

MODULACIÓN DE LA RESPUESTA A INSULINA EN EL OVARIO BOVINO Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA

MODULATION OF INSULIN RESPONSE IN OVARIAN CATTLE AND ITS RELATIONSHIP WITH CYSTIC OVARIAN DISEASE

Carolina Guadalupe PANZANI*; Gustavo Juan HEIN*; Natalia Raquel SALVETTI; Hugo Héctor ORTEGA; Florencia REY
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET Litoral). Universidad Nacional del Litoral. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

*Los dos primeros autores contribuyeron por igual en la realización del manuscrito.

RESUMEN.

La enfermedad quística ovárica bovina es una importante enfermedad que afecta la fertilidad del ganado bovino lechero. Diversos procesos ováricos tales como la proliferación celular y la esteroidogénesis se encuentran regulados por numerosas hormonas entre las que se encuentra la insulina. La respuesta a esta hormona se desencadena luego de la unión a su receptor específico. El objetivo de la presente revisión es analizar la función de intermediarios claves en la vía de señalización intracelular, que actúan en los primeros estadios involucrados en la respuesta a insulina. Se analizan el receptor de insulina (IR), el sustrato -1 del IR (IRS1) y la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) denotando modificaciones ocurridas en folículos quísticos que podrían influenciar negativamente en la funcionalidad de ovarios y contribuir a la persistencia folicular.

Palabras claves: insulina, ovario, bovinos, enfermedad quística ovárica.

ABSTRACT.

Cystic ovarian disease (COD) is an important disease affecting fertility in dairy cattle. Several ovarian processes such as cell proliferation and follicular cell steroidogenesis are regulated by numerous hormones including insulin. The hormone response is triggered after the binding to its receptor. The aim of this review is to analyze the role of key intermediates in the intracellular signaling pathway that act in the early stages of the insulin response. Therefore, insulin receptor (IR), IR substrate-1 (IRS1) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) are analyzed showing changes that occur in cystic follicles and which could negatively influence the functionality of ovaries and contribute to follicle persistence.

Keywords: insulin, ovary, bovine, cystic ovarian disease.

Recibido abril 22, 2015 - Aceptado agosto 24, 2015

* **Correspondencia de autor:** Florencia Rey. Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET Litoral, UNL-CONICET) Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. R.P. Kreder 2805 (CP 3080). Esperanza, Santa Fe, Argentina. Tel: 54-3496-420639-223, Fax: 54-3496-428576-350. e-mail: frey@fcv.unl.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La enfermedad quística ovárica (COD, del inglés *cystic ovarian disease*) constituye uno de los desórdenes reproductivos más frecuentes en vacas lecheras de alta producción, afectando aproximadamente al 15% en una lactancia. Estos problemas reproductivos se asocian a la prolongación de los intervalos parto-primer celo, parto-concepción y parto-parto (1). El rango de ocurrencia de la COD es entre los 33 y los 148 días postparto. La incidencia de los quistes foliculares varía entre el 5 a 10%, si bien se reporta hasta un 30%, el 24% de los quistes que aparecen antes de los 39 días postparto regresan espontáneamente (1, 2, 3). Por lo tanto, la disminución de la eficiencia reproductiva en bovinos representa un factor importante de consecuencias directas sobre los resultados productivos y económicos en la producción de leche y carne (1, 4). En bovinos de leche se ha demostrado que el índice de concepción se reduce aproximadamente 1% y los problemas reproductivos se triplican cuando la producción de leche se duplica (5). La COD presenta alto grado de incidencia con un considerable impacto económico, y debido a que el mecanismo exacto por el cual se manifiesta no se encuentra definido, existe un gran interés por estudiar su etiopatogenia.

