). Las BMP's tienen un rol en la regulación de la liberación de gonadotropinas especialmente FSH. Cuando las BMP's disminuyen, la concentración de FSH se eleva. Esto estimula la maduración de varios folículos pequeños y es la causa de las ovulaciones múltiples. La mayor expresión de BMPR1B en la cabra negra Yunling se correlaciona con el bajo número de folículos maduros y tamaño de la camada (Cui *et al.* 2009).

4.1.3 Desarrollo folicular antral

Después que declina la FSH, la LH es importante para la sobrevivencia del folículo dominante (Medan *et al.*, 2003). La selección del folículo dominante se asocia con la expresión del ARNm de LH-R que en la oveja se expresa en células de la teca a partir de folículos preantrales grandes y aumenta en folículos antrales; mientras que en células de la granulosa, en folículos antrales mayores a 3mm de diámetro (Logan *et al.*, 2002).

Los folículos dominantes tienen altos niveles de ARNm de receptores de gonadotropinas y enzimas esteroidogénicas (Fortune *et al.*, 2001; Fortune *et al.*, 2004). El E2 se asocia con el incremento en el ARNm de 17 α -OH para incrementar la secreción de andrógenos. Adicionalmente, se observa que mientras avanza el crecimiento folicular incrementa la expresión de StAR (Tingen *et al.*, 2009; Britt *et al.*, 2004).

4.1.4 Dinámica folicular

Conforme avanza el desarrollo, los folículos se vuelven altamente sensibles a las gonadotropinas LH y FSH y requieren de ellas para continuar con su crecimiento. Los pulsos de GnRH liberan las gonadotropinas de la adenohipófisis, e inicialmente la FSH estimula el crecimiento de una cohorte de folículos pequeños (Bondurant, 1999). En vacas, la cohorte está compuesta por 8-41 folículos reclutados con diámetro de 2-4mm (Ginther *et al.*, 1996); en cabras se han detectado 30.3 \pm 0.4 folículos pequeños de 1-3 mm (Yu *et al.*, 2005).

Estos folículos se vuelven parte de un patrón conocido como ciclo estral, el cual dura 21.3 \pm 0.4 días y posee 3 ó 4 oleadas foliculares en cabras. Durante el surgimiento de cada oleada, la concentración plasmática de la FSH es alta lo que promueve el desarrollo folicular, el ARNm de P450 arom incrementa y la síntesis de E2 es más acentuada. La P4 durante esta fase suprime los pulsos de LH y así evita que los folículos inmaduros ovulen sin completar su desarrollo (Adams *et al.*, 1992 y Medan *et al.*, 2003). Bajo este patrón se produce la selección de 2-8 folículos de entre 4 y 6 mm de diámetro (Ginther y Kot, 1994) donde se observa que los folículos dominantes tienen una concentración mayor de E2 en el líquido folicular y sus células de la granulosa producen más E2 que las células de los folículos subordinados (Fortune *et al.*, 2001). Cuando el

folículo alcanza 5mm de diámetro ocurre retroalimentación negativa por parte de E2 y la concentración plasmática de la FSH disminuye (Medan *et al.*, 2003). Acto seguido se presenta un pequeño incremento en inhibina que tiene alta potencia para suprimir la liberación de la FSH de la adenohipófisis (Bleach *et al.*, 2001; Bulnes *et al.*, 2004), como resultado los folículos subordinados caen en atresia al final de cada oleada junto con la concentración de estradiol, pero se repone progresivamente con la nueva oleada (Yu *et al.*, 2005).

El folículo dominante de la última oleada responde al descenso de P4 circulante por la luteólisis, y el incremento de pulsos de LH, que conlleva a la secreción masiva de E2 para provocar el pico preovulatorio de LH/FSH y lograr la ovulación (Fortune *et al.*, 2001). Mientras más se prolongue la duración de las oleadas se producirá un folículo más diferenciado para ser ovulado. En la oleada 1 y 4 el folículo dominante se caracteriza por poseer un mayor diámetro y se asocia a mayor duración de dichas oleadas, pero solo en la última oleada el descenso de P4 permite que los folículos ovulen (Ginther y Kot, 1994; Medan *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2005).

La dominancia en cabras se considera débil por diversas razones, Ginther y Kot (1994) demostraron que cuando la ovulación ocurre, el folículo mayor algunas veces no es el ovulatorio, y con frecuencia se observan 2 folículos dominantes lo que explica las ovulaciones dobles y por otro lado una nueva oleada emerge mientras que el previo folículo mayor aún no alcanza su máximo diámetro.

La oleada preovulatoria resulta en la luteinización de células de la granulosa y de la teca y después de la ovulación el folículo ovulado forma el CL que secreta P4 como el principal producto esteroideogénico, mientras que los folículos que no ovulan se vuelven atrésicos por apoptosis de las células de la granulosa (Bondurant, 1999). El CL alcanza un diámetro máximo de 12.1 ± 0.3 mm al día 8 postovulación. Durante la fase lútea temprana, el diámetro medio del CL

incrementa en paralelo con la concentración plasmática de P4, mientras en la fase luteal tardía la concentración de P4 disminuye más rápido que la regresión del CL (Medan *et al.*, 2003).

4.2 Insulina

La insulina es un polipéptido con un peso molecular de 5900 D secretada por las células beta del páncreas. El gen humano de la insulina está localizado en el cromosoma 11 el cual codifica para preproinsulina, que es un polipéptido de cadena simple de 110 aminoácidos. La preproinsulina es proteolíticamente convertida en proinsulina la cual está formada por la cadena A, la cadena B y el péptido C. La proinsulina es parecida a IGF-I y II y puede unirse al receptor de insulina con aproximadamente 10% de afinidad en comparación a la insulina. La insulina es producida después de que se separa el péptido C de la proinsulina por endopeptidasas activas en el aparato de Golgi y en gránulos secretorios (Poretsky *et al.*, 1999).

Spicer y Echemkamp (1995), encontraron que en el ovario existen receptores específicos a insulina así como expresión de su ARNm en las células de la granulosa, teca, lútea y del estroma y que su expresión se modifica conforme el desarrollo del folículo avanza. En cabras se ha detectado, mediante inmunohistoquímica, señal positiva a receptores de insulina en las células de la granulosa de folículos primarios y en las de la teca de folículos antrales pequeños (Jiménez-Severiano *et al.*, 2008), y que en cerdas estos receptores se han detectado desde la etapa de folículos antrales pequeños (Quesnel, 1999).

4.2.1 Señalización intracelular de insulina

La insulina inicia sus efectos biológicos tras unirse a su receptor en la superficie celular lo que activa la tirosina cinasa endógena del receptor (Kaburagi *et al.*, 2004). El gen para el receptor de insulina se localiza en un brazo del cromosoma 19, que contiene 22 exones y codifica el proreceptor, que es un polipéptido de cadena simple que contiene una subunidad α y otra β (Poretsky *et al.*, 1999). El receptor maduro es un heterotetrámero que consiste en 2 subunidades α (135 kDa) y 2 β (95kDa) como resultado de la dimerización de una secuencia de pasos transduccionales (Poretsky *et al.*, 1999; De Meyts, 2004). Poretsky *et al.* (1999) y Larsen *et al.* (2003) mencionan que la subunidad α del receptor de insulina es una estructura extracelular que posee dominios ricos en cisteína que sirven como sitios de unión a insulina. La subunidad β del receptor de insulina tiene dominios extracelulares, transmembranales e intracelulares y este último posee sitio de unión a ATP y varios sitios autofosforilables de tirosina. La subunidad β se fosforila en residuos de tirosina y adquiere actividad cinasa, iniciando una cascada de fosforilación intracelular. El dominio cinasa está flanqueado por la región yuxtamembranal que está involucrada en el andamiaje de sustratos IRS y Shc (De Meyts, 2004). White y Kahn (1994), mencionan que la región intracelular yuxtamembranal de la subunidad β es esencial para la transmisión de la señal.

La unión de insulina permite la dimerización del receptor que se autofosforila en sus tirosinas del área citoplasmática (Maillet, 2002). Yenus (1997) menciona que esas tirosinas son: Tyr 1158, Tyr 1162, Tyr 1163. Como resultado de la fosforilación, el sitio activo adquiere la habilidad para la transferencia de fosfatos desde ATP a residuos de tirosina en proteínas sustrato (De Meyts, 2004). Henry y Norman (2003) reportan que las proteínas a fosforilar provienen de la familia de sustratos de proteína del receptor de insulina (IRSs): IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4; las restantes son: Shc, Cbl, Gab-1, p60dok y APS. Los IRSs sirven como agentes de vinculación para otras moléculas señaladoras (PI-3 cinasa, SHP2, Grb2, Nck y Crk) capaces de traducir una señal a las

diversas vías que dirige insulina (Henry y Norman, 2003). Los múltiples residuos de tirosina de IRS se reconocen y se unen al dominio SH2 en varias proteínas de transducción. La enzima fosfatidilinositol-3-cinasa (PI-3 cinasa) es una proteína poseedora del dominio SH2 asociada con IRS-1 (White y Kahn, 1994).

La insulina activa el transporte de glucosa a partir de PI-3 cinasa (Poretsky *et al.*, 1999). PI-3 cinasa está compuesta de 2 subunidades: una subunidad catalítica de 110 kDa y otra subunidad reguladora con 85 kDa (p85 α) que posee 2 dominios SH2 (White y Kahn, 1994 y Henry y Norman, 2003). Dentro de las funciones de PI-3 cinasa, Thong *et al.* (2005) mencionan el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática donde la enzima es fosforilada en treonina. PI-3 cinasa es esencial para la translocación de GLUT4, y los efectores Akt y PKC quienes controlan el tráfico de GLUT4 en la membrana plasmática.

La activación de la PI-3 cinasa dispara la activación de la cascada de cinasas, empezando con la cinasa 1 y 2 dependiente de fosfoinositol y la activación de múltiples cinasas de proteína incluyendo protein cinasa B y de isoformas atípicas de protein cinasa C (PKC), todos ellos relacionados con la translocación de los transportadores de glucosa (Larsen *et al.*, 2003).

Existen varios modelos de secuestro/movilización de GLUT. Uno de ellos, citado por Henry y Norman (2003) manifiesta que las vesículas que contienen GLUT son movilizadas en respuesta a la estimulación del receptor membranal por insulina. La fusión de las vesículas a la membrana plasmática está mediado por las interacciones con las proteínas SNARE y algunas de estas se encuentran en vesículas junto a GLUT4 (Nystrom y Quon, 1999). La movilización de transportadores de glucosa es reversible por la reducción del estímulo de insulina, cuando los transportadores son secuestrados nuevamente a las vesículas intracelulares (Henry y Norman, 2003). En reposo, el 3-10% de GLUT4 está localizado en la superficie celular y el 90% restante en

compartimentos intracelulares; después de 10 minutos post-aplicación de insulina, los niveles de GLUT4 en la superficie celular ascienden 2-3 veces (Thong *et al.*, 2005). Ola *et al.* (2006) aplicando 200 nM de insulina demostraron que se inhibe la internalización de GLUT4 un 70%, mientras que aplicando 0.5 nM de insulina disminuye 50%.

