

ROL DE LA L-GLUTAMINA EN LA MODULACIÓN NEUROENDÓCRINA DE LA ACTIVIDAD OVÁRICA Y EL PERFIL HORMONAL EN CABRAS

C. A. Meza Herrera

Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas.
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. meza2000@hotmail.com

RESUMEN. Se evaluó el efecto de la suplementación de corto plazo de aminoácidos excitadores (L-glutamina) sobre la actividad ovárica total (AOT), considerando sus componentes folículos (FT) y cuerpos lúteos (CLT) totales, así como sobre los niveles séricos de la hormona metabólica insulina (INS), de los factores de crecimiento análogos a insulina tipo 1 (IGF-I), así como el patrón de secreción de la hormona luteinizante (LH) y del crecimiento (GH), considerando la pulsatilidad (PULSE) y área bajo la curva (AUC), durante la fase folicular media del ciclo estral en cabras adultas. Adicionalmente se evaluó el efecto de dicha suplementación sobre la actividad lútea, considerando el CLT, el volumen lúteo total (VLT), y la síntesis de progesterona (P4). El estudio se desarrolló en la Unidad de Investigación Caprina Sur, URUZA-UACH, (26° LN y 103° LO, 1,117 msnm) bajo un fotoperiodo decreciente durante octubre a diciembre. Las cabras (n=22, 34 meses de edad) fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos experimentales, 1) Aminoácidos excitadores (AAE, n=10; PV=45.8±4.3Kg), y 2) Control (CONT, n=12; PV=46.2±5.8kg), recibiendo una dieta base de alfalfa heno (14% PC; 1.14 Mcal kg⁻¹ ENm) y ensilado de maíz (8.1% PC; 1.62 Mcal kg⁻¹ ENm), con agua, sales minerales y sombra *ad libitum*. Una vez estroalmente sincronizadas, el grupo AAE recibió una infusión endovenosa de 7 mg kg⁻¹ PV de L-glutamina los días 1, 9, 14 y 17 post-estro, mientras que el grupo control recibió solución salina. Los promedios generales para FT, CLT y AOT fueron 4.5, 3.03 y 7.47, respectivamente. El grupo AAE mostró un mayor número de FT (P<0.03) sin diferencias en CLT (P>0.8) con respecto al CONT, e incrementos en la AOT (P=0.05) en favor de AAE. Los niveles séricos de GH, IGF-1, y el patrón de secreción de GH y LH (PULSE y AUC) no difirieron (P>0.6) entre tratamientos. Sin embargo, los niveles de INS fueron mayores (P=0.03) en el grupo AAE. Los promedios globales para CLT, VLT y P4 fueron 3.03, 2,180.3 mm³, y 4.88 ng mL⁻¹, respectivamente, sin diferencias (P>0.05) entre tratamientos. La suplementación de AAE afectó positivamente la actividad del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal, dando por resultado un incremento en la actividad ovárica total en cabras en la fase final de un fotoperíodo decreciente. El comportamiento homogéneo entre tratamientos con respecto al perfil de secreción de LH, sugiere que el AAE-L-glutamina ejerció un efecto positivo sobre el estado metabólico de las cabras reflejado en una mayor liberación de INS. Dicho escenario metabólico pudo haber generado un efecto directo sobre los diferentes componentes celulares del ovario, activando un mayor reclutamiento o selección foliculares, o reduciendo los niveles de atresia folicular.

Palabras clave: Cabras, aminoácidos excitadores, actividad ovárica, hormonas metabólicas.

SUMMARY. This study aimed to determine the effect of a short term supplementation of excitatory aminoacids (AAE; L-glutamine) upon ovarian activity considering the components total follicles (FT) and corpus luteum (CLT) numbers as well as the serum leves of the metabolic hormones insulin (INS), insulin-like growth factors (IGF-I), and the secretion pattern of the luteinizing hormona (LH) and growth hormona (GH) considering pulsatility (PULSE) and area under the curve (AUC), during the middle follicular phase of the estrous cyclen in adult goats. Additionally, there was evaluated the effect of AAE supplementation upon luteal activity considering CLT numer, total luteal volume (VLT), as well as progesterona síntesis (P4). The study was carried out in the Southern Goat Research Unit, URUZA-UACH, (26° NL & 103° WL, at 1,117 masl) under a decreasing photoperiod during october to december. Goats (n=22, 34 mo.) were randomly distributed to one of two experimental groups: 1) Excitatory aminoacids (AAE, n=10; LW=45.8±4.3Kg), and 2) Control (CONT, n=12; LW=46.2±5.8kg), receiving a basal diet of alfalfa hay (14% CP; 1.14 Mcal kg⁻¹ NEM) and corn silage (8.1% CP; 1.62 Mcal kg⁻¹ NEM), with water, mineral salt and shades *ad libitum*. Once estrually synchronized, the AAE group received an i.v. infusión of 7 mg kg⁻¹ LW of L-glutamine the days 1, 9, 14 y 17 postestrus, while the CONT group received an i.v. infusión of saline. General averages for FT, CLT and AOT were 4.5, 3.03 y 7.47, respectively. The AAE-group depicted a greater number of FT (P<0.03) without differences in CLT (P>0.8) with respect to the CONT-group, and increases in the AOT (P=0.05) favoring the AAE-group. The serum concentrations of GH, & IGF-1, as well as the secretion pattern of GH & LH (PULSE & AUC) did not differ (P>0.6) between treatments. Nonetheless, the serum INS levels were augmented (P=0.03) in the AAE-group. Global averages for CLT, VLT and P4 were 3.03, 2,180.3 mm³, and 4.88 ng mL⁻¹, respectively, without differences (P>0.05) between treatments. The AAE supplementation positively affected the activity of the hypothalamic-hypophyseal-ovarian axis, generating an increased ovarian activity in goats during the final phase of a decreasing photoperiod (photoinductive of ovarian activity). The homogeneous performance between treatments regarding the release pattern of LH, suggest that AAE-L-glutamina supplementation exerted a positive effect upon the metabolic status of goats reflected in an increased release of INS. Such metabolic scenario could had generated a direct effect upon the different celular components of the ovary, activating an increased follicular recruitment and selection, and (or) a reduction in follicular atresia in the AAE-L-glutamina supplemented goats.

Key words: Goats, excitatory aminoacids, ovarian activity, metabolic hormones.