La COD se define como la presencia en el ovario de una o más estructuras foliculares mayores a 20 mm de diámetro y que persisten en ausencia de cuerpo lúteo activo, interrumpiendo el ciclo reproductivo normal (1, 3, 6). Esta enfermedad puede originarse por múltiples variables entre las que se destacan los efectos del balance energético negativo (BEN), el estrés por calor y las deficiencias nutricionales, entre otras. El BEN se presenta fundamentalmente durante el período postparto temprano. Es debido a un incremento en la

demanda energética destinada al mantenimiento y producción de leche que supera al aporte de la dieta, con disminución en la capacidad ruminal consecuencia de la gestación. Por consiguiente, el animal requiere movilizar sus reservas corporales (7, 8, 9) conduciendo a pérdida de la condición corporal óptima. Todo lo anterior sumado a los niveles nutricionales inferiores a los requeridos afectan la reanudación de la actividad ovárica (10) o produce fallas durante la ovulación causando persistencia folicular y anestro (11, 12, 13).

La selección de bovinos para mejorar la producción de leche ha provocado modificaciones en el perfil hormonal, habiéndose determinado incrementos en las hormonas que favorecen la producción de leche tales como la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina (PRL), y disminución en los niveles de hormonas metabólicas como la insulina al inicio de la lactancia (14). El mayor requerimiento de glucosa por la glándula mamaria durante la lactancia para la síntesis de lactosa, causa la disminución de la glucemia y conduce a la ausencia de estímulo para la liberación de insulina. Los bajos niveles de insulina y de glucosa determinados en el postparto inhiben la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) en el hipotálamo y la subsecuente liberación de la hormona luteinizante (LH) en la hipófisis (12). Esta interferencia en los mecanismos que regulan el ajustado cronograma de eventos de la fase folicular, principalmente del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, privarían al ovario de los niveles adecuados de LH para la ovulación, con la persistencia de folículos ovulatorios o prolongada fase luteal (15).

La insulina ejerce en el ovario efectos directos e indirectos sobre la esteroidogénesis y el crecimiento de las células de la granulosa y de la teca como se ha demostrado *in vitro* (16, 17) e *in vivo* (18, 19). Además, se ha

postulado a la insulina como factor esencial para la maduración folicular (20) y la función ovárica normal en el postparto (21) dado que incrementa la capacidad esteroidogénica del folículo dominante (22). Por otra parte, la insulina estimula la expresión del receptor de LH en las células de la granulosa de manera indirecta, a través de la estimulación del receptor del factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF R1) (23). Otro factor relacionado a la acción de la insulina en el ovario y que regula el crecimiento, la diferenciación folicular y la esteroidogénesis es el factor de crecimiento análogo de la insulina tipo 1 (IGF1). El rol más relevante del IGF1 está asociado a su capacidad para ejercer acción sinérgica con las gonadotropinas y amplificar la esteroidogénesis. Es así que la concentración del 17β -estradiol resulta aumentada por la acción del IGF1 y es modulada por los niveles de insulina induciendo finalmente, el pico de LH y la consecuente ovulación del folículo dominante (22, 24, 25, 26).

Diversos factores metabólicos y hormonales como la insulina se han propuesto como principales mediadores de las alteraciones características de la COD (14, 17, 27, 28, 29). En este trabajo de revisión se propone informar los avances inherentes al análisis de la señalización intracelular mediada por la insulina y su posible contribución al desarrollo de la COD.

RED DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA

Los efectos biológicos de la insulina se inician a partir de su unión al receptor, activándose una red de señalización intracelular muy compleja que involucra numerosas proteínas mensajeras, conocidas como "*docking proteins*", para finalmente controlar procesos vitales en el organismo (30, 31). Durante décadas, muchos investigadores han tratado de dilucidar los

eventos intracelulares que suceden luego de la activación del receptor de insulina (IR), sugiriendo que posibles alteraciones en la cascada de señalización participarían en las disfunciones ováricas (32–35).

