

IMPLICAÇÕES DA INSULINA NA FUNÇÃO OVARIANA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

[Implications of insulin in ovarian function and embryonic development]

Roberta Nogueira Chaves, Márcia Viviane Alves Saraiva, Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves, José Ricardo de Figueiredo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Campus Itaperi, Fortaleza, CE

RESUMO - A insulina é um hormônio essencialmente envolvido na regulação da concentração da glicose na circulação, além de atuar no crescimento celular e no desenvolvimento de uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo o ovário. Em geral, os efeitos desse hormônio nas células ovarianas de mamíferos são positivos, estimulando nas células da granulosa a sua proliferação, a atividade da aromatase e a produção de esteróides, além de ser um fator regulador da maturação oocitária. Assim, este artigo tem como objetivo relatar os principais efeitos biológicos da insulina na reprodução de fêmeas. Ao longo deste trabalho, foram mostrados aspectos relacionados à estrutura e ação da insulina e seu receptor, presença da insulina e seu receptor no ovário e o papel deste hormônio na reprodução de fêmeas. A insulina é um hormônio de caráter anabólico, produzido pelas células β pancreáticas. A sua ação na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática. No ambiente ovariano, a insulina é um importante modulador do desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário. Assim, hormônios metabólicos, como a insulina, regulam o desenvolvimento folicular modulando o recrutamento, o desenvolvimento e a maturação folicular. Apesar dos grandes avanços científicos ocorridos sobre os mecanismos de ação da insulina, ainda verifica-se a necessidade de mais estudos com a finalidade de explicar melhor seus efeitos na foliculogênese em mamíferos, bem como a influência desses efeitos na posterior maturação dos oócitos crescidos *in vitro*.

Palavras-Chave: Embrião, folículo ovariano, oócito, receptor.

ABSTRACT - Insulin is a hormone essentially involved in the blood glucose level regulation, besides it acts on cell growth and development of a several variety of cell types, including the ovarian cells. In general, the effects of this hormone in ovarian cells of mammals are positive, it stimulates in granulosa cells proliferation, aromatase activity and steroid production, also it is a factor that regulates the oocyte maturation. Therefore, this review described the main biological effects of insulin in female mammalian reproduction, with emphasis on ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and embryonic development. This paper shows the structure and action aspects of insulin and its receptor, the presence of insulin and its receptor in the ovary and the role of this hormone in female reproduction. Insulin is an anabolic hormone produced by pancreatic β cells. Its action starts in the cell by binding to the in cell plasma membrane receptor. In the ovarian environment, insulin is an important modulator of follicular development, steroidogenesis, oocyte maturation and subsequent embryonic development. Thus, metabolic hormones such as insulin regulate the follicular development by modulating the follicular recruitment, development and maturation. Despite significant scientific advances that have occurred on the mechanisms of insulin action, there is yet to be better explained its effects on folliculogenesis in mammals, as well as the influence of these effects in the subsequent maturation of oocytes grown *in vitro*.

Keywords: Embryo, oocyte, ovarian follicle, receptor.

INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio essencialmente envolvido na regulação da concentração da glicose na circulação, além de estar envolvido no crescimento celular e no desenvolvimento de uma ampla

variedade de tipos celulares (Fouladi-Nashta & Campbell, 2006). Mais de trinta anos após a determinação da sequência de aminoácidos da insulina, em 1955, sugeriu-se o envolvimento dessa substância como reguladora da atividade ovariana (Ponchirulli, 2003). O interesse por estudos

relacionados à atuação da insulina na função ovariana iniciou de fato com observações de mulheres com hiperandrogenismo com extrema resistência à insulina (Nandi et al., 2010), e a partir destas observações foi levantada a hipótese de que altos níveis de insulina circulante podem causar excessiva produção de andrógenos em pacientes (Taylor et al., 1982). No entanto, somente em 1982 a presença de insulina no ovário foi relatada pela primeira vez em porcas (Ponchirolli, 2003).

Desta forma, um grande progresso nesta área de pesquisa vem sendo alcançado nas últimas décadas, pois houve um aumento significativo nos trabalhos que resultaram em acúmulo de informações sobre o papel da insulina no ovário a nível molecular, celular e clínico, tanto em condições normais como patológicas (Poretsky et al., 1999). Em geral, os efeitos desse hormônio nas células ovarianas de mamíferos são positivos, estimulando a proliferação das células da granulosa, a atividade da aromatase e a produção de esteróides, além de ser um fator regulador da maturação oocitária (Duleba et al., 1997).