INTRODUCCIÓN

En mamíferos, la eficiencia reproductiva de las hembras depende de las respuestas ováricas a las secreciones hipofisarias promovidas por el hipotálamo, las cuales a su vez pueden ser moduladas por el estado metabólico del animal (Gutierrez, 2001; López *et al.*, 2001; Meza-Herrera *et al.*, 2002 a y b; Meza-Herrera, 2003 a y b; Meza-Herrera *et al.*, 2004; Kakar *et al.*, 2005; Meza-Herrera *et al.*, 2005). Por lo anterior, una inadecuada nutrición es caracterizada por un deficiente perfil endocrino, tanto gonadotrópico como metabólico, lo cual compromete la función reproductiva, generando retrasos en el inicio de la pubertad, ciclos de estrales irregulares y una baja global en la eficiencia reproductiva (Dunn y Moss, 1992; Popwell *et al.*, 1994; Smith, 1988; Meza-Herrera *et al.*, 2002 a y b; Meza-Herrera, 2003; Meza-Herrera *et al.*, 2003 a y b; Meza-Herrera *et al.*, 2004; Kakar *et al.*, 2005; Meza-Herrera *et al.*, 2005).

La comunicación endocrina hipotálamo-hipofisaria puede ser favorecida por la acción de ciertos compuestos que actúan como neurotransmisores, cuya actividad puede incrementarse mediante la suplementación de aminoácidos excitadores (AAE) (Chang *et al.*, 1993; Brann y Mahesh, 1995; Meza-Herrera *et al.*, 2005). Los AAE son considerados los principales neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC) al mediar la excitación sináptica dentro del cerebro (Urbanski *et al.*, 1994). El glutamato es reconocido como un aminoácido excitador que afecta diversos procesos fisiológicos debido a la existencia de un gran número de subtipos de receptores a glutamato en el SNC (Brann, 1995).

La activación de los receptores a AAE ha sido implicada en varios procesos fisiológicos que incluyen aspectos de aprendizaje (McDonald y Johnston, 1990) hasta la activación del eje reproductivo durante la pubertad y durante la etapa adulta (Urbanski y Ojeda, 1990). El efecto de los AAE sobre el eje reproductivo pareciera ser particularmente importante en animales que muestran una reproducción estacional ya que, en roedores, el agonista del receptor para AAE, N-metil-D-aspartato (NMDA), puede activar los neurones LHRH. En turno, los AAE causan la liberación de gonadotropinas, aún en roedores mantenidos en un arresto reproductivo motivado por un efecto inhibitorio de fotoperiodos de días cortos (Urbanski, 1990; Urbanski y Pierce, 1992).

En el mismo sentido, las interacciones del eje somatotrópico cuyos componentes endocrinos incluyen a la hormona del crecimiento (GH), los factores de crecimiento análogos a insulina tipos I y II (IGF-I y IGF-II), así como las proteínas enlazadoras de IGF (IGFBP),

juegan un rol esencial en la función ovárica (Barb *et al.*, 1996). En la mayoría de los mamíferos tanto los IGF-1 como la insulina estimulan la proliferación de las células de la teca y de la granulosa, así como la mitogénesis y el sinergismo con las gonadotropinas para estimular la esteroidogénesis ovárica y lograr la formación de folículos preovulatorios (Davidson *et al.*, 2002).

El reconocimiento materno de la preñez (RMP), el cual involucra el establecimiento de un diálogo bioquímico entre el conceptus y su madre para proveer la síntesis y liberación de progesterona (P4), es otro aspecto importante que define la eficiencia reproductiva en mamíferos (Roberts *et al.*, 1996; Meza-Herrera, 2003). En cabras, el mantenimiento de la preñez depende de la secreción de P4 por parte del cuerpo lúteo. A su vez el mantenimiento de la función lútea depende de un óptimo balance de factores luteotrópicos (v.g. LH) y luteolíticos (v.g. PGF_{2α}) (Ford *et al.*, 1996; Dinny y Christine, 1997). Los AAE controlan la secreción de LH vía efectos regulatorios ejercidos sobre la secreción hipotalámica de GnRH (Estienne *et al.*, 1991). Por ello, el control de los AAE sobre la secreción de LH pudiera extenderse hasta el tejido lúteo y modular, mediante un efecto indirecto, la secreción de P4, facilitando de esta forma el establecimiento del RMP.

Los objetivos planteados en el presente estudio fueron evaluar la actividad ovárica total en cabras, considerando el número de folículos y cuerpos lúteos, en respuesta a la suplementación de glutamato. Adicionalmente se consideró la evaluación del perfil endócrino preovulatorio de las hormonas del eje somatotrópico (GH-IGF-1), el patrón de secreción de LH y de la hormona metabólica insulina en respuesta a la suplementación de glutamato y su relación con la actividad ovárica total. Finalmente, se evaluó el efecto de la suplementación de glutamato sobre la actividad lútea, considerando el número de cuerpos lúteos, el volumen lúteo total así como las concentraciones séricas de progesterona.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización del área. El estudio se realizó en la Unidad de Experimentación Caprina Sur, de la URUZA-UACH, localizada entre los 26° LN y 103° LO, a una altitud de 1,117 m, clima cálido-seco BW, y promedios anuales de precipitación y temperatura de 217.1 mm, y 22.3°C, respectivamente.

Formación de grupos experimentales. Se utilizaron cabras encastadas hacia Saanen y Alpina, con promedios de edad y peso vivo de 34 meses y 46.01±5.05 kg, respectivamente. Las cabras recibieron una dieta base de alfalfa heno (14% PC; 1.14 Mcal kg⁻¹ ENm) y ensilado de maíz (8.1% PC; 1.62 Mcal kg⁻¹

ENm) en cantidades para cubrir el 100% de sus requerimientos nutricionales ajustados al PV (NRC, 1981). Agua, sales minerales y sombra fueron ofrecidas *ad libitum*, recibiendo el heno por la mañana (0700) y el ensilado por la tarde (1800), bajo condiciones naturales ambientales durante Octubre a Diciembre, 2004.