Para entender la disfuncionalidad de la red de señalización intracelular de la insulina y sus efectos en la actividad ovárica, es necesario revisar los conceptos básicos sobre los mecanismos de acción de dicha hormona. La estimulación del IR conduce a la activación de dos vías principales: a) vía de fosfatidilinositol-3-OH-quinasa (PI3K), que ha sido estudiada ampliamente en el contexto de la respuesta metabólica a la insulina (36) y b) cascada de la "proteína quinasa activada por mitógeno" (MAPK), que regula la expresión de genes que cooperan con la vía PI3K para el control del crecimiento y la diferenciación celular (31).

Receptor de Insulina (IR)

La insulina circulante alcanza rápidamente el tejido "blanco", donde interactúa con su receptor (IR), una proteína tirosina-quinasa transmembrana, cuya configuración es tetramérica: $\alpha 2/\beta 2$ (37). Luego de la unión de la insulina a su receptor se produce autofosforilación inmediata que conduce a la cascada de fosforilaciones de varios sustratos intracelulares que incluyen la familia de las proteínas "sustratos receptor de insulina" (IRSs), siendo el primer punto crítico en la red de señalización intracelular (31).

Sustrato receptor de insulina (IRS)

Se han identificado hasta el momento seis proteínas pertenecientes a la familia IRS las que se designan como IRS1 a 6 (30, 31). Los IRSs poseen un dominio homólogo conservado (PH) localizado en la porción amino-terminal, que les permite acoplarse al receptor. Además,

contienen un dominio carboxilo-terminal (PTB) en la región PH que permite interactuar con los residuos de tirosinas fosforiladas del receptor. Los dominios PTB de los sustratos receptores de insulina 1 y 2 (IRS1 e IRS2) comparten el 75% de homología en sus secuencias, mientras que la región carboxilo-terminal está pobremente conservada y contiene múltiples sitios de fosforilación de tirosinas que sirven como sitios de unión a dominios del tipo SH2, como los presentes en la subunidad reguladora de la PI3K (30).

Fosfatidilinositol-3'-OH-quinasa (PI3K)

La enzima PI3K activa constituye otro punto crítico en la cascada de señalización de insulina. La PI3K es un heterodímero compuesto por dos subunidades: regula-

dora y catalítica. La activación de la subunidad catalítica depende de la interacción de los dominios SH2 en la subunidad reguladora con motivos específicos de fosfotirosinas en sitios de las proteínas IRS. La unión de los heterodímeros a las fosfotirosinas de las proteínas IRS conduce a la producción de fosfoinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) a partir de PIP₂ en la membrana plasmática (Fig. 1). Finalmente, estos fosfolípidos activan otros efectores de la cascada de señalización que encuentran mediados por la proteína quinasa B/AKT (PKB). La PKB/AKT es una serina/treonina quinasa y resulta ser uno de los blancos implicados en la vía de señalización de la PI3K, participando en la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina e involucrando fosforilaciones de otros sustratos tales como quinasas, proteínas señales y factores de transcripción (31).