A presente revisão tem como objetivo descrever a caracterização estrutural da insulina e os principais efeitos biológicos desse hormônio na reprodução de fêmeas mamíferas, com ênfase na foliculogênese ovariana, maturação oocitária e desenvolvimento embrionário.

ESTRUTURA E AÇÃO DA INSULINA E SEU RECEPTOR

A insulina é um hormônio de caráter anabólico, produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas, em resposta aos níveis plasmáticos de nutrientes, especialmente a glicose (Shuldiner et al., 1998). Esse hormônio também é secretado em proporção direta ao grau de adiposidade, e em condições normais se liga a receptores inseridos na membrana das células insulino-dependentes. Além de atuar no hipotálamo, interagindo com neurotransmissores envolvidos no mecanismo de controle da fome-saciedade (Volp et al., 2008). A insulina pode ainda atuar sobre uma grande variedade de tecidos corporais, tais como fígado, músculos, glândulas mamárias e ovário (Sasaki et al., 2002).

A insulina humana está localizada no cromossomo 11 (Dumonteil & Philippe, 1996) e codifica a pré-insulina, um polipeptídeo de cadeia simples, precursor da insulina (Shuldiner et al., 1998). A pré-insulina é proteolicamente convertida a pró-insulina, a qual consiste de uma cadeia A, uma

cadeia B e um peptídeo C. A pró-insulina é homóloga aos fatores de crescimento semelhante à insulina do tipo I e II (IGF-I e IGF-II), podendo estes se ligarem aos receptores de insulina com aproximadamente 10% de afinidade da insulina. Desta forma, a insulina pode atuar por meio dos receptores específicos de insulina, que estão amplamente distribuídos nos ovários, pelos receptores do IGF-I ou ainda por receptores híbridos, que contêm combinação das subunidades α e β dos receptores de insulina e IGF-I (Yarak et al., 2005). A insulina é produzida após a clivagem do peptídeo-C, a partir da pró-insulina, por endopeptidases ativas provenientes do complexo de Golgi e dos grânulos secretórios. As endopeptidases clivam preferencialmente o peptídeo-C/junções de cadeia B, entre Arg31 e Arg32 (endopeptidase tipo I), ou peptídeo-C/junções de cadeia A entre Lys64 e Arg65 (endopeptidase tipo II). A molécula de insulina resultante consiste então de uma cadeia A (contendo 21 aminoácidos) e uma cadeia B (contendo 30 aminoácidos), com três pontes dissulfídicas: duas entre as cadeias A e B (A7-B7 e A20-B12) e uma com a cadeia A (A6-A11) (Figura 1; Poretsky et al., 1999).

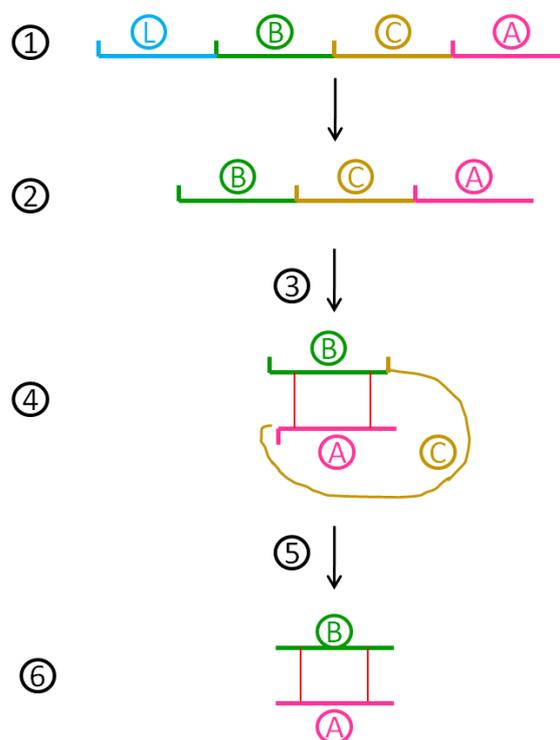


Figura 1. Esquema da síntese da insulina onde 1. Pré-insulina (Líder, cadeia B, cadeia C, cadeia A); 2. Pró-insulina consiste em BCA, sem L; 3. Dobra espontânea; 4. As cadeias A e B ligadas por enxofre; 5. A cadeia C é clivada; 6. Molécula de insulina final.