4.2.2 MAP cinasas

Las proteínas que poseen el dominio SH2, como la proteína adaptadora Grb-2 y Shc sirven para ligar IRS-1/IRS2 a la vía MAP cinasa. White y Kahn (1994) consideran a la unión de IRS-1 con Grb-2 como alternativa utilizada por insulina para regular Ras. La proteína Grb2 es una proteína adaptadora que se asocia a través de su dominio SH2 a una tirosina fosforilada del receptor activado; mientras que por su dominio SH3, interacciona con Sos (White y Kahn, 1994 y Maillet, 2002). Sos es parte de la cascada que incluye a Ras, Raf y MEK que permite la activación de MAPK. Sos es un factor de intercambio de la pequeña proteína G Ras. Por lo que Sos se trasloca a las proximidades de su diana y la activa (Ras se encuentra permanentemente anclada a la membrana) (Maillet, 2002).

Yenush (1997) define a Grb-2 como el activador de la vía p21 ras/Erk uniéndose al factor Sos y facilitando la conversión de GTP a GDP para la activación de Ras. Esto, en turno, dispara la activación de la cascada de cinasa incluyendo Raf, proteína activadora de mitógeno (MAP) y proteína activadora de mitógeno/ cinasa reguladora de la señal extracelular (MEK). Esta secuencia de Ras contribuye para que tirosin cinasa promueva el crecimiento celular y regule la expresión de varios genes. Ras es activada dirigiendo la activación de Raf, la cinasa de MAP cinasa (MEK) y ERK. La activación de ERK permite su translocación en el núcleo de la célula, donde cataliza la fosforilación de factores de transcripción que promueven el crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Henry y Norman, 2003).

4.2.3 Factores de transcripción

La vía de señalización que determina las acciones de las hormonas peptídicas es la fosforilación de proteínas que parece estar implicada en la regulación de la expresión de genes. Clásicamente consta de fosforilaciones y desfosforilaciones secuenciales de moléculas proteincinasa. Estas cascadas son iniciadas por hormonas que activan a su receptor con actividad cinasa, que fosforila a una serie de proteínas diana clave y finalmente la fosforilación de factores de transcripción (Kronenberg, 2009).

Algunos factores de transcripción reconocidos por la vía Ras son elk1 y c-fos (Henry y Norman, 2003). El gen c-fos se combina con c-jun para formar al heterodímero c-fos/c-jun (factor de transcripción ap-1) que se une al TRE (TPA elemento de respuesta) en promotores de ciertos genes.

Kronenberg (2009) indica que la esteroidogénesis dependiente de LH y FSH en las células de la teca y de la granulosa está mediada por moléculas comunes de señal entre las que se encuentra al factor esteroidogénico de transcripción del tipo 1 (SF-1) y el receptor hepático homólogo (LRH-1) que pertenecen a la familia de receptores nucleares. El SF-1 y LRH-1 regulan la expresión de los genes que codifican StAR, p450scc, 3 β -HSD-II, p450c y p450arom. Por tanto, SF-1 y posiblemente LRH-1 pueden considerarse los dirigentes de la esteroidogénesis ovárica, mediada por LH, FSH y también por **insulina**.

Adashi (2004) menciona que la región proximal promotora de StAR responde a diversos factores de transcripción como SF-1, Spl, C/EBP, GATA4, SREBP y c-Fos. Los péptidos insulinomiméticos y LH confieren máxima respuesta al gen StAR vía factores de transcripción: SREBP, SP1 y SF-1 quienes son activados

por señales intermediarias (PI3-cinasa y MAPK). Insulina induce la asociación de IRS-1/Grb2 y continúa con la cascada de fosforilación de proteínas hasta culminar con la activación de los mismos factores de transcripción para la esteroidogénesis (Carvalho *et al.*, 2003).

4.3 Función de Insulina en el folículo ovárico

Las acciones de IGF-I, IGF-II e insulina son muy similares debido a que su secuencia de aminoácidos y estructura son parecidas. Sin embargo, IGF-II tiene menor potencia que IGF-I por su señalización tirosina cinasa a través del receptor IGF-I. IGF-I ni IGF-II tienen efectos similares a insulina a menos que se presenten a grandes concentraciones. Igualmente, la insulina no tiene efectos similares a los de IGF a menos que se presente en alta concentración (Markstrom *et al.*, 2002). Las acciones de insulina e IGF son mediadas por 3 tipos de receptores: receptores de insulina, receptores de IGF-I y receptores de IGF-II. Los receptores de insulina tienen gran afinidad por insulina, también se unen a IGF-I con 500 veces menor afinidad, pero no se unen a IGF-II. El receptor IGF-I posee la mayor afinidad por IGF-I y se une con menor afinidad a IGF-II e insulina. El receptor IGF-II no está relacionado estructuralmente con los receptores de insulina ó con los receptores IGF-I y prioritariamente se une a IGF-II, aunque con baja afinidad se puede unir con IGF-I, pero no con insulina. La disponibilidad de IGFs está modulada por las Proteínas Ligadoras de Factor de Crecimiento Parecido a la Insulina IGFbps (Duleba *et al.*, 1997).

Tanto la insulina como los IGFs actuando por separado pueden estimular el crecimiento, diferenciación y sobrevivencia de células ováricas (Fouladi *et al.*, 2006; Castañeda, 2008; Chaves *et al.*, 2011). Sin embargo, la acción más importante de IGF-I y de la insulina se observa cuando actúan de forma sinérgica con gonadotropinas. Este efecto se debe a que incrementan el

número de receptores para gonadotropinas. Por su parte la insulina actúa a través de su propio receptor para modular la respuesta de las células de la granulosa hacia las gonadotropinas (Willis *et al.*, 1996). Las gonadotropinas incrementan la expresión del receptor de IGF-I y es posible que incrementen la síntesis de IGF-I en la granulosa (Geisert y Doberska, 2001). Ya que en las células de la granulosa se observan los mayores depósitos de IGF-I en comparación con las células de la teca, parece ser que las células de la granulosa regulan la proliferación y diferenciación de las células de la teca que las rodean (Duleba *et al.*, 1997).

Esta acción la pueden lograr incrementando la tasa de fosforilación ya que estimulan la actividad tirosina cinasa del receptor, como menciona Chakravorty *et al.* (1993) para proceder a fosforilar a las proteínas blanco y/o pueden fosforilar proteínas que comparten con la cascada de fosforilación de la LH y la FSH.

4.3.1 Regulación de la esteroidogénesis por Insulina

Algunos efectos de la insulina participan en la regulación directa de la esteroidogénesis ovárica. La insulina actúa a través de su propio receptor para modular la respuesta de las células de la granulosa hacia las gonadotropinas (Willis *et al.*, 1996). Carvalho *et al.* (2003) reportan que la insulina amplifica la esteroidogénesis estimulada por gonadotropinas, aumentando la expresión de los genes para StAR, CYP11A y CYP17.

Las enzimas efectoras de la esteroidogénesis, sintetizadas a partir de la unión de insulina con su receptor tirosina cinasa y de su subsecuente cascada de fosforilación intracelular, son la proteína reguladora de esteroidogénesis aguda

(StAR), la citocromo P450 scc (CYP11A), citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa (CYP-17) y la 3 β - hidroxiesteroide dehidrogenasa/ Δ 5- Δ 4- isomerasa (3 β -HSD) (Carvalho *et al.*, 2003).

Duleba *et al.* (1997) utilizando insulina, IGF-I e IGF-II en cultivos de células de la teca y del intersticio confirmaron su respuesta como activadores de la esteroidogénesis a través de la respuesta positiva para la enzima 3 β -HSD.

Las IGFs y la insulina primero inducen la proliferación de células no diferenciadas. Subsecuentemente, las IGFs y la insulina estimulan la diferenciación celular y la capacidad esteroidogénica de las células dando como resultado mayor número de células (Fouladi *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2011).

4.3.2 P450 aromatasa y Estradiol

La P450arom es una enzima que cataliza la formación de estrógenos a partir de sus precursores androgénicos. La P450arom se localiza en las células de la granulosa donde está bajo control de la FSH. La IGF-1 también induce la actividad de la enzima en el folículo inmaduro de rata. La actividad de P450arom y la síntesis de E2 en células de la granulosa en bovinos son estimulados por la FSH y/o IGF-I y la insulina (Adashi, 2004). La expresión de P450arom se presenta en folículos mayores a 3mm de diámetro en oveja (Logan *et al.*, 2002).

En bovinos la insulina tiene efectos benéficos sobre los folículos preovulatorios al incrementar la concentración de estradiol en células de la granulosa debido a que induce una mayor actividad aromatasa (Butler *et al.*, 2004). La insulina también estimula la producción de estradiol en células de la granulosa de folículos antrales pequeños y medianos de yeguas (Davidson *et al.*, 2002) y en folículos grandes de cerdas (Matamoros, *et al.*, 1991). A nivel sanguíneo, la concentración de E2 también incrementa utilizando insulina exógena (Selvaraju *et al.*, 2003).

Por el contrario, la administración de insulina a dosis elevadas provoca que la concentración plasmática de cortisol se eleve, mientras que la de estradiol disminuye por 8-12 hrs, lo que provoca el retraso de la oleada preovulatoria de LH por 15 hrs (Scherzer *et al.*, 2009).

4.3.3 Transportadores de glucosa

El transporte de glucosa es mediado por una familia de proteínas transportadoras de glucosa conocidas como GLUT. El transporte de glucosa es proporcional a la cantidad de transportadores de glucosa localizados en la membrana (Nystrom y Quon, 1999 y Poretsky *et al.*, 1999). Estas moléculas son glicoproteínas con una masa molecular de 50,000 Da que se extienden a lo largo de la membrana (Henry y Norman, 2003).

Nystrom y Quon (1999), mencionan que la insulina es quien incrementa el transporte de glucosa a través de la redistribución de GLUT4 del pool intracelular hacia la superficie celular donde actúa facilitando la entrada de glucosa a la célula. Nishimoto *et al.* (2006) encontraron la expresión de los genes para GLUT 1, 3 y 4 en folículos y cuerpo lúteo de vacas. La concentración del mRNA de GLUT1 y 3 en folículos y cuerpo lúteo resultó ser

similar a lo encontrado en cerebro y corazón, es decir en órganos clásicos de actividad GLUT 1 y 3; mientras que el mRNA de GLUT4 resultó en menor concentración. De acuerdo al mencionado patrón de concentración, los autores concluyeron que GLUT 1 y 3 son los mayores transportadores de glucosa y GLUT4 funciona como soporte para continuar con el transporte de glucosa (Nishimoto *et al.*, 2006).

Normalmente entre el 3-10% de GLUT4 está localizado en la superficie celular y el 90% restante está en compartimentos intracelulares, pero después de 10 minutos post-aplicación de insulina, los niveles de GLUT4 en la superficie incrementan 2-3 veces (Thong *et al.*, 2005).

4.4 Atresia folicular

El balance entre la proliferación celular y la muerte celular permite el apropiado desarrollo folicular y el tamaño normal de los compartimentos foliculares (Flores *et al.*, 2005, Markstrom *et al.*, 2002; Spacsinzky *et al.*, 2005). La apoptosis es el mecanismo que permiten eliminar células que ya no se necesitan, células envejecidas que tienen reducida su actividad biológica (Reyes y Sánchez, 2006).