Diseño de tratamientos, sincronización del estro, y preparación de soluciones. Las cabras (n=22) fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos con PV y condición corporal (CC) homogéneos. A cada grupo le fue asignado uno de dos tratamientos: 1) Grupo Aminoácidos Excitadores (**AAE**, n=10; PV=45.8±4.3 kg), recibiendo infusiones endovenosas de 7 mg kg⁻¹ PV de L-glutamina (C₅H₁₀N₂O₃, Merck, Germany) los días 1, 9, 14 y 17 después del estro, y 2) Grupo Control, (**CONT**, n=12; PV=46.2±5.8 kg), quienes recibieron una aplicación de solución salina por vía endovenosa de 0.0875 mL kg⁻¹ PV para homogenizar las condiciones respecto al grupo AAE.

Previo a los tratamientos, las cabras fueron estrualmente sincronizadas mediante esponjas intravaginales impregnadas con progesterona (Intervet). Después de transcurridos nueve días, se retiraron las esponjas y se aplicó 1 mL cabra⁻¹ (0.075 mg) de cloprostenol (Prosolvin-C) el cual es un análogo a la prostaglandina F_{2a}. Se pesaron 4 g de L-glutamina (Merck) en una balanza analítica y se disolvieron en 50 mL de agua destilada estéril. Para facilitar este paso, se combinó la L-glutamina y el agua destilada en cantidades pequeñas agitando vigorosamente hasta disolver el soluto. Posteriormente se procedió a llevar la solución a pH neutro con HCl 0.1N. Todo el proceso de preparación de la solución se llevó a cabo en ambiente estéril. La solución preparada contenía 80 mg de L-glutamina mL⁻¹.

Análisis ultrasonográfico de la actividad ovárica.

Una vez sincronizadas, el día 17 posterior a la segunda ovulación, la AOT fue determinada mediante un estudio ultrasonográfico transrectal mediante el uso de un equipo Toshiba para uso veterinario (Toshiba Medical Systems, Ltd, Crawley, UK), con un transductor lineal de 7.5 Mhz. Se aplicó gel obstétrico (Lubrel, Arnolds Veterinary Products, Ltd. USA) al transductor, el cual se colocó dentro de un preservativo de látex estéril aplicando nuevamente gel obstétrico sobre el preservativo como lubricante. El transductor se introdujo en el recto del animal, avanzándose hasta la línea media del recto, con el rastreado dirigido hacia la parte ventral del animal hasta que la vejiga y el útero fueron identificados (Griffin y Ginther, 1992). Una vez localizadas ambas estructuras, se realizaron una serie de rotaciones bilaterales, mientras que el transductor fue movido en

dirección caudal hasta que ambos ovarios fueron localizados. El número de folículos mayores y menores a 5 mm., folículos totales y número de cuerpos lúteos totales presentes en cada ovario, fueron registrados así como fotografiados. Las evaluaciones ultrasonográficas fueron realizadas por un especialista en imagen quien desconocía cualquier información previa de las cabras (Griffin y Ginther, 1992; Dickie *et al.*, 1999).

Muestreo sanguíneo intensivo. Una vez ocurrida la primera ovulación, después de transcurrida la fase lútea y hacia la fase folicular media, en forma aleatoria fueron seleccionadas cinco cabras por tratamiento, para llevar a cabo un muestreo intensivo de sangre. Las muestras sanguíneas fueron colectadas de cada cabra por un período de 6 h a intervalos de 15 min mediante punción de la yugular utilizando agujas estériles de 0.8 x 38 mm (Precision Glide™, Becton & Dickson, NJ, USA) y tubos colectores estériles Vacutainer de 10 mL (Corvac, Sherwood Medical, St Louis, MO). Una vez en el laboratorio, las muestras se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente hasta observarse la formación del coágulo. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (1,500 x g, 15 min) y cada muestra de suero con su replica fue colectada y almacenada en microtubos de polipropileno de 1.5 mL (Axygen^{MR} Scientific, Inc., Union City, CA, USA) y almacenadas a -20°C. Todas las determinaciones endocrinas que se detallan a continuación, fueron realizadas en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Estatal de Nuevo Mexico, EUA.

Cuantificación de las hormonas del eje somatotrópico.

En total se colectaron 25 muestras por cabra, 125 muestras por tratamiento, y un total de 250 muestras de suero originales, para análisis de GH y IGF-I. Todas las muestras de suero colectadas durante el muestreo intensivo fueron evaluadas por su contenido de GH mediante RIA según los procedimientos señalados por Hoefler y Hallford (1987), con un coeficiente de variación (CV) intra-ensayo de 9.4% y un límite de detección de 0.2 ng mL⁻¹. Mientras que el área bajo la curva para GH (GH-AUC) fue determinada utilizando el procedimiento de sumatoria trapezoidal, la pulsatilidad de GH fue determinada mediante el programa Cluster para Análisis de Pulsos considerando un CV de 16.2%, 0.95 desviaciones estándar y un límite de detección de 2.15 ng (Veldhuis y Johnson, 1986). Debido a que los IGF-I no muestran un patrón de secreción pulsátil, las muestras colectadas a intervalos de 120 min (3 muestras por cabra) fueron evaluadas mediante RIA por su contenido de IGF-1 de acuerdo a los procedimientos señalados por Berrie *et al.*, (1995). En total se analizaron tres muestras por cabra, 15 por

tratamiento, para un total de 30 muestras de suero originales, observando CV intra-ensayo de 10% y un límite de detección de 0.2 ng mL⁻¹.

Cuantificación de las hormonas luteinizante e insulina. Una vez ocurrida la ovulación hacia la fase folicular intermedia (d19), en forma aleatoria fueron seleccionadas cinco cabras por tratamiento para realizar un muestro intensivo de sangre. Las muestras sanguíneas fueron colectadas de cada cabra, colectando un total de 25 muestras por cabra, 125 muestras por tratamiento, con un total de 250 muestras originales de suero. Todas las muestras de suero fueron evaluadas por su contenido de LH mediante RIA según los procedimientos señalados por Hoefler y Hallford (1987), con un CV intra-ensayo del 16% y un límite de detección de 0.2 ng mL⁻¹. Mientras que el área bajo la curva para LH (LH-AUC) fue determinada utilizando un procedimiento de sumatoria trapezoidal, la pulsatilidad de LH fue determinada mediante el programa Cluster para Análisis de Pulsos (Veldhuis y Jhonson, 1986). Debido al patrón de secreción no-pulsátil de INS, las muestras colectadas a intervalos de 60 min fueron evaluadas por su contenido de INS, de acuerdo a los procedimientos señalados por Sanson y Hallford (1984). En total se obtuvieron 7 muestras por cabra, 35 por tratamiento, para un total de 70 muestras originales de suero, observando un CV intra-ensayo de 10% con un límite de detección de 0.5 ng mL⁻¹.