O receptor de insulina pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que têm atividade tirosina-quinase intrínseca (Carvalho et al., 2002). O gene para o receptor de insulina está localizado em uma curta região do cromossomo 19 (Seino et al., 1990), contém 22 éxons, possui mais que 150 kb de comprimento e codifica o pró-receptor, um polipeptídeo de cadeia simples com massa molecular de 190 kDa, que também contém uma subunidade α e uma β . Este receptor específico de membrana, é uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α (massa molecular 135 kDa) e duas subunidades β (massa molecular 95 kDa) unidas por uma ponte dissulfídica (Lawrence et al., 2007), que atua como uma enzima alostérica. A forma heterotetramérica madura ($\alpha\beta_2$) dos receptores resulta de dimerizações e muitos processos pós-translacionais, incluindo clivagem proteolítica. A subunidade α dos receptores de insulina são estruturas extracelulares que possuem domínio rico em cisteína que serve como sítio para ligação da insulina. Já a subunidade β do receptor possui um domínio transmembranário e um intracelular, o qual é responsável pela transmissão do sinal, contém um sítio de ligação ATP e vários sítios tirosina de autofosforilação (Belfiore et al., 2009).

A subunidade α inibe a atividade tirosina-quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1/-2: Insulin receptor substrate-1/-2), que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor (Lawrence et al., 2007). Uma vez fosforilado, o IRS-1/-2 interage com uma série de proteínas intracelulares, desencadeando uma cascata complexa de reações de fosforilação e defosforilação (Cheatham & Kahn, 1996). Em adição a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3 quinase), a proteína quinase mitogenicamente ativada (MAPK) também é fosforilada após a ligação da insulina ao seu receptor (Cheatham & Kahn, 1996; White, 1996). A ativação do MAPK é responsável pelos efeitos no crescimento promovidos pela insulina (Lawrence et al., 2007). O MAPK pode ser ativado não apenas pelo receptor de insulina, mas também por outros receptores tirosina-quinase, tais como receptores de IGF-I, receptores para o fator de crescimento epidermal (EGF), receptores de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), bem como receptores ligados a proteína G (Lawrence et al., 2007; Suga et al., 1997). A ligação molecular entre a cascata do MAPK e o receptor de insulina pode ser mediada pelo fator p21 Ras, uma proteína altamente conservada envolvida no crescimento celular que pode ser um elemento crítico na ação do receptor de

insulina tirosina-quinase e dos receptores de uma série de fatores de crescimento (Lawrence et al., 2007; Cheatham & Kahn, 1996; White, 1996).

Acredita-se que a ativação da tirosina-quinase seja o principal mecanismo de sinalização dos receptores de insulina (Belfiore et al., 2009) e parece ser o evento pós ligação hormônio/receptor responsável por quase todos os efeitos da insulina nos tecidos (Cama et al., 1991). No entanto, uma via alternativa para os receptores de insulina tem sido descrita na literatura. Tal via envolve a geração de inositolglicano como segundo mensageiro, após a ligação da insulina à subunidade α de seu receptor na membrana plasmática, sendo este evento, independente da ativação da tirosina-quinase na subunidade β (Figura 2). Esta via de sinalização alternativa para os receptores de insulina pode mediar alguns efeitos da insulina, incluindo a estimulação da esteroidogênese no ovário (Nestler et al., 1998), mas o papel deste sistema na propagação dos sinais de insulina para o transporte de glicose e outros dos seus efeitos ainda não está completamente estabelecido.

PRESENÇA DA INSULINA E SEU RECEPTOR NO OVÁRIO MAMÍFERO

No ambiente ovariano, a insulina é um importante modulador do desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário (Yaseen et al., 2001). A insulina também leva a um aumento no número de folículos primários e uma menor taxa de atresia folicular, e conseqüentemente, aumento da taxa de ovulação (Almeida et al., 2001).