Rosales y Guzmán (2008), Rubio *et al.* (2004) y Alonso *et al.* (2003) consideran a la apoptosis como la vía principal de la atresia folicular, aunque existen otras como la necrosis.

La apoptosis y la necrosis están presentes en la atresia de los folículos en cualquier estadio, pero conforme avanza el desarrollo folicular la atresia es

más evidente. Silva *et al.* (2002) determinaron que en cabras el porcentaje de atresia es del 8.5 en folículos primordiales, 14.3 en folículos primarios y 16.8 en folículos secundarios. En vacas es posible observar dicho patrón reflejado en la apoptosis donde la señal proapoptótica de Bax y antiapoptótica de Bcl-2 es variable en folículos primordiales y primarios, lo que indica la atresia de algunos de ellos; en cambio en folículos terciarios atrésicos la señal de Bcl-2 es mayor mientras se disminuye la señal Bax (Yang y Rajamahendran, 2000). Dhaeseleer *et al.* (2006) también confirman que los folículos terciarios atrésicos son más sensibles a la degeneración al igual que el cuerpo hemorrágico, CL y cuerpo albicans comparándolos con los folículos primordiales y primarios respecto a su actividad proapoptótica de la caspasa-3. Al comparar la actividad apoptótica y necrótica, Alonso *et al.* (2003) indican que en folículos atrésicos mayores a 6mm domina la necrosis. Esto se debe a la degeneración vascular de la teca interna y externa del folículo atrésico lo que provoca una deficiente difusión de oxígeno y la muerte por hipoxia (Jiang *et al.*, 2003). También las células apoptóticas que no fueron removidas por fagocitosis, durante el desarrollo folicular, lo serán por necrosis (Muhamad *et al.*, 2002).

4.4.1 Regulación de la proliferación y sobrevivencia celular por Insulina

Neganova *et al.* (2007) en ratonas con anulación del gen que codifica al Sustrato para el receptor de insulina (Irs2) reportaron una reducción en el número de folículos de todos los tamaños. En estos animales, el 75% de los folículos antrales grandes son atrésicos y los folículos sobrevivientes presentan un tamaño reducido lo que sugiere la participación de insulina en la proliferación y sobrevivencia folicular.

Se ha observado que durante el cultivo de folículos bovinos, la insulina disminuye el proceso de atresia en folículos antrales medianos (Fouladi *et al.*, 2006). En un medio de cultivo la aplicación de insulina a la h0 y h48 en tejido

ovárico de hámster incrementó el número de células viables y limitó la muerte celular por la disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS) comparado con el cultivo que presentaba solo una aplicación de la hormona (Yun *et al.*, 2003).

En medios de cultivo suplementados con insulina en células de la teca la fragmentación de ADN disminuyó $39\pm 8\%$ en comparación con el cultivo sin insulina (Spaczynski *et al.*, 2005). En células de la teca se incrementó la síntesis de ADN situación que se refleja al presentarse un mayor número de células activas esteroideogénicamente (Duleba *et al.*, 1997). La insulina incrementa la concentración de IGF-I y ésta última es capaz de favorecer la síntesis de ADN en las células de la teca-intersticio (Duleba *et al.*, 1999).

La aplicación exógena de insulina en infusiones continuas en vacas resultó en un aumento de 2.6 veces en la concentración de insulina plasmática (0.73 ± 0.026 ng/ml) y al mismo tiempo provocó un aumento de 116% de las concentraciones de IGF-I libre (Butler *et al.*, 2004). También en el líquido folicular las concentraciones de IGF-I tienden a elevarse tras administrar insulina y pueden estar ausentes los cambios en la concentración sanguínea de IGF-I, esto parece indicar que la insulina estimula la producción de IGF-I directamente en las células de la granulosa (Matamoros *et al.*, 1991, Diskin *et al.*, 2003). La insulina inicialmente influye en la acción local de IGF-I a partir del aumento en la cantidad de receptores para IGF-I en el ovario (Chagas *et al.*, 2007), donde el ARNm del receptor tipo 1 de IGF se ha detectado en las células de la granulosa y teca de folículos preantrales y antrales en vacas (Armstrong *et al.*, 2000). Mientras el nivel de IGF-I en el fluido folicular aumenta, el de IGFBP's disminuye; específicamente IGF-I inhibe la producción de BMP-I (Canty-Laird *et al.*, 2010) y por su parte insulina disminuye los niveles circulantes de IGFBP-2 e IGFBP-5 (Davidson *et al.*, 2002). En folículos bovinos medianos y grandes IGFBP-4 y IGFBP-2 disminuyen por acción de insulina al mismo tiempo que la atresia, por lo que la presencia de la hormona tiene un efecto favorable en este grupo de folículos (Fouladi *et al.*, 2006).

Matamoros *et al.* (1991) aplicando un tratamiento con insulina exógena a cerdas, diseccionaron los folículos visibles y demostraron que el tratamiento reduce el número de folículos atrésicos, sugiriendo que esto sucede porque hay un mayor reclutamiento de folículos. También puede ocurrir que la insulina disminuye el número de folículos degenerados permitiendo elevar el número de folículos destinados a la ovulación, situación que tras la gestación se ve reflejado en mayor número de lechones por camada (Ramírez *et al.*, 1994).

Cabe destacar que la insulina inhibe la producción de IGF-II en células de la granulosa de folículos medianos y grandes en la yegua, sugiriendo que las células de la granulosa no son responsivas a este factor (Davidson *et al.*, 2002). Esta información coincide con lo expuesto por Armstrong *et al.* (2000), quienes sólo encontraron expresión del ARNm que codifica IGF-II en células de la teca durante el desarrollo del antro folicular.

V. Materiales y Métodos

Ubicación

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

Animales

Se utilizaron 32 cabras (27 multíparas y 5 nulíparas) criollas encastadas de Nubia, no lactantes, no gestantes, dentro de estación reproductiva (noviembre-enero). Los animales experimentales tuvieron un rango de peso vivo de 34 a 64 kg con promedio de 46.7 ± 7.5 kg y un rango de condición corporal de 2 a 3.75 con promedio de 3.02 ± 0.3 (escala de 1 a 4; Honhold *et al.*, 1989) y edad aproximada de 2 a 4 años. Las cabras permanecieron en estabulación alimentadas 2 veces al día (8:00 am y 3:00 pm) con suministro de agua permanente. La ración se basó en 10.5% de PC y 2.1% de EM.

La preparación previa de las cabras al tratamiento incluyó la sincronización de estros, la cual constó de 2 aplicaciones de un análogo sintético de prostaglandina F2-alfa (PGF2 α ; 0.150 mg cloprostenol; Prosolvin C[®], Intervet, México) con intervalo de 11 días. El celo posterior a la segunda aplicación se consideró como el primer celo del periodo experimental. A partir de este celo se indujeron 6 ciclos estrales cortos consecutivos (duración aproximada 11 días) mediante aplicación de PGF2 α . Durante todo el periodo experimental se

mantuvieron, junto a las hembras, 3 machos epididiectomizados con arnés marcador para auxiliar la detección de celos. La observación de celos fue 2 veces al día, una hora en la mañana y otra en la tarde.

Tratamientos

Los 32 animales se dividieron en 3 grupos en forma aleatoria, un grupo testigo (T n= 12) el cual no recibió tratamiento y dos grupos tratados, uno con dosis baja (0.30 UI/kg, DB n=9) y el otro con dosis alta (0.40 UI/kg, DA n=11) de insulina de acción prolongada (Insulina glargina, Lantus ®, Aventis Pharma, México). La aplicación de insulina se hizo por vía subcutánea cada 48 horas, 20 minutos antes del alimento de la mañana y durante 60 días. Las dosis que se aplicaron se establecieron en base a resultados de pruebas piloto previas que tuvieron el objetivo de determinar las dosis e intervalos de tiempo más adecuadas de aplicación de insulina para evitar la presentación de hipoglicemia severa.

Recolección de ovarios

Se extrajeron ambos ovarios de todas las cabras mediante cirugía (ovarioectomía). Después de la recolección de los ovarios, estos fueron lavados con solución salina fisiológica, se colocaron en un recipiente con ésta solución y fueron mantenidos en hielo para su transporte, al laboratorio. Ahí, se separaron los ovarios por cabra, donde aquel que presentaba el folículo mayor se destinó a disección folicular y su posterior reserva; mientras que el otro ovario fue fijado en paraformaldehído y embebido en parafina.

Los ovarios de cabras fueron obtenidos de pruebas experimentales anteriores llevadas a cabo entre noviembre de 2007 a enero del 2008, como parte de la Tesis: Efecto de la administración prolongada de insulina sobre el desarrollo folicular y la tasa ovulatoria en cabras (Padilla *et al.*, 2009). Por lo cual, las características de los animales y la asignación de tratamientos a los animales de la presente tesis son los mismos que en la tesis antes mencionada.

Procesamiento del ovario fijado en paraformaldehído

Los ovarios fueron enjuagados con solución salina fisiológica. Como siguiente paso, se fijaron en paraformaldehído al 4% por 4 horas en refrigeración y en agitación constante y 24 horas en reposo. Posteriormente comenzaron una serie de lavados: 2 lavados con buffer Dulbecco's 1X una hora cada uno con la finalidad de quitar los posibles residuos del fijador, 2 lavados con etanol al 50% una hora cada uno, finalmente 2 lavados con etanol al 70%. Se mantuvieron en 40ml de etanol al 70% hasta ser cortados en rebanadas de 3mm perpendicularmente al eje mayor. Posteriormente se colocaron de forma individual en casetes para ser introducidos en el procesador de tejidos con el protocolo de embebido en parafina. Los casetes, al salir del procesador de tejidos, se colocaron en un molde de metal que se rellenó con parafina (60-65°C), formando rebanadas.

Selección de rebanadas y cortes

Bajo un muestreo aleatorio sistemático se seleccionaron al azar 1 de las 2 primeras rebanadas por ovario el cual marcó el inicio para la selección alternada de bloques hasta completar el ovario. Las rebanadas seleccionadas se cortaron a 10 μ m de grosor de los cuales se conservaron 2 cortes consecutivos por cada 40 para ser teñidos con hematoxilina y eosina.

Conteo de folículos primordiales

Para el conteo de folículos primordiales y transitorios se utilizó la técnica estereológica Disector físico. Para el disector físico se utilizaron 2 cortes consecutivos de cada 40, de los cuales se tomaron fotografías con magnificación 200x a una distancia de 2 y 3 mm entre cada foto hasta completar toda la superficie utilizando el software AnalySIS FIVE (Soft Imaging System). Se consideraron reglas de conteo para el disector físico (West *et al.*, 1999, Myers *et al.*, 2004). Para obtener datos de volumen, densidad numérica y finalmente número total de folículos primordiales y transitorios por ovario se emplearon las ecuaciones de Miller (*et al.*, 1997), los cuales son necesarios para obtener el número final de folículos bajo el disector físico.