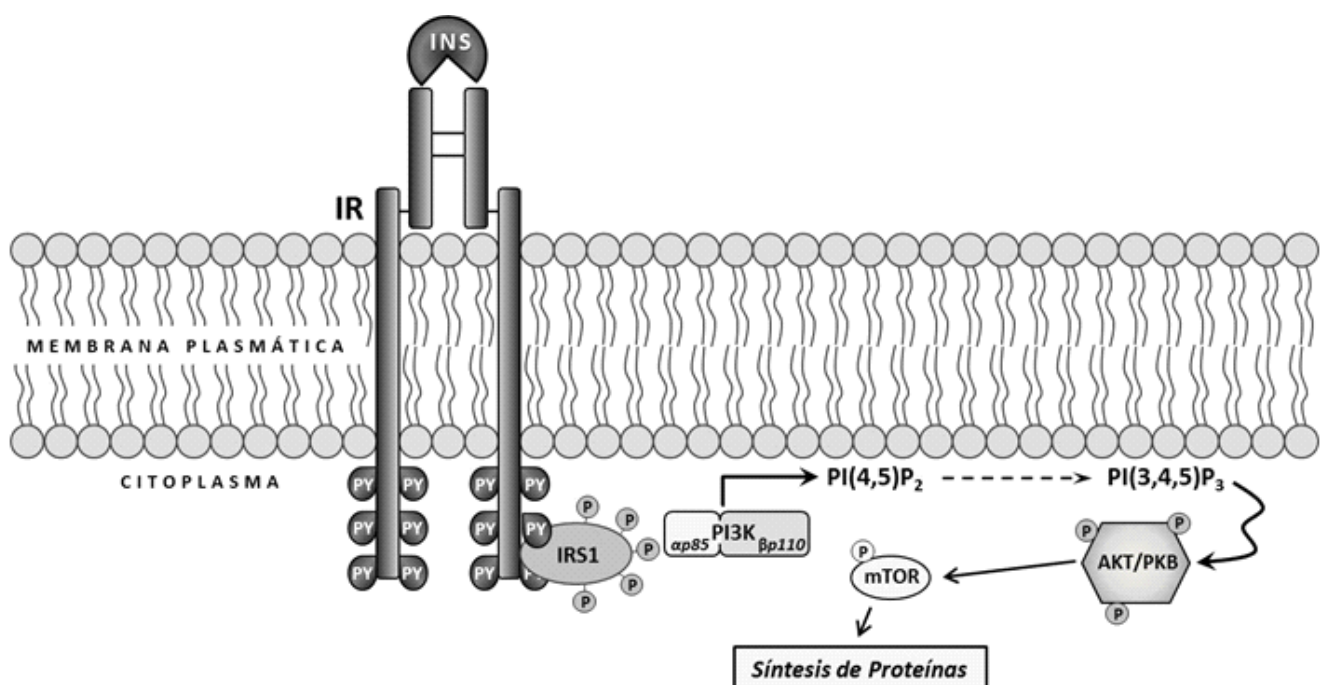


Figura 1. Representación de una de las principales vías de señalización de insulina luego de la unión a su receptor de membrana. INS: insulina, IR: receptor de insulina, IRS1: sustrato del receptor de insulina tipo1, PI3K: fosfatidilinositol-3'-OH-quinasa, PI(4,5)P₂: fosfoinositol-4,5-difosfato, PI(3,4,5)P₃: fosfoinositol-3,4,5-trifosfato, mTOR: blanco en mamíferos de rapamicina, AKT/PKB: proteína quinasa B.

ALTERACIONES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA Y SU RELACIÓN CON TRASTORNOS REPRODUCTIVOS

Numerosas investigaciones han demostrado la presencia de moléculas de la red de insulina (IR, IRS1, PI3K, PKB, mTOR, FoxO, PPAR γ y otros) en los ovarios de diferentes especies de mamíferos (vaca, rata, oveja) necesarios para desencadenar los efectos orquestados por esta hormona (35, 38-41). El rol fundamental de la insulina en otros tejidos ha sido bien documentado (42-45) y su importancia en la reproducción se ha reportado ampliamente (46-49). En humanos, se demostró que las células de la granulosa de los folículos preantrales expresan IR de manera creciente a medida que estos se desarrollan (50). Además se han registrado incrementos del ARNm del IR en ovarios de pacientes con síndrome poliquístico ovárico (PCOS) (51). Por otra parte, en estudios realizados con ratones *knockout* (ratones heterocigotos para dos alelos nulos (IRS1 +/- e IRS2 +/-) se observó que la delección de uno de los integrantes de la familia de IRS compromete la fertilidad de las hembras (52).