Muestreo sanguíneo intermitente y cuantificación de progesterona. Una vez sincronizadas, las cabras fueron muestreadas los días 4, 8, 12, y 17 después del segundo estro. En total se colectaron 4 muestras por cabra, 40 (AAE) y 44 (CONT) muestras por tratamiento, con un total de 84 muestras de suero originales. Las concentraciones séricas de P4 fueron determinadas mediante el uso de un kit comercial de RIA de fase sólida (Diagnostic Products, Corp., USA), según los procedimientos señalados por Schneider y Hallford (1996). El CV intra-ensayo fue 7.5%, con un porcentaje de recuperación de 107.0, y nivel de detección de 30 pg mL⁻¹.

Análisis ultrasonográfico y determinación del número y volumen de cuerpos lúteos. El d-18 posterior a la segunda ovulación se realizó un análisis ultrasonográfico transrectal para evaluar la actividad lútea. Se utilizó un equipo Toshiba Medical Systems (Lubrel, Arnolds Veterinary Products, Ltd. USA) con transductor lineal de 7.5 Mhz para uso veterinario. Los de CLT presentes en cada ovario fueron registrados y medidos mediante la técnica sugerida por Dickie *et al.*, (1999). Una vez obtenidos los diámetros mayor y menor, se calculó el volumen lúteo total (VLT) mediante la fórmula:

$$VLT = (4/3 \pi \times R^3) \times CLT$$

Donde:

$$\begin{aligned} p &= 3.1416. \\ R^3 &= \text{Radio de los cuerpos lúteos.} \\ CLT &= \text{número de cuerpos lúteos.} \end{aligned}$$

Análisis estadísticos. Los PV, CC, AOT (FT & CLT) así como el VLT fueron evaluados mediante un ANOVA dentro de un diseño completamente al azar (DCA) con dos tratamientos y 10-12 repeticiones por tratamiento (Snedecor y Cochran, 1967). Las concentraciones séricas GH, IGF-1, LH, INS, y P4 fueron evaluadas mediante ANOVA-DCA con un arreglo de parcelas para muestras repetidas en un mismo animal a través del tiempo (Gill y Hafs, 1971). El efecto de tratamientos fue incluida en la parcela mayor utilizando el término cabra dentro de tratamiento para calcular el error. El tiempo de muestreo y la interacción del tratamiento x tiempo fueron incluidos en la parcela menor, y fueron probadas utilizando el cuadrado medio residual. En el caso de valores significativos de F, la separación de medias consideró la opción LSMEANS-PDIFF, del PROC GLM. Los análisis estadísticos consideraron el uso del SAS (Littell *et al.*, 1991). Los valores reportados se definen como medias de mínimos cuadrados \pm error estándar.

RESULTADOS

Tanto los PV al inicio (PVI, 45.2 kg) y final (PVUS, 44.6 kg) así como la CC al inicio (CCI, 3.0) y final (CCUS, 3.3) del experimento no difirieron ($P > 0.05$) entre tratamientos. El promedio general para FT fue 4.5 ± 0.6 , observando el mayor número de FT ($P < 0.05$) en las cabras-AAE. El promedio general para CLT fue 3.03 ± 0.2 , no existiendo diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos para dicha variable. El promedio global para la AOT fue 7.47 ± 0.6 , el cual favoreció ($P = 0.05$) al grupo AAE (Cuadro 1).

Los resultados del presente estudio mostraron que cabras tratadas con infusiones de AAE mostraron una mayor actividad ovárica total. En el Cuadro 2 se muestran las medias de las concentraciones séricas (ng mL⁻¹) de GH e IGF-I, así como el área bajo la curva (GH-AUC) y los pulsos (GH-PULSE) de GH observados durante un período de 6h. Tanto los niveles séricos de GH e IGF-1, así como el patrón de secreción de GH (PULSE-GH y AUC-GH) no difirieron ($P > 0.05$) entre tratamientos.

En el Cuadro 3, se concentran las medias para las variables peso vivo, condición corporal, actividad ovárica

total, niveles séricos de LH e INS, así como el patrón de secreción de LH de las cabras en estudio. No se observaron diferencias ($P>0.05$) entre tratamientos respecto a la concentración sérica de LH, LH-AUC, ó LH-PULSE. En cuanto a la concentración de INS, los

resultados difirieron ($P=0.03$) entre grupos experimentales en favor del grupo AAE.

Los valores promedio para CLT, VTOL y los niveles séricos de P4 se reportan en el Cuadro 4. Los promedios

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados para folículos totales (FT), cuerpos lúteos totales (CLT) y actividad ovárica total (AOT), todas en unidades, en cabras suplementadas con aminoácidos excitadores (AAE) y sin suplementación (CONT) bajo fotoperíodo decreciente en la Comarca Lagunera (26° LN)

	AAE	CONT	NSO ¹	EE ²
FT	5.3 ^a	3.5 ^b	0.03	0.61
CLT	2.9 ^a	2.8 ^a	0.8	0.22
AOT	8.2 ^a	6.3 ^b	0.05	0.61

¹ Nivel de significancia observado.

² EE, error estándar de medias de mínimos cuadrados más conservador.

Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados para actividad ovárica total (AOT, unidades), nivel sérico de GH (ng mL⁻¹), pulsos (GH-PULSE, unidades) y área bajo la curva (GH-AUC, unidades²) de GH, y nivel sérico de IGF-I (ng mL⁻¹), en cabras en fase folicular media suplementadas con aminoácidos excitadores (AAE) y cabras control (CONT) bajo fotoperíodo decreciente en la Comarca Lagunera (26° LN)

	AAE	CONT	NSO ¹	EE ²
AOT	8.2	6.3	0.05	0.6
GH	14.36	14.36	1.00	1.00
GHAUC	5245.9	5235.7	0.98	369.8
GHPULSE	1.6	1.2	0.63	0.5
IGF-I	298.4	248.2	0.24	28.9

¹ Nivel de significancia observado

² Error estándar de la media

Cuadro 3. Medias de mínimos cuadrados para peso vivo (PV, kg); condición corporal (CC, unidades); actividad ovárica total (AOT, unidades); niveles séricos (LH, ng mL⁻¹), área bajo la curva (LH-AUC, unidades²) y pulsos (LH-PULSE, unidades) de LH y niveles séricos de insulina (INS, ng mL⁻¹) en cabras suplementadas con aminoácidos excitadores (AAE) y sin suplementación (CONT) bajo fotoperíodo decreciente en la Comarca Lagunera (26° LN)

Variables	AAE	CONT	NSO ¹	EE ²
PV	43.9	45.3	0.8	1.4
CC	3.3	3.3	0.7	0.08
AOT	8.2	6.3	0.05	0.61
LH	4.6	5.3	0.58	0.8
LH-AUC	1 682.8	1 926.0	0.59	316.1
LH-PULSE	3.8	3.8	1.00	0.52
INS	5.7	3.9	0.03	0.5

¹ Nivel de significancia observado

² EE, error estándar de medias de mínimos cuadrados más conservador.

Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados de cuerpos lúteos totales (CLT, unidades), volumen lúteo total (VLT, mm²) y niveles séricos P4 (ng mL⁻¹), en cabras suplementadas con aminoácidos excitadores (AAE) y sin suplementación (CONT) bajo fotoperíodo decreciente en la Comarca Lagunera (26° LN)

	AAE	CONT	E. E ¹	NSO ²
CLT	2.9	2.8	0.22	0.80
VLT	2066.0	2444.0	543.1	0.90
P4	4.6	4.5	0.37	0.80

¹ EE, error estándar de medias de mínimos cuadrados más conservador

² Nivel de significancia observado.

Cuadro 5. Medias de mínimos cuadrados de la concentración sérica de progesterona (P4, ng mL⁻¹), los días 4, 8, 12 y 16 postovulación en cabras suplementadas con aminoácidos excitadores (AAE) y sin suplementación (CONT) bajo fotoperíodo decreciente en la Comarca Lagunera (26° LN)

	Tiempo después de la ovulación				E. E.	NSO
	4	8	12	16		
Global	2.0	5.2	6.7	5.5	0.4	0.04
AAE	1.9	5.6	7.0	4.0	0.7	0.01
CONT	2.5	4.0	5.9	5.5	0.6	0.01

¹ EE, error estándar de medias de mínimos cuadrados más conservador

² Nivel de significancia observado.

globales para CLT y VLT fueron, respectivamente, 3.0±0.2 y 2162±543 mm³, no existiendo diferencias (P=0.09) entre grupos experimentales para dichas variables. La concentración sérica promedio de P4 fue 4.8±0.3 ng mL⁻¹, la cual no difirió (P>0.05) entre tratamientos. Sin embargo, el perfil de secreción de P4 difirió (P<0.05) a través del tiempo, con incrementos lineales hasta el d12 de la fase lútea, para mostrar un decremento hacia el d 17. Dicho patrón de secreción de P4 mostró el mismo comportamiento tanto entre como dentro de tratamientos (Cuadro 5). La dinámica de secreción de P4 en el presente estudio es coincidente con la dinámica de secreción de P4 durante la fase lútea reportada por Niswender *et al.*, (2000).

DISCUSION

Aunque los efectos de la administración de agonistas de AAE sobre la actividad ovárica no ha sido estudiada, particularmente el desarrollo folicular ó la tasa ovulatoria, su acción sobre la síntesis y liberación de ciertas hormonas si ha sido abordado. En porcinos, la administración de NMDA incrementó la secreción de LH en animales adultos (Sesti y Britt, 1992) y prepúberes (Estienne *et al.*, 1995). Posteriormente, Estienne *et al.* (1998), demostraron un incremento en la pulsatilidad de LH (fase lútea), así como en los niveles de cortisol y GH en porcinos tratadas con NMDA, esto último independientemente de la fase de ciclo estral de las hembras.

Interacción entre AAE, el eje somatotrópico y la función ovárica. La nutrición es uno de los factores que condicionan los niveles circulantes de GH. De acuerdo a Foster *et al.* (1989), los niveles de GH en ovejas ovariectomizadas fueron altos en ovejas expuestas a una restricción alimenticia, mientras una baja concentración de GH se presentó en ovejas con altos niveles de alimentación. En el presente estudio, dicho efecto queda descartado ya que los niveles de GH no difirieron entre tratamientos, además de que la alimentación ofrecida a las cabras en estudio cubrió el 100% de los requerimientos nutricionales. La GH juega papel importante en el crecimiento folicular al inicio de

la etapa independiente de gonadotropinas y pudiera tener un efecto inhibitorio sobre la apoptosis o muerte celular programada que tiende a incrementar el proceso de atresia folicular. En el mismo sentido, la GH promueve la secreción de estradiol, IGF-I, oxitocina, IGBBP-3, con lo cual la GH regula en cierta medida la apoptosis folicular (Sirotkin y Makarevich, 1999).

Estudios realizados tanto en monogástricos como en rumiantes han reportado incrementos en los niveles plasmáticos de GH mediante la administración de aminoácidos excitadores. En ovejas se observaron incrementos en la secreción de GH mediante la administración intravenosa de n-methyl-D,L-aspartate (NMDA), un potente agonista de glutamato y aspartato (Estienne *et al.*, 1990) así como en cerdas (Estienne *et al.*, 1996). El efecto de los AAE sobre la producción de GH, y por consiguiente sobre IGF-I, puede estar influenciado por la dosis de aplicación, el estado productivo del animal en incluso de la especie en estudio (Estienne *et al.* 1990).

La estimulación del factor liberador de GH (GHRF) del núcleo arqueado (ARC) pareciera ser el principal mecanismo de acción de NMDA para liberar GH. En efecto, 1) La liberación de GH dependiente de NMDA puede ser bloqueada con anticuerpos de GHRF, 2) La destrucción del ARC, donde residen los cuerpos celulares neurales de GHRF, inhibe la capacidad de NMDA para inducir la liberación de GH, y 3) El uso de antagonistas del receptor de NMDA reduce los niveles de RNAm de GHRF mientras los niveles de RNAm de somatostatina no son afectados (Darrel *et al.*, 1997).