Conteo de folículos primarios (Tipo 2), preantral pequeño (Tipo 3), preantral grande (Tipo 4) y antral pequeño (Tipo 5)

El conteo de folículos primarios, preantral pequeño, preantral grande y antral pequeño se realizó en el primero de cada par de cortes consecutivos señalados para el Disector físico; esto para evitar sobreestimar conteos, ya que son folículos de mayor tamaño que los primordiales. Considerando la clasificación de folículos de Lundy *et al.* (1999), se contaron sólo los folículos que presentaban una porción del núcleo del ovocito a una magnificación de 100X. Para el cálculo del número total de folículos se utilizó el factor de corrección (FC) de Ireland *et al.* (2008).

Procesamiento de Ovarios que presentaban Folículo mayor

Recolección de muestras del ovario que presentaba el folículo mayor

Inmediatamente después de la ovariectomía el ovario que presentaba el folículo mayor se diseccionó para obtener el número de folículos antrales y su correspondiente diámetro utilizando un Vernier. Los folículos diseccionados se dividieron en 3 grupos de acuerdo a su diámetro (Yu *et al.*, 2005):

- Folículos grandes $\geq 5\text{mm}$
- Folículos Medianos de 3-5mm
- Pool de folículos pequeños $< 3\text{mm}$

Variables de respuesta

1. Número de folículos grandes
2. Número de folículos medianos
3. Número de folículos chicos
4. Número de folículos totales
5. Número de cuerpos lúteos
6. Diámetro de folículos grandes
7. Diámetro de folículos medianos
8. Diámetro de folículos chicos
9. Diámetro del folículo mayor
10. Diámetro del cuerpo lúteo
11. Número de folículos primordiales
12. Número de folículos primarios
13. Número de folículos preantrales pequeños
14. Número de folículos preantrales grandes
15. Número de folículos antrales pequeños
16. Proporción de folículos primario/primordial

17. Proporción de folículos preantral pequeño/primordial
18. Proporción de folículos preantral grande/primordial
19. Proporción de folículos antral pequeño/primordial
20. Correlación del pool de folículos antrales/primordiales
21. Correlación del pool de folículos antrales/ preantral pequeño
22. Correlación del pool de folículos antrales/preantral grande
23. Correlación del pool de folículos antrales/antral pequeño
24. Correlación del pool de folículos antrales/ pool de folículos preantrales

Análisis estadístico para número y tamaño de folículos antrales y cuerpos lúteos del ovario diseccionado que presentaba el folículo mayor

Debido a la gran variación numérica para estas variables de respuesta, todos los datos fueron transformados antes de su análisis estadístico, los datos de número de folículos y CL fueron transformados a $\sqrt{(y+0.5)}$, mientras que las proporciones de cada grupo de folículos mediante arco seno \sqrt{y} . Los datos fueron analizados con PROC GLM en SAS.

Análisis estadístico para número total de folículos primordiales (Tipo 1), primarios (Tipo 2), preantral pequeño (Tipo 3 y 4) y antral pequeño (Tipo 5)

Para el análisis estadístico, debido a que el número de folículos transitorios fue reducido se decidió agregarlos al conteo de folículos primordiales.

Los datos fueron analizados con PROC GLM en SAS. Antes del análisis, los datos fueron transformados a $\sqrt{(y+0.5)}$.

VI. Resultados

Respecto a los folículos antrales no hubo diferencias de tratamiento en el número de folículos (cuadro 1) y cuando se comparó la proporción que aporta cada grupo al número total de folículos tampoco hubo diferencia ($P > 0.56$): los folículos grandes representan $13 \pm 1.8 \%$, folículos medianos $60 \pm 4.2 \%$ y folículos pequeños $27 \pm 3.9 \%$ (Fig 1).

En el conteo de folículos preantrales no hubo efecto de tratamiento sobre el número de folículos por tipo (cuadro 2). En cuanto a porcentaje de folículos totales (cuadro 3) no existe efecto de tratamiento ($P > 0.26$), donde los primordiales representan $92 \pm 1.9\%$; primarios, $3.5 \pm 0.9\%$; preantral pequeño, $0.9\% \pm 0.2\%$; preantral grande, $1.3 \pm 0.5\%$; y antral pequeño, $1.5 \pm 0.3\%$. Los folículos primordiales que alcanzan otro grado de diferenciación tampoco muestran diferencia significativa ($P = 0.43$) donde el pool de folículos preantrales representa el $8.7 \pm 2.8\%$. Los folículos primordiales que lograron diferenciarse a primarios ($P = 0.47$) son $4.1 \pm 1.3\%$; folículos primordiales que se diferenciaron a preantral pequeño ($P = 0.91$), $1 \pm 0.2\%$; folículos primordiales que se diferenciaron a preantral grande ($P = 0.26$), $1.6 \pm 0.02\%$; y folículos primordiales que se diferenciaron a antral pequeño ($P = 0.65$), $1.8 \pm 0.5\%$ tampoco tienen diferencia estadística.

Cuadro 1. Número y diámetro (Media \pm EE) de folículos ováricos antrales y CL de cabras bajo la administración prolongada de insulina a Dosis baja (0.30 UI/kg), Dosis alta (0.40 UI/kg) y sin insulina (testigo)

	Testigo	Dosis baja	Dosis alta	P
Número de folículos grandes	1.83 \pm 0.34	1.1 \pm 0.31	1.36 \pm 0.24	0.29
Número de folículos medianos	10.16 \pm 2.14	6.7 \pm 1.08	7.54 \pm 1.87	0.42
Número de folículos chicos	3.5 \pm 1.02	3 \pm 0.59	3.81 \pm 1.01	0.91
Número de folículos totales	15.5 \pm 2.7	10.8 \pm 1.14	12.9 \pm 2.09	0.45
Número de CL	0.91 \pm 0.14	1.1 \pm 0.23	1 \pm 0.26	0.89
Diámetro folículos grandes	8.19 \pm 0.3	8.83 \pm 0.4	7.96 \pm 0.3	0.38
Diámetro folículos medianos	3.46 \pm 0.1	3.56 \pm 0.1	3.61 \pm 0.1	0.64
Diámetro folículos chicos	1.4 \pm 0.1 ^b	1.87 \pm 0.1 ^a	1.68 \pm 0.1 ^b	0.02
Diámetro Folículo Mayor	9.7 \pm 0.7	8.25 \pm 0.8	8.09 \pm 0.6	0.25
Diámetro CL	10.16 \pm 0.8 ^b	11.62 \pm 0.8 ^a	10.15 \pm 0.8 ^b	0.16

Valores de renglón con diferente literal son estadísticamente diferentes. (Testigo, n=12; Dosis Baja, n=10; Dosis Alta, n=10). Los datos de número de folículos y CL fueron transformados a $\sqrt{(y+0.5)}$

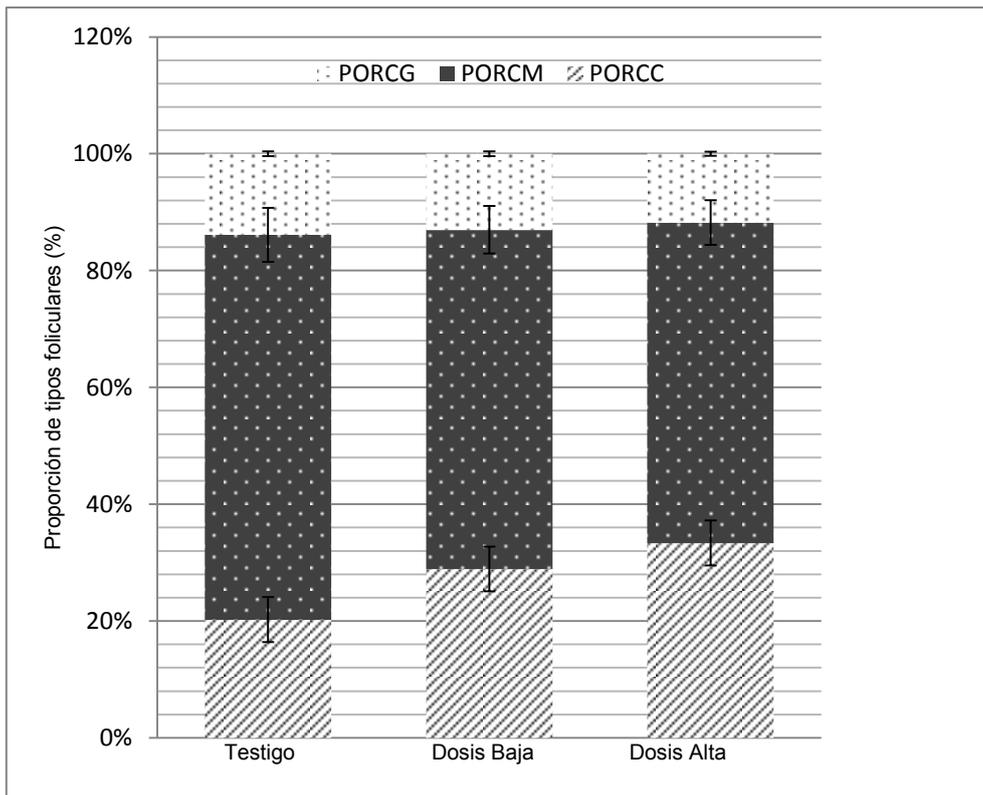


Fig 1. Proporción de poblaciones foliculares antrales de cabras (porcentaje \pm EE), bajo la administración prolongada de insulina a Dosis baja (0.30 UI/kg), Dosis alta (0.40 UI/kg) y sin insulina (testigo). Se muestra el porcentaje de folículos chicos (PORCC), Porcentaje de folículos Medianos (PORCM), Porcentaje de folículos Grandes (PORCG). Las proporciones de cada grupo de folículos fueron transformadas a arco seno \sqrt{y} . No se presentaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos

Cuadro 2. Número de folículos preantrales de cabras (Media, EE y P), bajo la administración prolongada de insulina a Dosis baja (0.30 UI/kg), Dosis alta (0.40 UI/kg) y sin insulina (testigo)

	Testigo (n=5)	Dosis baja (n=5)	Dosis alta (n=5)	EE	P
Primordiales	18266	14742	12910	4370.28	0.66
Primarios	376	398	370	107.36	0.99
Preantrales pequeños	170	120	78	45.91	0.4
Preantrales grandes	88	106	166	37.35	0.37
Antrales pequeños	172	148	200	56.05	0.98

El número de folículos transitorios fue reducido, por lo cual se decidió agregarlos al conteo de folículos primordiales. Antes del análisis, los datos fueron transformados a $\sqrt{y+0.5}$. No se presentaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos

Cuadro 3. Proporciones de número de folículos preantrales (% \pm EE), bajo la administración prolongada de insulina a Dosis baja (0.30 UI/kg), Dosis alta (0.40 UI/kg) y sin insulina (testigo).