O efeito direto da insulina no ovário pode ser comprovado pela presença de seus receptores. Tanto em modelos humanos (Figura 3), como animais, os receptores de insulina são amplamente distribuídos em todos os compartimentos ovarianos, incluindo células da granulosa, células da teca, estroma e oócito (Myers et al. 1991; Sirotkin et al., 1998; Louhio et al., 2000). A concentração de insulina no fluido folicular proveniente da circulação foi constante em todos os estádios de desenvolvimento folicular em ovário bovino. No entanto, a expressão de RNAm para receptor de insulina nas células da granulosa e teca de folículos pré-ovulatórios foi maior que em todos os outros estádios de desenvolvimento (Shimizu et al., 2008).

A insulina atua na reprodução por regular a síntese de neurotransmissores de GnRH e, conseqüentemente, controlar a secreção das gonadotrofinas, principalmente na liberação de LH

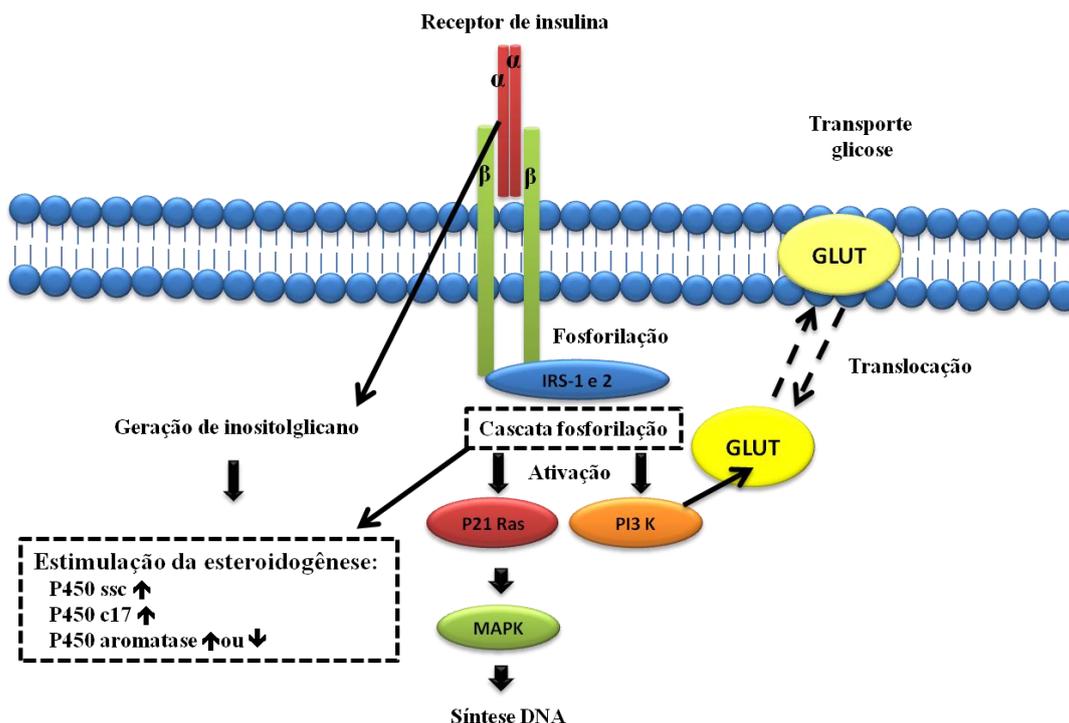


Figura 2. Receptor de insulina, sua via de sinalização para o transporte de glicose e mecanismo hipotético de estimulação ou inibição da esteroidogênese. Após a ligação da insulina à subunidade α de seu receptor, a subunidade β tirosina-quinase é ativada e então os IRS-1 e -2 são fosforilados. A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase) que é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose é ativada, os transportadores de glicose dependentes de insulina (GLUT) são translocados para a membrana e a captação da glicose é estimulada. Um sistema de sinalização alternativo pode envolver a geração de inositolglicano na membrana da célula após a ligação da insulina ao seu receptor. Esse sistema de sinalização inositolglicano pode mediar a modulação da insulina nas enzimas esteroidogênicas como P450 ssc, P450 c17 ou aromatase P450.