Aunque la suplementación de AAE en el presente estudio no promovió diferencias con respecto a la función del eje somatotrópico, pudo afectar alguna otra señal endocrina, ya sea gonadotrópica o metabólica, u otra ruta neuroendocrina no dependiente de la acción del eje somatotrópico GH-IGF-1. Alternativamente, la suplementación de glutamato exógeno pudo potencialmente haber ejercido un efecto directo sobre los diferentes componentes celulares del ovario cuyas señales autocrinas o paracrinas pudieron haber

generado un mayor reclutamiento y(o) selección foliculares, paralelo a una posible reducción en el nivel de atresia folicular en las cabras suplementadas.

Interacción entre los AAE, la hormona luteinizante, la hormona metabólica insulina y la actividad ovárica. Mientras la AOT difirió ($P=0.05$) entre tratamientos, las variables PV, CC ó el patrón de secreción de LH no difirieron ($P>0.05$). Sin embargo, al igual que en la AOT, los niveles séricos de INS favorecieron ($P<0.05$) a las cabras-AAE. Varios factores pueden alterar el efecto promotor de los AAE sobre la secreción de LH, como son la dosis empleada, el estado reproductivo y la edad de la hembra (Sesti y Britt, 1992; Lee *et al.*, 1993).

De acuerdo a Estienne *et al.* (1998), el tratamiento con NMA ($10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV}$) incrementó un 125% la frecuencia pulsátil de LH en cerdas en fase lútea, mientras que en cerdas ovariectomizadas la NMA decreció los niveles de LH en 48% y suprimió su pulsatilidad en 33%. El estradiol puede actuar sobre la hipófisis bloqueando el efecto de los AAE sobre los incrementos de LH. Según Sesti y Britt (1992), en hembras pre-tratadas con benzoato de estradiol, el NMA evocó un incremento la LH en 69% así como el AUC de LH. El efecto de NMA sobre la liberación de gonadotropinas depende de la dosis utilizada ya que Sesti y Britt (1992) reportaron que la administración i.v. de NMA en dosis de 1.5 y $3.0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV}$ no afectó la concentración media de LH, mientras que niveles de $5.0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV}$ i.v., generaron un incremento en LH del 114%.

Incrementos en los niveles de insulina mediante la infusión intravenosa de glucosa aumenta la tasa de ovulación (Bucholtz *et al.* 1988). Los resultados del presente estudio sugieren que el incremento en la AOT e INS por efecto de los AAE pudo ser mediado por una ruta metabólica dependiente de insulina, sugiriendo incrementos en al número de receptores a LH en el ovario, independientemente del nivel de LH. Tanto insulina como IGF-I muestran efectos directos sobre el ovario, estimulando la proliferación de las células de la granulosa y la producción de progesterona. Además de una acción reguladora de los niveles de glucosa, la insulina parece promover un efecto directo sobre la función ovárica en ovejas (Gong *et al.*, 1993; Spicer *et al.*, 1993). Tanto las células de la granulosa, teca y lúteas contienen receptores para insulina e IGF-1, los cuales parecen mediar los efectos de estas dos hormonas sobre la función celular (Spicer y Echterkamp, 1995).

Interacción entre los AAE, cuerpos lúteos totales, volumen lúteo total y síntesis de progesterona. Ping *et al.* (1997) reportaron que la aplicación de AMPA, un agonista de glutamato, estimuló la liberación de GnRH en fragmentos del hipotálamo medio basal en ratas así como de LH. A su vez, la síntesis de P4 es estimulada por LH a través de la proteína Kinasa A, cuando LH se liga a su receptor en la membrana citoplasmática, activa PK-A y, en turno, la enzima citocromo P450 convierte el colesterol a pregnenolone, el cual es convertido a P4 por la enzima 3 β -hidroxysteroidoide-deshidrogenasa/ $\Delta^5,4$ isomerasa en el retículo endoplasmático liso (Niswender *et al.*, 2000).

Lo anterior supondría un posible efecto de la administración de AAE sobre la síntesis y secreción de P4 durante la fase lútea del ciclo estral. Sin embargo, el presente estudio no mostró evidencia de que la incorporación de AAE mostrara un efecto positivo sobre los niveles séricos de P4 durante la fase lútea del ciclo estral. Se observaron dos correlaciones globales significativas: PV y CC ($r=0.61$; $P=0.001$) así como PVUS y VLT ($r=0.46$; $P=0.001$). Las correlaciones observadas dentro del grupo AAE incluyeron a PVUS y CCUS ($r=0.84$; $P=0.02$), así como CCUS y CLT ($r=0.55$; $P=0.09$). En el grupo CONT se correlacionaron PVUS y CCUS ($r=0.57$; $P=0.05$) así como PVUS y CLT ($r=0.43$; $P=0.03$).

CONCLUSIONES

La aplicación endovenosa de $7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PV}$ de L-glutamina los días 1, 9, 14 y 17 post-estro incrementó la actividad ovárica total (FT y AOT) en cabras adultas de la Comarca Lagunera (26°LN). Aunque dicha suplementación no promovió diferencias con respecto a la función del eje somatotrópico, pudo afectar alguna otra señal endocrina, ya sea gonadotrópica o metabólica, u otra ruta neuroendocrina no dependiente del la acción del eje somatotrópico GH-IGF-1.

La aplicación de AAE incrementó los niveles séricos de insulina, sin alterar los niveles de la LH, con incrementos paralelos en la actividad ovárica total. La insulina podría ejercer efectos directos a nivel ovárico promoviendo la proliferación celular de la teca y la granulosa, aumentando la esteroidogénesis, potenciando la activación de receptores a LH, ó promoviendo el desarrollo folicular, sin incrementos en los niveles de LH.