Tipo	Testigo (n=5)	Dosis Baja (n=5)	Dosis Alta (n=5)	P
primario/primordial	.049 \pm .03	.052 \pm .03	.096 \pm .05	0.33
Preantral pequeño/primordial	.027 \pm .03	.023 \pm .04	.023 \pm .04	0.90
Preantral grande/primordial	.009 \pm .02	.012 \pm .02	.06 \pm .07	0.14
Antral pequeño/primordial	.022 \pm .02	.023 \pm .01	.086 \pm .10	0.53

Las proporciones de cada grupo de folículos fueron transformadas a arco seno \sqrt{y} . El número de folículos transitorios fue reducido, por lo cual se decidió agregarlos al conteo de folículos primordiales. El conteo de folículos primordiales se consideró como el total de folículos para realizar las proporciones. No se presentaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos

Cuadro 4. Correlación de número de folículos preantrales con el pool de folículos antrales, bajo la administración prolongada de insulina a Dosis baja (0.30 UI/kg), Dosis alta (0.40 UI/kg) y sin insulina (testigo)

	Primordial	Primario	Preantral pequeño	Preantral grande	Antral pequeño	Pool de Folículos preantrales
Pool de Folículos antrales	r= 0.27; P=0.32	r=0.44; P=0.09	r=0.38; P=0.15	r=0.1; P=0.64	r=0.48; P=0.06	r=0.42; p=0.11

El número de folículos transitorios fue reducido, por lo cual se decidió agregarlos al conteo de folículos primordiales. No se presentaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos

Ya que no hubo efecto de tratamiento, las observaciones de número de folículos se consideraron para análisis de correlación (cuadro 4). Se obtuvo para número total de folículos antrales con número total de folículos preantrales $r=0.42$ ($p=0.11$). Fueron poco evidentes las correlaciones de total de folículos antrales con folículos primordiales ($r=0.27$; $P=0.32$), con folículos primarios ($r=0.44$; $P=0.09$), con preantral pequeño ($r=0.38$; $P=0.15$), con preantral grande ($r=0.1$; $P=0.64$) y con antral pequeño ($r=0.48$; $P=0.06$). También se observa el mismo efecto con la correlación del total de folículos preantrales con folículos antrales grandes ($r=0.47$; $P=0.07$), con folículos antrales medianos ($r=0.44$; $P=0.09$) y con antrales chicos ($r=0.31$; $P=0.24$).

Respecto al tamaño de los folículos y CL (cuadro 1 y Fig.2), el tratamiento tuvo efecto sólo sobre el diámetro de los folículos pequeños ($P = 0.02$); el grupo de dosis baja tuvo el mayor diámetro (1.87 ± 0.11 mm), comparado con el testigo (1.4 ± 0.11 mm), el grupo de dosis alta fue intermedio (1.68 ± 0.11 mm) y diferente del grupo testigo ($P = 0.08$). El efecto del tratamiento sobre el tamaño del CL tendió a ser significativo ($P = 0.16$), con el mayor diámetro para el grupo de dosis baja (11.62 ± 0.81 mm), comparado con el testigo (9.45 ± 0.73 mm), siendo la dosis alta intermedia (10.16 ± 0.87 mm).

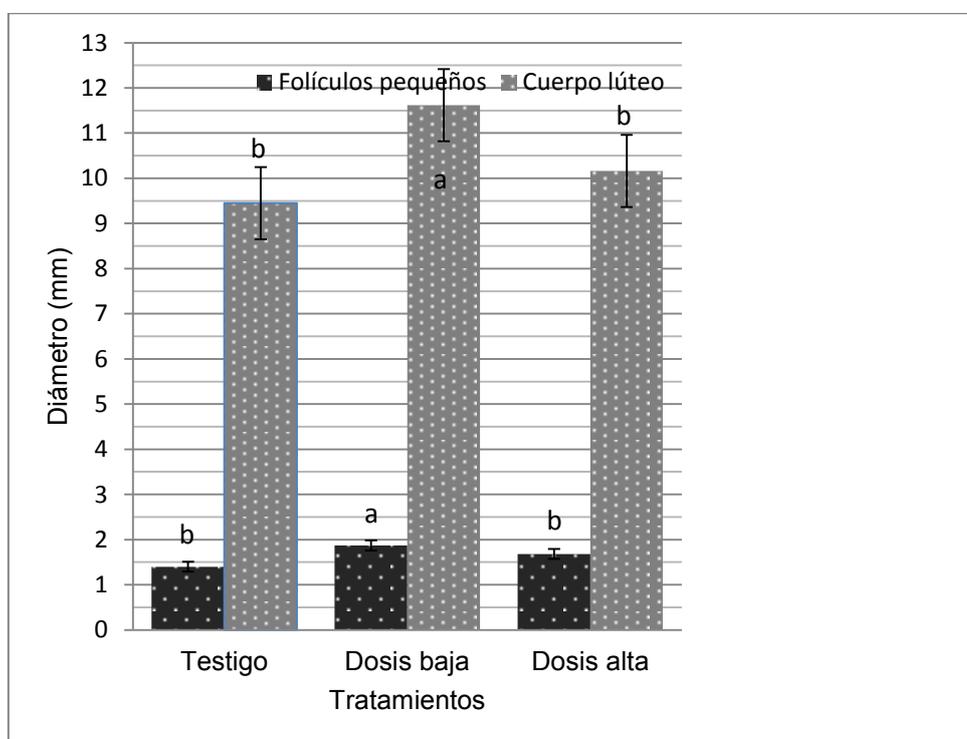


Fig 2. Diámetro de folículos pequeños y cuerpos lúteos (Media y EE), bajo la administración prolongada de insulina a Dosis baja (0.30 UI/kg), Dosis alta (0.40 UI/kg) y sin insulina (testigo). Valores con diferente literal son estadísticamente diferentes. (Testigo, $n=12$; Dosis Baja, $n=10$; Dosis Alta, $n=10$).

VII. Discusión

Estudios previos donde utilizan insulina para evaluar sus efectos en el desarrollo folicular justifican las inconsistencias en sus resultados a la exposición corta de insulina (Kirkwood *et al.*, 1991; Whitley *et al.*, 2000), por lo que en este experimento sus especulaciones quedan disipadas, ya que el tratamiento prolongado con insulina tampoco modificó el número de folículos preantrales ni antrales en cabras. En cuanto a las correlaciones de número de folículos de este trabajo, no se observó alguna relación lineal importante; se pudo deber a que los resultados de número de folículos, especialmente los microscópicos, mostraron gran heterogeneidad en la varianza por lo que la correlación no fue tan evidente a lo reportado en vacas, donde si hubo correlaciones significativas para número de folículos atrésicos y sanos (Ireland *et al.*, 2008).

Recordando que el material biológico para el presente trabajo se obtuvo de una prueba experimental previa realizada por Padilla (2009), es conveniente recordar parte de sus resultados donde hubo efecto de tratamiento y de tiempo para el número total de folículos antrales en el grupo de dosis alta de insulina (0.40 UI/kg), el cual fue superior ($P < 0.04$) a los demás grupos. Padilla (2009) obtuvo estos resultados por ultrasonografía, mientras que en el presente estudio se realizó conteo directo de los folículos diseccionados y conteo microscópico de los folículos preantrales y antrales pequeños, lo que hace suponer que la técnica de medición influyó en los resultados. Ante tal situación, Broekmans *et al.* (2010) afirman que el conteo realizado con ultrasonido, sobreestima el número de folículos antrales dado que se llegan a contar los folículos atrésicos como folículos sanos. Con esto, la técnica de medición es importante y sí puede influir en el resultado final.

Considerando la técnica, puede ocurrir lo mismo para el conteo microscópico de los folículos preantrales y antrales pequeños. En el presente trabajo se utilizó el Disector físico que es una técnica de conteo aleatorio y sistemático, donde las partículas tridimensionales son contadas en un par de planos paralelos separados por una distancia conocida. Esta técnica, anteriormente ha sido utilizada para el conteo de folículos como lo han hecho Myers *et al.* (2004), que contando folículos rutinariamente bajo varias técnicas, demostraron que el disector físico es una de las más adecuadas. Por su lado Miller *et al.* (1997), concluyen que los conteos con disector físico muestran gran exactitud e imparcialidad en el sentido estadístico para que todas las secciones tengan la misma probabilidad de ser incluidas en el muestreo, todas las áreas de las secciones tengan la misma probabilidad de ser muestreadas con sondas de conteo y todos los objetos en la sonda tengan la misma probabilidad de ser contadas. Otros autores como Haque *et al.* (2010) y Ireland *et al.* (2008) utilizan otra forma de conteo: sólo cuentan folículos en sólo un plano generando errores debido al tamaño, forma y orientación espacial de la muestra, sobreestimando conteos a pesar de corregir los conteos según el grosor del corte y el diámetro de la partícula, (Tilly *et al.*, 2003). Las técnicas utilizadas para el conteo de folículos en el presente trabajo fueron las correctas para acercarnos al número real de folículos.

In vitro, los resultados son más uniformes: en medios preparados con insulina, varios autores coinciden con mayor sobrevivencia celular, mayor desarrollo folicular, mayor producción de estradiol, disminución de la muerte celular y niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (Serafim *et al.*, 2013 Duleba *et al.*, 1997 Chaves *et al.*, 2011 Davidson *et al.*, 2001 Yun *et al.*, 2003). Es de suma importancia las dosis responsivas que se han logrado estandarizar en folículos ováricos de diferentes especies ya que las dosis de insulina *in vitro* parecen ser especie específica. Por ejemplo, en folículos de perra la dosis que mejor funciona es de 10 µg (Serafim *et al.*, 2013), mientras q en cabras la reducción de 10 µg a 10 ng promovió el desarrollo de folículos preantrales (Chaves *et al.*, 2011).

Las dosis anteriores están basadas en experiencias *in vitro*, ahora bien aplicando insulina exógena a cabras: Selvaraju *et al.* (2003) usaron un tratamiento de 0.20 UI insulina/kg PV por 3 días consecutivos a partir del día 10 del ciclo estral; Suguna *et al.* (2009) aplicaron 0.2 UI/kg PV por 3 días consecutivos al día 7-9 del ciclo estral y semanalmente durante la gestación; en el presente trabajo se administró 0.30 UI insulina/kg ó 0.40 UI insulina/kg cada 48 h durante 60 d y en ninguno de estos tratamientos hubo cambios en el número de folículos ni la tasa de ovulación. En contraste, Sarath *et al.* (2000) administrando únicamente 0.20 UI insulina/kg diariamente durante 5 días asignados aleatoriamente, hubo mayor número de folículos. Estos son algunos ejemplos donde utilizan diferentes tratamientos de insulina y sus resultados se observan muy heterogéneos. Por lo cual la frecuencia y cantidad de insulina debe replantearse hasta encontrar la dosis responsiva, esto es válido ya que existen pocos trabajos con cabras combinando el uso exógeno de insulina.

Considerando el momento para realizar las mediciones bajo un tratamiento de insulina, durante la etapa folicular, Padilla (2009) y Sarath *et al.* (2000) hallaron mayor número de folículos totales antrales en cabras; mientras que en cerdas puede ser tan marcado el efecto que se observa mayor tasa de ovulación (Cox *et al.*, 1987). Ahora, los resultados durante la etapa luteal se presentan sin cambios, es decir no se modifica el número de folículos antrales totales tras la ovariectomía en la etapa luteal como ocurre en vacas (Simpson *et al.*, 1994) y como ocurre en el presente trabajo. Por lo anterior, bajo un tratamiento de insulina la etapa del ciclo estral es independiente sobre los resultados, ya que en la etapa estral el número de folículos no presenta una tendencia como tampoco en la etapa luteal aplicando exógenamente insulina en diversas especies.