Como se mencionó, una causa importante de infertilidad en vacas lecheras es la enfermedad quística ovárica (COD) y en el proceso de formación de los quistes intervienen diferentes factores que contribuyen a la complejidad de la patogénesis (6). En el ovario, la insulina es capaz de modular la respuesta a las gonadotropinas en las células de la granulosa y en consecuencia se la ha asociado con la esteroidogénesis. Se ha demostrado mediante la evaluación de la expresión génica en cultivos celulares la estrecha relación entre los altos niveles de 17 β -estradiol del líquido folicular de folículos preovulatorios y el incremento en la expresión del IR, sugiriendo un rol de la insulina para conducir a los

folículos a la ovulación (53). Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha determinado la disminución en la expresión génica y proteica del IR y la tendencia similar del IRS1 en células de la granulosa de folículos quísticos presentes en ovarios bovinos comparativamente respecto a los folículos terciarios provenientes de ovarios bovinos controles sin COD (Tabla 1). Estos resultados podrían significar la menor respuesta a la insulina en vacas con COD, impidiendo la maduración del folículo, la posterior ovulación y la persistencia folicular (41).

Es conocido que la insulina es capaz de estimular la división y la viabilidad celular luego de su unión al receptor y posterior transducción de señales intracelulares a través de las vías MAPK y PI3K (31). Estos hallazgos sustentan lo demostrado en estudios previos (54, 55) respecto a la disminución en el índice de proliferación de todas las capas celulares en folículos quísticos de animales con COD. Se ha determinado en cultivos de células de la granulosa de rata que la inhibición de la enzima PI3K interrumpe la regulación positiva y/o activación inducida por la FSH, de diferentes marcadores, como mTOR, HIF-1, implicados en la diferenciación folicular y otras proteínas señal que controlan la traducción del ARNm (56). Además, la expresión del IR en cultivos de células de la granulosa bovina resulta estimulada por la hormona FSH (53). Los factores y su regulación, citados previamente, junto a la alteración en la función y regulación del eje hipotálamo-pituitario-gonadal descrito en vacas con COD por Vanholder *et al.* (6), sugieren que las variaciones en los niveles de gonadotropinas durante el desarrollo y crecimiento folicular podrían contribuir con la alteración en la expresión del IR según lo indican nuestros resultados en animales con COD (41). La menor expresión del IR, principalmente en folículos quísticos sugiere que la alteración en los intermediarios de la

vía PI3K podría modificar las funciones ováricas y concuerda con lo reportado en los trabajos de nuestro grupo (27, 28, 57).

El secuestro y la activación de la enzima PI3K intracelular puede inducirse por factores de crecimiento y hormonas (58). En nuestro laboratorio hemos determinado el incremento en los niveles del receptor IGFR1 en vacas con COD, lo cual podría involucrar la participación de la vía PI3K (Rodríguez *et al.*, resultados no publicados). También hemos hallado niveles similares en la expresión de PI3K en folículos quísticos respecto a folículos terciarios de animales sin la enfermedad (Tabla 1). Sin embargo, a pesar de no detectar variaciones de la expresión génica y/o proteica, no pueden descartarse posibles alteraciones de la actividad enzimática. Se pudo determinar un patrón diferente en las células de la teca, donde la expresión proteica de la PI3K fue mayor en folículos terciarios que en quistes (Tabla 1). Al respecto, Palaniappan *et al.* (59)

demonstraron el efecto estimulador de la insulina sobre la proliferación de las células intersticiales de la teca y las proteínas reguladoras del ciclo celular, a través de la vía dependiente de moléculas que incluyen el blanco en mamíferos de rapamicina (mTOR) y que representa el efector corriente abajo del AKT. Es probable que la disminución en la expresión proteica de la PI3K registrada en las células de la teca provenientes de quistes ejerza efecto negativo sobre la respuesta esperada. Por lo tanto, es probable que la alteración en las señales de insulina se traslade a etapas más avanzadas y comprometa la proliferación y el índice de apoptosis de las células de la teca.

Actualmente se estudian diferentes intermediarios cascada abajo de las vías PI3K (AKT, mTOR) y MAPK (ERK1,2) en animales con COD, para lograr dilucidar los mecanismos y las alteraciones que suceden en la red de señales de insulina y sus consecuencias en el desarrollo de la enfermedad.