Receptor de insulina	
Antrais iniciais (3-5 mm)	
Oócito	+2
Granulosa	+1
Teca	+1
Antrais tardios (7-20mm)	
Oócito	+2
Granulosa	+2
Teca	+2
Corpos lúteos	
Granulosa	+2
Teca	-

Figura 3. Expressão de receptores de insulina em ovários humanos após a realização da técnica de hibridização *in situ*. Os dados são mostrados como marcação positiva moderada (+2) e positiva fraca (+1). Adaptado de Poretsky et al. (1999). Dados pertencentes a El-Roeiy et al. (1993) e Samoto et al. (1993).

pela hipófise, juntamente aos IGF-I e IGF-II, cujos receptores estão presentes nas células foliculares (granulosa e teca; Kawauchi et al., 2006). A ligação da insulina ao seu receptor resulta em uma série de

efeitos metabólicos, sendo o mais importante a estimulação do transporte de glicose para o interior das células, utilizada como a principal fonte energética para o ovário (Souza et al., 2009).

Estudos mostram que a insulina possui ação direta no ovário. A incapacidade do folículo em responder ao aumento na frequência de pulsos de LH pode ser devido à menor capacidade de reposição pelos receptores de LH nas células da granulosa, que são dependentes da ação combinada de FSH e de estradiol-17 β . Por sua vez, o estradiol-17 β folicular depende da produção de andrógenos nas células da teca, que é estimulada pelo LH, e cuja resposta parece ser aumentada pela insulina e pelo IGF-I (Stewart et al., 1995). Assim, as baixas concentrações plasmáticas de insulina, em animais submetidos à restrição alimentar crônica, podem reduzir a produção de andrógenos e estrógenos e, assim, comprometer a habilidade dos folículos em produzirem receptores para LH (Diskin et al., 2003). Além dessa ação direta, o efeito da insulina pode ser exercido indiretamente sobre o ovário pela elevação das concentrações de hormônio do crescimento (Kawauchi et al., 2006).

PAPEL DA INSULINA NA FUNÇÃO OVARIANA

Foliculogênese

O desenvolvimento e crescimento folicular são controlados por gonadotrofinas hipofisárias (LH e FSH) e por fatores locais, como hormônios esteróides e fatores de crescimento. No entanto, os fatores endócrinos relacionados com o metabolismo, como a insulina e hormônio do crescimento também são cruciais para o desenvolvimento folicular em ovário mamífero (Shimizu et al., 2008). Na foliculogênese inicial, a insulina tem ação na manutenção da viabilidade e crescimento dos folículos primordiais e primários, e em baixas concentrações pode aumentar os índices de formação de folículos primários (Louhio et al., 2000). Este efeito pode ser devido ao papel da insulina em estimular o fator inibidor de leucemia e Kit Ligand podendo, portanto, ser um corregulador no padrão de sinalização controlando a transição de folículos primordiais para primários (Van den Hurk & Zhao, 2005). Confirmando a atuação da insulina nesta transição, estudos *in vitro* têm mostrado que este hormônio estimulou a formação de folículos primários em tecido ovariano cultivado em diferentes espécies como humanos (Louhio et al., 2000), bovinos (Yang & Fortune, 2002) e murinos neonatais (Kezele et al., 2002).

O papel da insulina no crescimento folicular tem sido mostrado em células da granulosa humanas cultivadas *in vitro*, as quais respondem a esse hormônio por aumento na produção de estrógeno e progesterona (Willis et al., 1996), ocasionando

proliferação celular na granulosa em ratos (Peluso et al., 1991) e nas células da teca e em células ovarianas em hamster (Duleba et al., 1997; Li et al., 1997). Em bovinos, concentrações fisiológicas (10 ng/ml) ou próximas a fisiológica (20 ng/ml) de insulina estimularam o crescimento folicular e oocitário em folículos pré-antrais isolados e induziram uma alta percentagem de formação de antro (> 60%) após 13 dias de cultivo (McLaughlin et al., 2010; Itoh et al., 2002). Similarmente em ovinos, a insulina (10 ng/ml) suportou o desenvolvimento dos folículos secundários (Arunakumari et al., 2010). Em caprinos, cultivo com folículos pré-antrais inseridos em fragmentos ovarianos ou isolados mecanicamente apresentaram maior crescimento e sobrevivência com a utilização de insulina a 10 ng/ml (Chaves et al., dados não publicados). Jewgenow et al. (1998) mostraram também que a adição, ao meio de cultivo, de insulina como componente do ITS (Insulina-Transferrina-Selênio), bem como de outras substâncias como piruvato, glutamina e hipoxantina é essencial para o crescimento de folículos pré-antrais felinos *in vitro*. Recentes estudos em bovinos revelaram que a utilização de ITS como componente do meio de base apresenta ativação no segundo dia de cultivo, enquanto que meios sem insulina, os folículos permaneceram no estágio primordial por 10 dias de cultivo, implicando que a insulina age como ativador de folículos primordiais em bovinos (Smitz et al., 2010).