Los promedios globales para cuerpos lúteos totales, volumen lúteo total y la concentración sérica de P4 fueron 3.03 , $2,180.3 \text{ mm}^3$, y 4.88 ng mL^{-1} , respectivamente, sin diferencias entre tratamientos. La suplementación

de AAE no mostró una mayor eficiencia en los diferentes componentes celulares lúteos y(o) en la función de los grupos enzimáticos que definen la ruta esteroidogénica (P4). Futuros estudios deberán evaluar el posible rol que la suplementación de aminoácidos neuroexcitadores pueda ejercer sobre la expresión de ciertas hormonas ya sea de origen metabólico o gonadotrópico las cuales, en turno, puedan promover un efecto positivo sobre la función del eje hipotálamo-hipofisiario gonadal en cabras bajo fotoperíodos crecientes.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue parcialmente financiado por el CONACYT-SIVILLA (2002-040-1009, 1998-040-1010 & IB-27,336), el INIFAP-DGIP-CIRNOC-CELALA (2004-268074-P), y la UACH-URUZA (2002-30-07, 2003-30-10, 2004-30-0201 & 2005-30-0207). Los análisis endocrinos fueron realizados por el Dr. D. M. Hallford, Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Ciencia Animal, Universidad Estatal de Nuevo México, EUA. Se destaca el apoyo del USDA-NHPP-NIDDK, por proporcionar los materiales para los ensayos endocrinos. En el desarrollo del presente estudio participaron como Tesistas de Licenciatura A. Lorenzo R., R. Dionisio T., D. A. Bautista R., G. Velásquez M., F. Vargas B., y V. Rivas I., de la URUZA-UACH, así como el estudiante de doctorado J. A. Pérez-Villanueva, de la FMVZ-UAZ.

LITERATURA CITADA

- Barb, C.R.; Campbell, R.M.; Armstrong, J.D. and Cox, N.M. 1996. Aspartate and glutamate modulation of growth hormone secretion in the pig: Possible site of action. *Dom. Anim. Endocr.* 13:81-90.
- Berrie, R.A.; Hallford, D.M. and M.L. Gaylan. 1995. Effects of zinc source and level of performance, carcass characteristics, and metabolic hormone concentrations of growing finishing lambs. *Prof. Anim. Sci.* 11:149-156.
- Brann, D.W. 1995. Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology.* 61:213-225
- Brann, D.W. and Mahesh V.B. 1995. Glutamate: a major neuroendocrine excitatory signal mediating steroid effects on gonadotropin secretion. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53:325-329.
- Bucholtz, S.C.; Vannerson, L.A.; Ebling, F.J.P.; Wood, R.I.; Suttie, J.M. and Foster, D.L. 1988. Modulation of gonadotrophin secretion in growth-restricted lambs by glucose/amino acids. *Biol. Reprod.* 38(suppl.):185.
- Chang, W.J.; Barb, C.R.; Kraeling, R.R.; Rampacek, G.B. and Asanovich, K.M. 1993. N-Methyl-D,L-Aspartate modulation of pituitary hormone secretion in the pig: Role of opioid peptides. *Domest. Anim. Endocrinol.* 10:305-313.
- Darrell, W.; Brann, Virendra, B. and Mahesh, B. 1997. Excitatory Amino Acids: Evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endo. Rev.* 18:678-700
- Davidson, R.T.; Chamberlain S.C.; Bridges S.T. and Spicer J.L. 2002. Effect of Follicle Size on In Vitro Production of Steroids and Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I, IGF-II, and the IGF-Binding Proteins by Equine Ovarian Granulosa Cells. *Biol. Reprod.* 66, 1640-1648.
- Dickie, A.M.; Paterson, C.; Anderson, L.M. and J.S. Boyd. 1999. Determination of corpora lutea numbers in Booroola-Texel ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology.* 51:1209-1224.
- Dinny, J.G. and L.C. Christine. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Rev.* 18 (4):502-519.
- Dunn, T.G., and Moss, G.E. 1992. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *J. Anim. Sci.* 70: 1580.1593.
- Estienne, M.J.; Barb, C.R.; Kesner, J.S.; Kraeling, R.R. and Rampacek, G.B. 1991. Luteinizing hormone secretion in hypophyseal stalk-transected gilts given hydrocortisone acetate and pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Domest. Anim. Endocrinol.* 8(3):407-414.
- Estienne, M.J.; Harter-Dennis, J.M.; Barb C.R.; Harstock, R.M. and Armstrong, J.D. 1996. N-methyl-D-L-aspartate-induced growth hormone secretion in barrows: possible mechanisms of action. *J. Anim. Sci.* 74: 597-602
- Estienne, M.J.; Harter-Dennis, J.M.; Barb, C.R. and Harstock, T.G. 1995. Luteinizing hormone and growth hormone concentrations un serum of prepubertal gilts treated with n-methyl-d-l-aspartate. *Domest. Anim. Endocrinol.* 12:207-213.
- Estienne, M.J.; Hurlock, W.F. and Barb, C.R. 1998. Serum concentrations of luteinizing hormone, growth hormone, and cortisol in gilts treated with N.methyl-d,l-aspartate during the estrous cycle or after ovariectomy. *J. Anim. Sci.* 76:2162-2168.
- Estienne, M.J.; Schillo, K.K.; Hileman, S.M.; Green, M.A. and Hayes, S.H., 1990. Effect of n-methyl-d-l-aspartic acid on luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes in the absence and presence of estradiol. *Biol. Reprod.* 42:126-130.
- Ford, M. M., Thorburn, G.D.; Caddy, D.J. and Young, I.R.. 1999. Pulsatile output of prostaglandin F2 does not increase around the time of luteolysis in the pregnant goat. *Biol. Reprod.* 61:411-415.
- Foster, D.L.; Ebling, F.J.P.; Micka, A.F.; Vannerson, L.A.; Buchlotz, D.C.; Wood, R.I.; Sutties, J.M. and Fenner D.E. 1989. Metabolic interface between growth and reproduction I. Nutritional modulation of gonadotropin, prolactin and growth hormone secretion in the growth – limited female lamb. *Endocrinol.* 125: 342-350.
- Gill, J.L., and Hafs, H.D. 1971. Analysis of repeated measurements in animals. *J. Anim. Sci.* 33:331-336.
- Gong, J.E.; McBride, D.; Bramley, T.A. and Webb, R. 1993. Effect of recombinant bovine somatotrophin,

- insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 139:67-75.
- Griffin, J. K. and Ginther, O. J. 1992. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J. Anim. Sci* 70:953-972.
- Gutiérrez, A.C. 2001. Influencia de la nutrición en la reproducción. II Curso Internacional Fisiología de la Reproducción en Rumiantes, Edo. de México, Mex.
- Hoefler, W.C. and Hallford, D.M. 1987. Influence of suckling status and type of birth on serum hormones profiles and return to estrus in early post-partum spring lambing ewes. *Theriogenology* 27:887-895.
- Lee, W.S.; Abbud, R.; Hoffman, G.E. and Smith, M.S. 1993. Effects of N-methyl-D-aspartate receptor activation on cFos expresión in luteinizing hormone-releasing hormone neurons in female rats. *Endocrinology* 133:2248-2254.
- Littell, C.R.; Freund, J.R. and Philip, C. 1991. SAS® System for Linear Models, Third Edition, Cary, NC: SAS Institute Inc., 329 pp.
- López, S.A.; González, B.A. y Santiago, M.J. 2001. Manejo Reproductivo en Pequeños Rumiantes. II Curso Internacional Fisiología de la Reproducción en Rumiantes, Edo. de México, Mex.
- McDonald, J.W. and Johnstone, M.V. 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15:41-70.
- Meza-Herrera, C. A.; López A. D.; Chavez P., J. G.; Salinas, H.; Valencia, M. and Mellado M.. 2002a. Influence of nutrition on ovarian activity in goats. I. Effect of fat by-pass supplementation. *J. Anim. Sci.* 80(Suppl. 1):193.
- Meza-Herrera, C. A.; Ortiz, J. A.; Cuevas, R. A.; Chavez P., J. G.; Salinas, H.; Valencia, M. and Mellado, M.. 2002b. Influence of nutrition on ovarian activity in goats. II. Interactions among body condition, by-pass protein supplementation and endocrine profile. *J. Anim. Sci.* 80(Suppl. 1):193.
- Meza-Herrera, C. A.; Hernandez L., M. E.; Chavez-Perches., J. G.; Salinas, H.; Urrutia, J. and Mellado, M. 2003a. Effect of fat supplementation of goats in different body condition and under increased photoperiods upon ovarian activity and preovulatory endocrine profiles. *J. Anim. Sci.* 81(Suppl. 1):127.
- Meza-Herrera, C. A.; Sanchez S., J. M.; Chavez-Perches, J. G.; Salinas, H.; Urrutia, J. and Mellado, M.. 2003b. Interactions among body condition, protein supplementation, serum insulin levels and ovarian activity in goats. *J. Anim. Sci.* 81(Suppl. 1):327.
- Meza-Herrera, C. A. 2003. Desarrollo folicular, luteogénesis y esteroidogénesis: Arquitectura y función del cuerpo lúteo. In: *Fisiología de la Reproducción en Rumiantes*. Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera Federal México-Texcoco, Montecillo Estado de México. México. . p. 189-202.
- Meza-Herrera, C. A., J. M. Sanchez S., J. G. Chavez-Perches, H. Salinas, and M. Mellado. 2004. Protein supplementation, body condition and ovarian activity in goats. Preovulatory serum profile of insulin. *South African Journal of Animal Science.* 34(Suppl. 1):223-226.
- Meza-Herrera, C. A.; Salinas-González, H. y Mellado-Bosque, M. 2005. Aminoácidos neuroexcitadores y función ovárica en cabras: Efectos en el perfil de hormonas gonadotropicas y metabólicas. In: *Fisiología de la Reproducción en Rumiantes*. Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera Federal México-Texcoco, Montecillo Estado de México. México. p. 313-325.
- National Research Council. 1981. Nutrient requirements of goats: Angora, dairy and meat goats in temperature and tropical countries. 1ª ed. National Academy Press. Washington, D. C. U.S.A.
- Niswender, D.G.N.; Jennifer, L.J.; Silva, P.J.; Rollyson, M.K. and McIntush, E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 80(1):1-29.
- Ping, L.; Mahesh, V.B.; Bath, G.K. and Brann, D.W. 1997. Regulation of gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by AMPA receptors. Evidence for a physiological role of MAPA receptors in the steroid-inducing luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology* 66:246-253.
- Popwell, J.M.; Estienne, M.J.; Kraeling, R.R.; Barb, C.R.; Whitley, N.C.; Utley, R.V. and Rampacek, G.M. 1996. The role of excitatory amino acids in pulsatile secretion of luteinizing hormone in gilts and barrows. *J. Anim. Sci.* 74:1067-73.
- Roberts, R.M.; Xie, S. and Mathialagan, N. 1996. Maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.* 54:294-302.
- Sanson, D.W. and Hallford, D.M. 1984. Growth response, carcass characteristics and serum glucose and insulin in lambs fed tolazamide. *Nutr. Rep. In.* 64:461-469.
- Schneider, F.A. and D.M. Hallford. 1996. Use of a rapid progesterone radioimmunoassay to predict pregnancy and fetal numbers in sheep. *Sheep & Goat Res. J.* 12:33-38.
- Sesti, L.A.C. and Britt, J.H. 1992. Elicitación of release of luteinizing hormone by N-Methyl-D,L-Aspartic acid during three paradigms of suppressed secretion of luteinizing hormone in the female pig. *Domest. Anim. Edocrinol.* 9:105-114.
- Sirotkin, A.V. and Makarevich, A.V. 1999 GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system. *J. Endocrinol.* 163:317-327
- Smith, J. F. 1988. Influence of nutrition on ovulation rate in the ewe. *Aust. J. Biol. Res* 41:27
- Snedecor G.W. and Cochran, W.G. 1967. *Statistical methods*. (6th Ed.). The Iowa State Univ. Press, Ames., USA.
- Spicer, L.J.; Alpizar, E. and Echternkamp, S.E. 1993. Effects of insulin-like growth factor I, and gonadotropins

- on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production In vitro. *J. Anim. Sci* 71:1232-1241.
- Spicer, L.J. and Echterkamp, S.E. 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 12:223-45.
- Urbanski, H.F. 1990. A role for N-metil-D-aspartate receptors in the control of seasonal breeding. *Endocrinology.* 127:2223-2228.
- Urbanski, H.F. and Ojeda, S.R. 1990. A role for N-metil-D-aspartate (NMDA) receptors in the control of LH secretion and initiation of puberty. *Endocrinology.* 126:1774-1776.
- Urbanski, H.F. and Pierce, M. 1992. Photoperiodic control of seasonal breeding in Syrian hamsters: involvement of excitatory amino acids receptors. *Neuroendocrinology letters.* 14:33-37.
- Urbanski, H.F.; Fahy, M.M.; Daschel, M. and Mashul, C. 1994. N-methyl-D-aspartate receptor gene expression in the hamster hypothalamus and in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *J. Reprod. Fertil.* 100:5-9.
- Veldhuis, J. D. and Jonson, M.L. 1986. Cluster analysis: a simple versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am. J. Physiol.* 250: E486-E493.