	Expresión génica		Expresión proteica	
	Granulosa	Teca	Granulosa	Teca
IR	↓	⊥	↓	⊥
IRS1	↓	⊥	⋮	⊥
PI3K	⊥	↓	⊥	↓
AKT	?		?	
mTOR	?		?	

Tabla 1. Expresión de intermediarios de la respuesta a insulina en folículos quísticos respecto a folículos terciarios control. IR: receptor de insulina, IRS1: sustrato del receptor de insulina tipo1, PI3K: fosfatidilinositol-3'OH-quinasa, AKT: proteína quinasa B, mTOR: blanco en mamíferos de rapamicina

CONCLUSIONES

En la presente revisión se analiza la importancia de la insulina y su respuesta inducida por la unión a su receptor específico en el ovario. A partir de dicha unión se activan diferentes intermediarios intracelulares que son moduladores importantes de la funcionalidad ovárica. Particularmente, se destacan los roles de los principales intermediarios en la respuesta a insulina presentes en los folículos ováricos, aportando nueva información acerca de los mecanismos de comunica-

ción intracelular cuyas alteraciones podrían conducir a disfunciones foliculares y consecuentemente, favorecer el desarrollo de la COD.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo fue realizado con subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) PICT 2012-2649 y de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) CAI+D2011(50120110100394).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silvia WJ, Hatler TB, Nugent AM, Laranja Da Fonseca LF (2002) Ovarian follicular cysts in dairy cows: An abnormality in folliculogenesis. *Domest. Anim. Endocrinol.* pp 167-177.
2. Garverick HA (1997) Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 80: 995-1004.
3. Peter AT (2004) An Update on Cystic Ovarian Degeneration in Cattle. *Reprod Domest Anim* 39: 1-7.
4. Cattaneo L, Signorini ML, Bertoli J, Bartolomé JA, Gareis NC, Díaz PU, Bó GA, Ortega HH (2014) Epidemiological description of cystic ovarian disease in argentine dairy herds: risk factors and effects on the reproductive performance of lactating cows. *Reprod Domest Anim* 49: 1028-1033.
5. Royal M, Darwash A, Flint A, Webb R, Woolliams J, Lamming G (2000) Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim Sci* 70: 487-501.
6. Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A (2006) Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 46: 105-119.
7. Bauman DE, Currie WB (1980) Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci* 63: 1514-1529.
8. Llewellyn S, Fitzpatrick R, Kenny DA, Murphy JJ, Scaramuzzi RJ, Wathes DC (2007) Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows. *Reproduction* 133: 627-639.
9. Leroy JLMR, Vanholder T, Van Knegsel ATM, Garcia-Ispuerto I, Bols PEJ (2008) Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: mismatch between metabolism and fertility? *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2: 96-103.
10. Perry RC, Corah LR, Kiracofe GH, Stevenson JS, Beal WE (1991) Endocrine changes and ultrasonography of ovaries in suckled beef cows during resumption of postpartum estrous cycles. *J Anim Sci* 69: 2548-2555.
11. Dobson H, Smith RF (2000) What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci* 60-61: 743-752.
12. Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM (2003) Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 78: 345-370.
13. Bossaert P, Leroy JLMR, De Vliegher S, Opsomer G (2008) Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci* 91: 3363-3371.
14. Vanholder T, Leroy JLMR, Dewulf J, Duchateau L, Coryn M, de Kruif A, Opsomer G (2005) Hormonal and metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian cyst formation or first ovulation post partum. *Reprod Domest Anim* 40: 460-467.
15. Opsomer G, Wensing T, Laevens H, Coryn M, de Kruif A (1999) Insulin resistance: the link between metabolic disorders and cystic ovarian disease in high yielding dairy cows? *Anim Reprod Sci* 56: 211-222.
16. Gutiérrez CG, Campbell BK, Armstrong DG, Webb R (1997) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by bovine granulosa cells in vitro and peripheral IGF-I measurement in cattle serum: an evaluation of IGF-binding protein extraction protocols. *J Endocrinol* 153: 231-240.
17. Spicer LJ, Chamberlain CS, Maciel SM (2002) Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 22: 237-254.
18. Simpson RB, Chase CC, Spicer LJ, Vernon RK, Hammond AC, Rae DO (1994) Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. *J Reprod Fertil* 102: 483-492.
19. Bossaert P, De Cock H, Leroy JLMR, De Campeneere S, Bols PEJ, Filliers M, Opsomer G (2010) Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected in vivo. *Theriogenology* 73: 1210-1219.
20. Landau S, Braw-Tal R, Kaim M, Bor A, Bruckental I (2000) Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. *Anim Reprod Sci* 64: 181-197.