Otras variables que pueden intervenir en el número de folículos bajo un tratamiento exógeno de insulina se encuentra: edad, condición corporal, alimentación, estado reproductivo, estado nutricional que pueden incrementar las variaciones de respuesta.

Respecto al estado nutricional del animal, la insulina e IGF-I juegan un papel importante en el desarrollo folicular durante condiciones de desnutrición ó pérdida de peso, ya que estos acontecimientos causan el descenso de IGF-I e insulina. Bajo estas condiciones se disminuye la respuesta hacia gonadotropinas y posteriormente el crecimiento folicular es menor (Geisert y Doberska, 2001). Por el contrario, si previo al tratamiento con insulina exógena las ovejas se alimentan con una dieta de alto nivel nutricional, resulta imposible que la hormona pueda generar efectos favorables ya que se está exhibiendo el mayor nivel de productividad y así insulina no puede intervenir más en el desempeño reproductivo (Whitley *et al.*, 2000). Las cabras utilizadas para este experimento consumían dieta de mantenimiento, por lo que hubo oportunidad de presentarse algún efecto de tratamiento, aun así no se pudo demostrar efectos sobre el número de folículos.

La condición corporal aunque se mantuvo estable individualmente a lo largo del experimento, el rango era amplio (2 a 3.7) entre todos los animales, por lo que pudo ser una causa para que los resultados presentaran gran variabilidad numérica dentro de cada tratamiento. Estrada (2007), encontró un aumento del diámetro del folículo mayor en cabras con un índice de masa corporal alto, indicativo de altas reservas corporales. Así mismo, glucosa, insulina, leptina e IGF-I son encontrados en mayor concentración en los animales con altas reservas corporales de energía (Marie *et al.*, 2001).

Estimulando indirectamente la secreción de insulina se han observado efectos favorables en los folículos ováricos. Meza Herrera *et al.* (2004) proporcionando proteína de sobrepaso a cabras que funcionó como un potente estimulador de la secreción de insulina, el número de cuerpos lúteos aumentó a 2.62 ± 0.21 contra 2.06 ± 0.21 respecto al grupo control, por lo que la suplementación nutricional incrementó la tasa de ovulación. También se presenta mayor tasa de ovulación (2.7 ± 0.5 a 4.5 ± 1) administrando una dieta de alto valor energético a cabras acompañado de mayor concentración plasmática de insulina (Zabuli *et al.*, 2010). Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2002) administraron infusiones intravenosas de glucosa a ovejas y como era de esperarse se observó mayor concentración sanguínea de insulina y un mayor número de folículos, particularmente del tipo F2 y F3 (que corresponden a 2-3 y 3-4 mm de diámetro respectivamente). La administración de insulina junto a una dieta alta en energía a cerdas durante la fase folicular promovió una mayor tasa de ovulación de 15.6 a 19.1 (Cox *et al.*, 1987). El enlace entre la disposición de energía y la foliculogénesis puede involucrar diversas hormonas y factores de crecimiento como IGF-I, leptina, GH e insulina actuando localmente en el folículo para modular la foliculogénesis dirigida por gonadotropinas (Scaramuzzi *et al.*, 2010).

En los trabajos antes citados y en el mismo trabajo de Padilla (2009), del cual se obtuvo el material biológico para la presente tesis, la medición de insulina se hizo a nivel plasmático y ahí se demostró mayor concentración de insulina; pero por el objetivo del experimento, fuera de las mediciones de número y tamaño de folículos, ninguno evaluó a nivel ovárico algún marcador para determinar la capacidad folicular. En el presente trabajo, debido al bajo número de muestras y pequeña cantidad de líquido folicular no fue posible efectuar mediciones de concentración de insulina. Aun así, bajo estas condiciones se realizó PCR punto final para conocer la expresión genética del receptor de insulina en células de la granulosa (datos no presentados), pero bajo los tratamientos de insulina exógena en discusión, no se detectaron cambios respecto al grupo control, principalmente en folículos antrales chicos y medianos. Ya que es posible la falta de estimulación del receptor de insulina, los tratamientos de insulina exógena de este trabajo no fueron los adecuados

para interactuar a nivel folicular, por lo cual no presenta diferencias significativas la variable número de folículos. El receptor de insulina ya como varios autores han corroborado en diversas especies, está presente en células de la granulosa, de la teca y ovocitos reconociendo la participación de insulina en el desarrollo folicular (Acevedo *et al.*, 2007, Quesnel, 1999, Shimizu *et al.*, 2008).

Adicionalmente, el rango de edad de las cabras era amplio (3-5 años) en este experimento, y pudo ocurrir que con la edad se presentara pérdida de folículos como lo observado en ovejas de 1.5 a 5 años, donde se observa que hasta un 97% de folículos primordiales y hasta 85% de folículos primarios se pierden a los 5 años de edad (Ruoss *et al.*, 2009), por lo tanto los resultados de conteo de folículos de la presente tesis muestra varianzas muy heterogéneas.

Se ha demostrado mayor tamaño folicular aplicando exógenamente insulina en diversas especies, incluso utilizando estrategias nutricionales que puedan modificar la concentración de la hormona, se han observado efectos en el diámetro folicular. En el presente estudio hubo efectos mínimos, sólo observándose mayor diámetro en los folículos antrales chicos ó menores a 3mm. Esta situación se puede comparar con lo reportado por Matamoros *et al.* (1991) y Simpson *et al.* (1994) quienes encontraron mayor diámetro en folículos antrales, también acompañado de mayor volumen de líquido folicular, administrando insulina exógena.

En el estudio de Padilla (2009), se observó un aumento en el promedio del diámetro de los folículos mayores en el periodo 4 de muestreo ó día 45 del estudio. Previo a este periodo, se detectó un aumento de peso en los animales de los 3 grupos experimentales (control, dosis baja y dosis alta de insulina), así mismo las concentraciones circulantes de insulina e IGF-1 fueron mayores en el día 40 para los 3 grupos.

Utilizando estrategias nutricionales que puedan modificar la concentración de hormonas como insulina, se han observado efectos a nivel ovárico. Muñoz-Gutiérrez *et al.* (2002) agruparon ovejas alimentadas con una dieta basada en granos de lupin por 5 días donde además de elevarse la concentración sanguínea de insulina hubo un mayor diámetro en los folículos responsivos a p450 aromatasas, aunque no fue un cambio significativo.

Estudios *in vitro* revelan que la insulina participa en el desarrollo folicular, un ejemplo de ello lo reportan Chaves *et al.* (2011) que después de 7 días de cultivo con insulina se presenta mayor diámetro folicular y del ovocito en folículos de cabra. Xu *et al.* (2010) reportaron mayor diámetro folicular en folículos de monas Rhesus a una dosis de 5 µg insulina/ml. Por su parte, Serafim *et al.* (2013) presentan los mismos resultados en cuanto a diámetro folicular, el cual siempre fue mayor en los medios preparados con insulina durante las mediciones en los días 6, 12 y 18 de cultivo y fueron significativas en el día 18 con la dosis alta de 10 µg de insulina, esto en folículos de perra.

El aumento en tamaño de los folículos se asocia a la proliferación celular, estímulo de insulina sobre el número de células de la granulosa (Davidson *et al.*, 2002) y también participa en la proliferación de las células de la teca intersticiales (Duleba *et al.*, 1999). Los IGFs e insulina primero inducen la proliferación de células no diferenciadas, después estimulan su diferenciación y su capacidad esteroideogénica por lo que hay mayor producción de estradiol que se refleja en mayor cantidad de fluido folicular (Duleba *et al.*, 1997).

Cuando al medio de cultivo se adiciona insulina y FSH es posible observar efectos benéficos en el crecimiento folicular, observándose mayor respuesta o sinergia cuando la insulina se combina con FSH, (Gutiérrez *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2010; Serafim *et al.*, 2013). Con la presencia de FSH e insulina se puede incrementar la tasa de reanudación de meiosis permitiendo la producción de ovocitos maduros (Chaves *et al.*, 2012), estando presentes

ambas hormonas es mayor la esteroidogénesis para sintetizar E2 (Xu *et al.*, 2010). Shimizu *et al.* (2008) y Vendola *et al.* (1999) reportan que FSH puede regular la expresión de INSR en las células de la granulosa; mientras que Chaves *et al.* (2012) mencionan que su expresión se debe a la actividad conjunta de FSH e insulina. A partir de folículos preantrales, se ha observado una mayor expresión del ARNm del receptor de insulina en folículos de cabra con 2-3 capas de células de la granulosa (Chaves *et al.*, 2012). La insulina potencializa la respuesta esteroidogénica de las gonadotropinas en células de la granulosa *in vivo* e *in vitro*, este efecto puede ser mediado por el aumento del número de receptores de LH (Poretsky *et al.*, 1999, Xu *et al.*, 2010), ya que en complicidad con FSH mejora la capacidad de unión a LH en el ovario (Gutiérrez *et al.*, 1997). Con esta información queda claro que es mayor el efecto cuando se utilizan en combinación la insulina con FSH y es posible que en el presente trabajo la insulina no generara estimulación suficiente para disparar la concentración de FSH y de LH, por lo cual no se detectaron cambios importantes en las poblaciones foliculares. Recordando al trabajo previo donde se obtuvo el material biológico para la presente tesis (Padilla *et al.*, 2009), durante aquel experimento no realizaron mediciones de FSH plasmática ni en folículos que sustentara esta suposición.

In vitro, la insulina favorece la producción de E2 en folículos de mujer, (Willis *et al.*, 1996) y en folículos de yegua (Davidson *et al.*, 2001). La insulina en células de la granulosa de bovinos (Gutiérrez *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000) y ovinos (Campbell *et al.*, 1996) induce la secreción de E2 asociado a una mayor actividad de p450 arom. En folículos de bovinos de 2-5 mm, reduciendo paulatinamente la concentración de insulina en los 3 últimos días de cultivo, provocó menor expresión de p450 arom y estradiol (Silva and Price, 2002). En el presente trabajo, también se evaluó la expresión de p450 arom en las células de la granulosa de los mismos folículos que se contabilizaron (datos no presentados); donde se esperaría una expresión masiva de la enzima, principalmente en el folículo mayor, pero no fue así, no se presentaron variaciones entre tratamientos respecto al grupo control. Razones sobre este comportamiento puede deberse a la disminución de la capacidad de las células de la granulosa para convertir androstenediona a E2 (Downing *et al.*, 1999).

Se ha observado mayor expresión de IR en los folículos preovulatorios que se asocia con el incremento en la producción de estradiol, sugiriendo que la insulina es un factor que permite el desarrollo al estado preovulatorio (Shimizu *et al.*, 2008). Anteriormente había dudas respecto a la participación de insulina en estados más tempranos de desarrollo, pero se han presentado investigaciones donde concluyen que la insulina en el medio de cultivo participa en la activación de los folículos primordiales de bovinos (Yang and Fortune, 2002), presentándose IR en folículos preantrales (Acevedo *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2012) y disparando cascadas de señalización (Acevedo *et al.*, 2007).