Em espécies domésticas, tem sido verificado que a administração da insulina em diferentes fases reprodutivas, como moduladora das funções reprodutivas, aumentou os níveis intrafoliculares e periféricos de fatores de crescimento, tais como o IGF-I. Além disso, em suínos e bovinos, a insulina aumenta o recrutamento de folículos responsivos as gonadotrofinas, reduz a atresia folicular e atua como um sinal metabólico, influenciando a liberação de LH pela hipófise (Monget et al., 1997).

In vivo, as populações de folículos ovarianos de ruminantes são muito sensíveis a manipulação nutricional, podendo esta ferramenta ser utilizada a fim de incrementar prontamente a foliculogênese e a taxa de ovulação (Scaramuzzi et al., 2006). As concentrações plasmáticas de insulina foram positivamente correlacionadas com a energia da dieta e foi proposto que este hormônio é um fator chave que modula os efeitos da nutrição sobre a função ovariana. Tal fato é explicado pelas observações que as células da granulosa do folículo bovino são dependentes de concentrações fisiológicas de insulina e que a infusão de insulina em novilhas de corte aumenta o diâmetro de folículos dominantes (Glister et al., 2001). Beam &

Butler (1997) observaram que falhas na ovulação durante a primeira onda folicular em vacas foram associadas às baixas concentrações de insulina, sugerindo que a baixa fertilidade pode estar associada a este hormônio. Em ovinos, verificou-se uma redução nos níveis de insulina no fluido folicular à medida que os folículos cresciam, especialmente nos maiores, mais próximos do tamanho ovulatório (Souza et al., 2009).

A insulina tem efeito direto em células ovarianas cultivadas, exercendo uma ação específica em células da granulosa não luteinizadas através do aumento da estimulação do FSH para produção de estrógeno e progesterona (Bhatia et al., 2001). De fato, estudos *in vitro* têm demonstrado que esse hormônio age como um potente estimulador da diferenciação e estereoidogênese folicular (Diskin et al., 2003). A insulina e LH sistêmicos estimulam a formação de andrógenos tecaiais em folículos secundários que induzem a formação de receptores para FSH na granulosa (Van den Hurk & Zhao, 2005).

Um aumento no suprimento sanguíneo para folículos antrais dominantes pode maximizar a oferta de LH e FSH. Além das gonadotrofinas e fatores de crescimento, outros componentes de suprimento sistemático, como a insulina, pode influenciar a proliferação e/ou diferenciação das células da granulosa e teca e assim afetar o destino de um folículo antral (Van den Hurk & Zhao, 2005).

Recentemente, estudos revelaram que em ovinos, modificações no fornecimento de glicose mediado pela insulina nas células da teca e da granulosa, modulam a função folicular, pois o transportador de glicose dependente de insulina (GLUT-4) está presente nestas células (Somchit et al., 2007). Além disso, o status de desenvolvimento folicular no momento em que há concentrações máximas de glicose e insulina pode ser um dos fatores que determinam a eficiência da taxa de ovulação (Viñoles et al., 2005), uma vez que o aumento no fornecimento de glicose mediado pela insulina nas células foliculares é crítico para o crescimento folicular e prevenção de atresia, o que eleva o pool de folículos ovulatórios (Somchit et al., 2007). Outros estudos têm sugerido ainda que a insulina pode afetar o reinício dos pulsos de LH em animais submetidos a períodos de subnutrição, por modificações na utilização de combustíveis metabólicos oxidáveis (Szymanski et al., 2007).

Altas concentrações de insulina em novilhas não lactantes foram associadas com um número aumentado de pequenos folículos (<4 mm) (Gong et

al, 1997). Além disso, esse hormônio induziu uma secreção de estradiol progressivamente em folículos após formação de antro (Itoh et al., 2002). Segundo Zhang et al. (2010) uma contínua exposição dos ovários murinos a níveis elevados de insulina *in vitro* afeta a formação do folículo e capacidade de desenvolvimento.