21. Miyoshi S, Pate JL, Palmquist DL (2001) Effects of propylene glycol drenching on energy balance, plasma glucose, plasma insulin, ovarian function and conception in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 68: 29–43.
22. Butler ST, Pelton SH, Butler WR (2004) Insulin increases 17 beta-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction* 127: 537–545.
23. Davoren JB, Kasson BG, Li CH, Hsueh AJ (1986) Specific insulin-like growth factor (IGF) I- and II-binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology* 119: 2155–2162.
24. Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Montoya CA, Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake YI, Schams D, Miyamoto A (2007) Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction* 133: 155–163.
25. Kawashima C, Matsui M, Shimizu T, Kida K, Miyamoto A (2012) Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. *J Reprod Dev* 58: 10–16.
26. Walsh SW, Mehta JP, McGettigan PA, Browne JA, Forde N, Alibrahim RM, Mulligan FJ, Loftus B, Crowe MA, Matthews D, Diskin M, Mihm M, Evans ACO (2012) Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. *Physiol Genomics* 44: 504–517.
27. Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG, Gimeno EJ (2008) Insulin-like growth factor I in sera, ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous or induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci* 84: 419–427.
28. Rey F, Rodríguez FM, Salvetti NR, Palomar MM, Barbeito CG, Alfaro NS, Ortega HH (2010) Insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine cystic ovarian disease. *J Comp Pathol* 142: 193–204.
29. Rodríguez FM, Salvetti NR, Colombero M, Stangaferro ML, Barbeito CG, Ortega HH, Rey F (2013) Interaction between IGF1 and IGFBPs in bovine cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci* 140: 14–25.
30. White MF (1998) The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 182: 3–11.
31. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85–96.
32. Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD (2006) Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* 147: 5178–5186.
33. Baba T, Endo T, Sata F, Honma H, Kitajima Y, Hayashi T, Manase K, Kanaya M, Yamada H, Minakami H, Kishi R, Saito T (2007) Polycystic ovary syndrome is associated with genetic polymorphism in the insulin signaling gene IRS-1 but not ENPP1 in a Japanese population. *Life Sci* 81: 850–854.
34. Seto-Young D, Avtanski D, Strizhevsky M, Parikh G, Patel P, Kaplun J, Holcomb K, Rosenwaks Z, Poretsky L (2007) Interactions among peroxisome proliferator activated receptor-gamma, insulin signaling pathways, and steroidogenic acute regulatory protein in human ovarian cells. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2232–2239.
35. Ortega HH, Rey F, Velazquez MML, Padmanabhan V (2010) Developmental programming: effect of prenatal steroid excess on intraovarian components of insulin signaling pathway and related proteins in sheep. *Biol Reprod* 82: 1065–1075.
36. Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799–806.
37. Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID (1985) The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40: 747–758.
38. Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS (2000) Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 14: 1283–1300.
39. Yen H, Jakimiuk AJ, Munir I, Magoffin DA (2004) Selective alterations in insulin receptor substrates-1, -2 and -4 in theca but not granulosa cells from polycystic ovaries. *10: 473–479.*
40. Lima MHM, Souza LC, Caperuto LC, Bevilacqua E, Gasparetti AL, Zanuto R, Saad MJA, Carvalho CRO (2006) Up-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in the ovary of rats by chronic treatment with hCG and insulin. *J Endocrinol* 190: 451–459.
41. Hein GJ, Panzani CG, Rodríguez FM, Salvetti NR, Díaz PU, Gareis NC, Benítez GA, Ortega HH, Rey F (2015) Impaired insulin signaling pathway in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Anim Reprod Sci* 156: 64–74.
42. Pagliassotti MJ, Kang J, Thresher JS, Sung CK, Bizeau ME (2002) Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E170–176.
43. Pirola L, Bonnafous S, Johnston AM, Chaussade C, Portis F, Van Obberghen E (2003) Phosphoinositide 3-kinase-mediated reduction of insulin receptor substrate-1/2 protein expression via different mechanisms contributes to the insulin-induced desensitization of its signaling pathways in L6 muscle cells. *J Biol Chem* 278: 15641–15651.
44. Hein GJ, Chicco A, Lombardo YB (2012) Fish oil normalizes plasma glucose levels and improves liver carbohydrate metabolism in rats fed a sucrose-rich diet. *Lipids* 47: 141–150.
45. Maeno Y, Li Q, Park K, Rask-Madsen C, Gao B, Matsumoto M, Liu Y, Wu IH, White MF, Feener EP, King GL (2012) Inhibition of insulin signaling in endothelial cells by protein kinase C-induced phosphorylation of p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). *J Biol Chem* 287: 4518–4530.
46. Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE (1995) Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J Anim Sci* 73: 3719–3731.
47. Devoto L, Christenson LK, McAllister JM, Makrigiannakis A, Strauss JF (1999) Insulin and insulin-like growth factor-I and -II modulate human granulosa-lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression. *Mol Hum Reprod* 5: 1003–1010.