Parte fundamental del diseño experimental de Padilla (2009) fue la de evaluar repetidamente el desarrollo folicular durante el periodo de administración de insulina (5 periodos de evaluación), de esta manera se puede evaluar el efecto de exponer a un tono aumentado de insulina a folículos ováricos a partir de diferentes estadios de desarrollo. De acuerdo a su hipótesis experimental planteada, tendría que ser más evidente el efecto de los tratamientos de insulina sobre el desarrollo folicular en los últimos periodos de evaluación, ya que los folículos antrales participantes habrían estado expuestos al tono elevado de insulina desde que estaban como folículos preantrales o antrales tempranos. Sin embargo, la única variable de respuesta asociada con el desarrollo folicular que fue consistentemente influenciada por la administración de insulina (número total de folículos antrales ≥ 2 mm), lo fue de la misma manera a través de todo el periodo de tratamiento (aumento en el número de folículos independiente del periodo de evaluación). Padilla (2009) sugiere que el efecto de insulina fue ejercido fundamentalmente sobre folículos en estadios tardíos de desarrollo, pero lo anterior queda descartado con las evaluaciones hechas en el presente trabajo donde no se observaron efectos de diámetro y tamaño folicular sometidos a la aplicación exógena de insulina de forma prolongada.

VIII. Conclusiones

El tratamiento en cabras con insulina durante 60 días no influyó en el número de folículos preantrales ni antrales, ni en el porcentaje de cada tipo folicular. En cuanto al tamaño folicular, no se encontró evidencia suficiente para confirmar la interacción de insulina exógena con el desarrollo folicular en cabras. Por lo cual, la insulina puede positivamente influenciar el desarrollo folicular si es administrada en animales dentro de un rango nutricional, metabólico que no están expuestos en el presente trabajo.

IX. Referencias

Acevedo, N., J. Ding and G. Smith. 2007. Insulin signaling in mouse oocytes. *Biol Reprod.* 77: 872-879.

Adams, G.P., R.L. Matteri and O.J. Ginther. 1992. The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J. Reprod. Fert.* 95:627-640.

Adashi, E. 2004. *The ovary.* 2^o ed. Elsevier, United States of America.

Alonso, I., Rosales, A., Ávalos, A., Vergara, M. y Rosado, A. 2003. Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. *Theriogenology* 60: 1071-1081.

Armstrong, D. G., C. G. Gutierrez, G. Baxter, and A.L. Glazyrin. 2000. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *J. Endocrinol.* 165:101-113.

Bleach, E. C. L., R. G. Glencross, S. A. Feist, N. P. Groome, and P. G. Knight. 2001. Plasma Inhibin A in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotrophins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol. Reprod.* 64: 743-752.

Bondurant, R. H. 1999. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.* 77: 101-110.

Britt K L, Saunders P K, McPherson S J, Misso M L, Simpson E R, Findlay J K. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod.* 2004; 71:1712- 1723.

Broekmans, F. J. M., D. Ziegler, C. M. Howles, A. Gougeon, G. Trew, and F. Olivennes. 2010. The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertility and Sterility*. 94:3 1044-1051.

Bulnes, A. G., R. M. Garcia, J. Carrizosa, B. Urrutia, C. J. Souza, M. J. Cocero, and A. S. McNelly. 2004. Plasma inhibin A determination at start superovulatory FSH treatments is predictive for embryo outcome in goats. *Domestic. Anim. Endocrinol.* 26: 259-266.

Butler, S. T., S. H. Pelton, and R. Butler. 2004. Insulin increases 17beta estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reprod.* 127:537- 545.

Campbell B. K., R. J. Scaramuzzi, and R. Webb. 1996. Induction and maintenance of oestradiol and immune-reactive inhibin production with FSH by bovine granulosa cells cultured in serum free media. *J. Reprod. Fertil.* 106: 7-16.

Canty-Laird, E., G. Carre, B. Mandon-Pepin, K. E. Kadler, and S. Fabre. 2010. First evidence of Bone Morphogenetic Protein 1 expression and activity in sheep ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 83: 138-146.

Carvalho, C. R. O., J. Carvalheira, M. Lima, S. Zimmerman, L. Caperuto, A. Amanso, A. Gasparetti, V. Maneghetti, L. Zimmerman, L. Velloso and M. Saad. 2003. Novel signal transduction pathway for luteinizing hormone and its interaction with insulin: Activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and phosphoinositol 3-kinase/Akt pathways. *Endocrinology* 144 (2): 638-647.

Castañeda, V. Efecto de la insulina sobre la esteroidogénesis y proliferación *in vitro* de las células de la granulosa en cabras (Tesis de Maestría) Cuautitlan Izcalli, Mexico: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Mexico; 2008.

Chagas, L.M., J.J. Bass, D. Blache, C.R. Burke, J.K. Kay, D.R. Lindsay, M.C. Lucy, G.B. Martin, S. Meier, F. M. Rhodes, J.R. Roche, W.W. Tatcher and R. Webb. 2007. Invited review: new perspectives on the roles of

nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 4022-4032.

Chakravorty, A., M. Joslyn, and J. Davis. 1993. Characterization of insulin and insulin-like growth factor-I actions in the bovine luteal cell: regulation of receptor tyrosine kinase activity, phosphatidylinositol-3-kinase, and deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 133 (3): 1331-1340.

Chaves, R. N., A. M. Alves, L. R. Faustino, K. P. Oliveira, C. C. Campello, C. A. P. Lopes, S. N. Bao, J. R. Figueiredo. 2011. How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. *Cell and tissue research.* 346 (3): 451-456.

Chaves, R. N., A.B.G. Duarte, G.Q. Rodrigues, J.J.H. Celestino, G.M. Silva, C.A.P. Lopes, A.P. Almeida, M.A.M. Donato, C.H. Lobo, Y. Locatelli, P. Mermillod, C.C. Campello, J.R. Figueiredo. 2012. The effects of insulin and FSH during *in vitro* development of isolated goat preantral follicles, and the relative mRNA expression of insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles. *Reproduction.*

Cox, N. M., M.G. Stuart, G. Althen, W. A. Bennett , and H. W. Miller. 1987. Enhancement of ovulation rate in gilts by increasing dietary energy and administering insulin during follicular growth. *J. Anim. Sci.* 64: 507-516.

Cui H.X., S. M. Zhao, M. L. Cheng, L. Guo, R. Q. Ye, W. Q. Liu, and S. Z. Gao. 2009. Cloning and expression levels of genes relating to the ovulation rate of the Yunling black goat. *Biol. Reprod.* 80: 219–226.

Davidson, T., S. C. Chamberlain, T. Bridges, and L. J. Spicer. 2002. Effect of follicle size on *in vitro* production of steroids and IGF-I, IGF-II and IGFBP by equine ovarian granulosa cells. *Biol. Reprod.* 66:1640-1648.

De Meyts, P. 2004. Insulin and its receptor: structure function and evolution. *BioEssays* 26:1351–1362.

Dhaeseleer, M., G. Coquyt, S. Van, P. Simoens, and W. Van Den. 2006. Cell specific localization of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrus cycle. *Theriogenology* 65: 757-772.

Diskin M G, Mackey D R, Roche J F, Sreenan J M. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci.* 78: 345–370.

Downing, J. A., J. Joss, and R. J. Scaramuzzi. 1999. The effect of a direct arterial infusion of insulin and glucose on the ovarian secretion rates of androstenedione and oestradiol in ewes with autotransplanted ovary. *J. Endocrinol.* 163: 531-541.

Duleba, A: R: Spackzynzk, D. Olive, and H: Berhman.1997. Effects of insulin and insulin like growth factors on proliferation of rat ovarian theca interstitial cells. *Biol. Reprod.* 56:891-897.

Duleba, A., R. Z.Spaczynski, D. L.Olive, and Harold R.Behrman. 1999. Divergent mechanisms regulate proliferation/survival and steroidogenesis of theca–interstitial cells. *Molecular Human Reproduction.*5 (3): 193–198.

Estrada E C. Efecto de las reservas corporales de energía y de la restricción nutricional sobre la expresión de la transición estacional en cabras (Tesis de Maestría) Cuautitlan Izcalli, Mexico: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Mexico; 2007.

Fiona, H. T., D. G. Armstrong, and E. Telfer. 2003. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 76.

Flores, P. I., Velasco, R. C., Romano, P. M. y Pérez, M. M. 2005. Apoptosis y atresia folicular: un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Vet. Méx.* 36 (01): 87-103.

Fortune, J. E., G. M. Rivera, A. C. O. Evans, and A. M. Turzillo. 2001. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 65: 648-654.

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

Fouladi-Nashta A. A. and K. H. S. Campbell. 2006. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction.* 131: 449–460.

Geisert, R. D. and C. Doberska. 2001. Reproduction, control of pig reproduction VI Supl. 58. The Soc. Reprod. Fertil., United Kingdom.

Guthrie, H.D., W. M. Garrett, and B. S. Cooper. 1998. follicle-stimulating hormone and insulin like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 58: 390-396.

Gutierrez C G, Oldham J, Bramley T A, Gong, Campbell B K, Webb R. 1997. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. *J Anim Sci.* 75: 1876-1884.

Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. 2000. Growth and antral formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod*, 62:1322-1328.

Hansbergtorres, W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje bioquímico*, vol. XXVI 19-54.

Haque, A. J. C. Kalita, D. Deka, and K. Barua. 2010. Effect of effluent water downstream to the nagaon paper mill, assam on ovarian follicular population of immature female CH3 mice. 2: 529-535.

Henry, H. and A. Norman. 2003. Encyclopedia of hormones. Vol.2. Elsevier, United States of America.

Honhold, N., H. Petit, R. W. Halliwell. 1989. Condition scoring scheme for small east African goats in Zimbabwe. Trop Anim Health Prod. 21(2): 121-7.

Ireland, J. L. H., D. Scheetz, F. Jimenez-Krassel, A.P.N. Themmen, F. Ward, P. Lonergan, G.W. Smith, G.I. Perez, A.C.O. Evans, and J.J. Ireland. 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. Biol. of Reprod. 79: 1219–1225.

Jiménez-Severiano, H., L. García-Casanova, D.C. Valdez, H.R. Vera-Ávila, P.E. González, C.A. Mejía-Guadarrama. 2008. Estimación de las poblaciones foliculares tempranas en ovarios de cabras por medio de un disector físico. Memorias de la XLIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 3 al 8 de noviembre del 2008. Mérida Yucatán, México. p68.

Kaburagi, Y., R. Yamashita, Y. Ito, H. Okochi, R. Yamamoto, K. Yasuda, H. Sekihara, T. Sasazuki, T. Kadowaki and Y. Yazaki. 2004. Insulin-induced cell cycle progression is impaired in chinese hamster ovary cells overexpressing insulin receptor substrate-3. Endocrinology 145 (12):5862-5874.

Kirkwood, R. N., P. A. Tracker, R. S. Korchinski, A. González, and B. Laarveld. 1991. Effect of pre-mating injections of insulin on fertility and prolificacy of ewes. Can. J. Anim. Sci. 71: 241-244.

Kronenberg, H. M. 2009. Williams, Tratado de Endocrinología. 11º ed. Elsevier, España.

Larsen R., Kronenberg H., Melmed, S., Polonsky K. 2003. Williams text book of Endocrinology Ed. 10. Elsevier, United States of America.

Maillet, M. 2002. Biología Celular. Elsevier, España.

Marie M, Findlay P A, Thomas L, Adam C L. 2001. Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. J Endocrinol. 170: 277- 286.

Lundy, T., P. Smith, A. O'Connell, N. L. Hudson and K. P. McNatty. 1999. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. J. Reprod. Fert. 115: 251-262.

Markstrom, E., E. Svenson, R. Shao, B. Svanberg, and H. Billig. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence of follicle differentiation. Reproduction 123: 23-30.

Matamoros, I. A., N. M. Cox, and A. B. Moore. 1991. Effects of exogenous insulin and body condition on metabolic hormones and gonadotropin induced follicular development in prepuberal gilts. J. Anim. Sci. 69:2081-2091.

Medan, M.S. G. Watanabe, K. Sasaki, S. Sharawy, N. P. Groome, and K. Taya. 2003. Ovarian dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins, ovarian steroids, and inhibin during the estrous cycle in goats. Biol. Reprod. 69:67-63.

Meza-Herrera, C. A., J. M. Sánchez, J. G. Cháves-Perches, H. Salinas and M. Mellado. 2004. Protein supplementation, body condition and ovarian activity in goats pre-ovulatory serum profile of insulin. South African J. of Anim. Sci. 34 (1): 223-226.

Miller, P. B., J. S. Charleston, D. E. Battaglia, N. A. Klein, and M. R. Soules. 1997. An accurate, simple method for unbiased determination of primordial follicle number in the primate ovary. *Biol. of Reprod.* 56: 909-915.

Muñoz-Gutiérrez, M., D. Blache, G. B. Martin, and R. J. Scaramuzzi. 2002. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. 124: 721-731.

Myers, M., K. L. Britt, N. G. M. Wreford, F. J. P. Ebling, and J. B. Kerr. 2004. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse Ovary. *Reproduction.* 127: 569–580.

Neganova, I., H. Al-Qassab, H. Heffron, C. Selman, A. I. Choudhury, S. J. Lingard, I. Diakonov, M. Patterson, M. Ghatei, S. R. Bloom, S. Franks, I. Huhtaniemi, K. Hardy, and D. J. Withers. 2007. Role of Central Nervous System and Ovarian Insulin Receptor Substrate 2 Signaling in Female Reproductive Function in the Mouse. *Biol. Reprod.* 76: 1045-1053.

Nishimoto, H., R. Matsutani, S. Yamamoto, T. Takahashi, K. G. Hayashi, A. Miyamoto, S. Hamano and M. Tetsuka. 2006. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 y 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J. Endocrinol.* 188: 111-119.

Nystrom, F. and M. Quon. 1999. Insulin signaling: Metabolic pathways and mechanism for specificity. *Cell. Signal.* 11 (8): 563- 574.

Ola, J., M. A. Lee and T. E. Mc Graw. 2006. GLUT4 distribution between the plasma membrane and the intracellular compartments is maintained by an insulin modulated bipartite dynamic mechanism. *The J. Biol. Chem.* 281 (1): 484-490.

Padilla, D. Efectos de la administración prolongada de insulina sobre el desarrollo folicular y la tasa ovulatoria en cabras. (Tesis de Maestría) Cuautitlan Izcalli, Mexico: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Mexico; 2009.

Pepling, M., E., A. C. Spradling. 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed Breakdown to form primordial follicles. *Develop. Biol.* 234 (2):339-351.

Pepling, M. E. 2012. Follicular assembly: mechanisms of action. *Reprod.* 143:139-149.

Poretzky, L., A. Nicholas, Z. Cataldo, Z. Rosenwaks, and L. Giudice. 1999. The insulin related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocrine Rev.* 20 (4): 535-582.

Reyes, G. M y T. Sánchez. Inflamación, mecanismos bioquímicos e inmunológicos del daño tisular y bases farmacológicas de su tratamiento. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. 2006. pp, 50-70.

Rosales, T. A. M. y Guzmán, A. 2008. Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Téc. Pecu. Méx.* 46 (2) 159- 182.

Ruoss, C., A. Tadros, T. Oshea, J. MacFarlane, and A. Almahbobi. 2009. Ovarian Follicle development in Booroola sheep exhibiting impaired bone morphogenetic protein signaling pathway. *Reproduction.* 138: 689-696.

Sarath, T., S. Mehrotra, S. K. Agarwal, V. P. Varshney, M. Hoque, U. Shankar, and S. K. Singh. 2008. Effect of insulin administration on ovarian function and estrus induction in acyclic goats. *Anim. Reprod. Sci.* 108:216-225.

Sawyer, H. R., P. Smith, D. A. Heath, J. L. Juengel, St. J. Wakefield, and K. P. McNatty. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod.* 66:1134-1150.

McNatty. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol. Reprod.* 66:1134-1150.

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

Scherzer, J., S.P.S. Guhman, M. Pope, J.E. Routly, I. Walter, R.F. Smith, and H. Dobson. 2009. Follicle and oocyte morphology in ewes after treatment with insulin in the late follicular phase. *Theriogenology* 71: 817-828.

Selvaraju, S., Agarwal S. K., Karche S. D., Majumdar A. C. 2003. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. *Theriogenology.* 59:1459-1468.

Serafim, M., G. Silva, A. Duarte, V. R. Araujo, T. F. P. Silva, A. K. Lima, R. N. Chaves, C. C. Campello, L. D. Silva and J. R: Figueiredo. 2013. High insulin concentrations promote the *in vitro* growth and viability of canine preantral follicles. *Reprod. Fert. Devel.* 25:927-934.

Shimizu, T., C. Murayama, N. Sudo, C. Kawashima, M. Tetsuka, A. Miyamoto. 2008. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim. Reprod. Sci.* 106: 143-152.

Silva J. M. and C. A. Price. 2000. Effect of FSH on steroid secretion and messenger ribonucleic acid encoding cytochrome p450 aromatase and cholesterol side chain cleavage in bovine granulosa cells *in vitro*. *Biol. Reprod.* 62: 186-191.

Silva, J. R. V., M. A. L. Ferreira, S. H. Costa, R. R. Santos, F. C. A. Carvalho, A. P. R. Rodrigues, C. M. Lucci, S. N. Bao, J. R: Figueiredo. 2002. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Rum. Res.* 43: 203-209.

Silva J.M., and C. A. Price. 2002. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells *in vitro*. J. Endocrinol. 174:499–507.

Silva, J. R. V., T. Tharasanit, M. A. M. Taverne, G. C. van der Weijden, R. R. Santos, J. R. Figueiredo, and R. van den Hurk. 2006. The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. J. Endocrinol. 189: 113-125.

Simpson, R. B., C. Chase, L. J. Spicer, R. K. Vernon, A. C. Hammond, and D. O. Rae. 1994. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular IGF-I, IGFBP activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. J. Reprod. and Fert. 102: 483-492.

Spaczynski, R., J. Tilly, A. Mansour, and A. Duleba. 2005. Insulin and insulin-like growth factors inhibit and luteinizing hormone augments ovarian theca interstitial cell apoptosis. Mol. Cell. Endocrinol. 11: 5: 319-324.

Spicer, L. J. and S. E. Echterkamp. 1995. The ovarian insulin and insulin like growth factor system with emphasis on domestic animals. Dom. Anim. Endocrinol. 12: 223-245.

Suguna, K., S. Mehrotra, S. K. Agarwal, M. Hoque, U. Shanker, S. K. Singh, and V. P. Varshney. 2009. Effect of exogenous insulin administration on ovarian function embryo/fetal development during pregnancy in goats. Anim. Reprod. Sci. 111:202-211.

Thong, F., C. B. Dugani and A. Klip. 2005. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin –signaling highway. Physiology. 20: 271-284.

Tilly, J. 2003. Ovarian follicle counts not as simple as 1,2,3. Reprod. Biol. Endocrinol. 1: 1-4.

Tingen, C., A. Kim, and T. K. Woodruff. 2009. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol. Hum. Reprod.* 15 (12): 795–803. (Abstr.)

Tresguerres, J.F. y Fernández, J.A. 2003. *Biotechnología aplicada a la medicina*. Editorial Díaz de Santos. España, pp. 120-127.

Vendola, K., J. Zhou, J. Wang, O. Famuyiwa, C Bievre. 1999. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biology of Reproduction* 61: 353-357.

Vijay, K. Y., R. S. Ranga, and R. Medhamurthy. 2002. Apoptosis during spontaneous and prostaglandin F₂-alfa induced luteal regression in the buffalo cow (*Bubalus bubalis*): Involvement of mitogen –activated protein kinases. *Biol. Reprod.* 67, 752- 759.

Webb, R., B. K. Campbell, H. A. Garverick, J. G. Gong, C. G. Gutierrez and D. G. Armstrong. 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J.Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 33-48.

West, M. 1999. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci.* 22: 51-61.

White, M. and R. Kahn.1994. The insulin signaling system. *The J. Biol. Chem.* 269 (1): 1-4.

Whitley, N.C., E. L. McFadin, and D.H. Keisler. 2000. Effect of insulin on feed intake and reproductive performance of well-nourished nulliparous ewes. *Theriogenology.* 54:1049-1054.

Willis, D., H. Mason, C. Gilling, S. Franks. 1996. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*81(1):302-309.

Xu, J., M. P. Bernuci, M. S. Lawson, R. R. Yeoman, T. E. Fisher, M. B. Zelinski, and R. L. Stouffer. 2010. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young, and older adult rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional culture: effects of gonadotropins and insulin. *Reprod.* 140: 685-697.

Yang and Fortune. 2002. Insulin and IGF-I exert opposite effects on the activation of bovine primordial follicles. *Biol. Reprod.* 66 Suppl 1: 111.

Yang, M. Y., and R. Rajamahendran. 2000. Involvement of apoptosis in the atresia of non-ovulatory dominant follicle during the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.* 63: 1313-1321.

Yenush, L. 1997. The IRS signalling system during insulin and cytokine action. *BioEssays* 19 (5): 491-500.

Yu, Y. S., M. J. Luo, Z. B. Han, W. Li, H. S. Sui, J. H. Tan. 2005. Serum and follicular fluid steroid levels as related to follicular development and granulosa cell apoptosis during the estrus cycle in goats. *Small Rum. Res.* 57: 57-65.

Yun, Z., M. Takagi, and T. Yoshida. 2003. Repeated addition of insulin for dynamic control of apoptosis in serum-free culture of Chinese hamster ovary cells. *J. Biosci. Bioengin.* Vol. 96: 1: 59-64.

Zabuli, J., T. Tanaka, W. Lu, and H. Kamomae. 2010. Intermittent nutritional stimulus by short term treatment of high energy diet promotes ovarian performance together with increases in blood levels of glucose and insulin in cycling goats. *Anim. Reprod. Sci.* 122:288-293.