48. Silva JM, Hamel M, Sahmi M, Price CA (2006) Control of oestradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by FSH involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *Reproduction* 132: 909-917.
49. Mani AM, Fenwick MA, Cheng Z, Sharma MK, Singh D, Wathes DC (2010) IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction* 139: 139-151.
50. Samoto T, Maruo T, Ladines-Llave CA, Matsuo H, Deguchi J, Barnea ER, Mochizuki M (1993) Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia. *Endocr J* 40: 715-726.
51. Phy JL, Conover CA, Abbott DH, Zschunke MA, Walker DL, Session DR, Tummon IS, Thornhill AR, Lesnick TG, Dumesic DA (2004) Insulin and messenger ribonucleic acid expression of insulin receptor isoforms in ovarian follicles from nonhirsute ovulatory women and polycystic ovary syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3561-3566.
52. Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF (2000) IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 407: 377-382.
53. Shimizu T, Murayama C, Sudo N, Kawashima C, Tetsuka M, Miyamoto A (2008) Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim Reprod Sci* 106: 143-152.
54. Isobe N, Yoshimura Y (2007) Deficient proliferation and apoptosis in the granulosa and theca interna cells of the bovine cystic follicle. *J Reprod Dev* 53: 1119-1124.
55. Salvetti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, Alfaro NS, Rey F, Gimeno EJ, Ortega HH (2010) Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Anim Reprod Sci* 122: 98-110.
56. Alam H, Maizels ET, Park Y, Ghaey S, Feiger ZJ, Chandel NS, Hunzicker-Dunn M (2004) Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain (Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicle. *J Biol Chem* 279: 19431-19440.
57. Amweg AN, Salvetti NR, Stangaferro ML, Paredes AH, Lara HH, Rodríguez FM, Ortega HH (2013) Ovarian localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD): effects of ACTH stimulation and its relationship with bovine cystic ovarian disease. *Domest Anim Endocrinol* 45: 126-140.
58. Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657.
59. Palaniappan M, Menon B, Menon KMJ (2013) Stimulatory effect of insulin on theca-interstitial cell proliferation and cell cycle regulatory proteins through MTORC1 dependent pathway. *Mol Cell Endocrinol* 366: 81-89.