Dessa forma, a insulina pode atuar tanto no controle dos estádios do desenvolvimento folicular independentes de gonadotrofinas, quanto em sinergia com gonadotrofinas para modular o recrutamento folicular, maturação de folículos pré-ovulatórios e o desenvolvimento embrionário.

Maturação oocitária

O papel da insulina na maturação oocitária tem sido descrita (Fouladi-Nashta & Campbell, 2006). Tsafirri & Channing (1975) demonstraram que a insulina estimula a progressão nuclear de oócitos de porcas além da metáfase I e extrusão do primeiro corpúsculo polar. Subsequentemente, Lessman & Schuetz (1981) reportaram que esse hormônio facilita a quebra da vesícula germinal em rãs leopardo (*Rana pipiens*), além de induzir a maturação meiótica em oócitos de rãs *Xenopus laevis* (Fouladi-Nashta & Campbell, 2006). No entanto, alguns estudos demonstram que oócitos mamíferos ou folículos em crescimento na presença prolongada de altas doses de insulina tem um impacto negativo na competência de desenvolvimento oocitária, definida como a habilidade do oócito em suportar o desenvolvimento embrionário para o estágio de blastocisto e/ou gestação normal estabelecida. Entretanto, esse mecanismo ainda é desconhecido (Acevedo et al., 2007).

Vários estudos mostram que a presença de insulina como insulina-transferrina-selênio (ITS; a uma concentração de 10 µg/ml) tem permitido o crescimento folicular e maturação de oócitos *in vitro* em diversas espécies (hamster: Roy (1993); humanos: Willis et al. (1996); bovinos: Coelho et al. (1998); búfalos: Raghu et al. (2002); caprinos: Zhou e Zhang (2005); suínos: Jeong et al. (2008); marsupiais: Nation & Selwood (2009); ovinos: Arunakumari et al. (2010)). Recentemente, Xu et al. (2010) confirmaram que insulina associada ao FSH promove a sobrevivência e crescimento de folículos secundários isolados em macacas rhesus, além de fornecer um maior número de oócitos saudáveis e maturados *in vitro*. No entanto, quando ovários de camundongas foram cultivados na presença de 5 µg/ml de insulina foi demonstrado um profundo

efeito negativo na oogênese e foliculogênese *in vitro*, devido a um retardo no crescimento oocitário (Sun et al., 2010).

Administração exógena de insulina por meio da alimentação tem mostrado afetar não somente o crescimento folicular, mas também a qualidade do oócito. Mudanças na ingestão de alimentos energéticos são capazes de influenciar negativamente a morfologia e a competência de oócitos (Boland et al., 2001). A exposição de oócitos de camundongos a condições de diabetes durante a foliculogênese tem um efeito negativo na maturação meiótica, devido a um decréscimo na comunicação entre os compartimentos das células somáticas e célula germinal (Colton et al., 2003).

A adição da insulina ao meio de maturação acelera a progressão meiótica e exerce um efeito positivo nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário (Augustin et al., 2003). Além disso, a insulina exerce uma atividade mitogênica e anti-apoptótica em folículos antrais cultivados *in vitro* (Leroith et al., 1995). Segundo Stefanello et al. (2006), os folículos cultivados na presença da insulina têm efeito positivo sobre a estrutura do oócito e parece promover a maturação citoplasmática.

Modelos em camundongos de hipoinsulinemia e hiperglicemia materna na produção de oócitos e folículos ovarianos de menores tamanhos, reduziu o percentual de quebra da vesícula germinativa e um aumento na ocorrência de apoptose (Chang et al., 2005). No entanto, ainda há um número limitado de estudos sobre os efeitos da insulina na maturação oocitária e desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos (Fouladi-Nashta & Campbell, 2006).

EFEITO DA INSULINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A regulação do desenvolvimento e crescimento embrionários tem sido tradicionalmente atribuída à insulina e aos IGFs (Sasaki et al., 2002). Como um potente hormônio anabólico em células diferenciadas, a insulina estimula o transporte de glicose e aminoácidos e a síntese de RNA, proteínas e glicogênio (Summers et al., 1999). Experimentos realizados *in vivo* demonstraram que a insulina melhora a taxa de desenvolvimento embrionário e a taxa de gestação em animais diabéticos, resgatando os embriões dos efeitos prejudiciais da hiperglicemia materna (De Hertogh et al., 1992). Além disso, estudos com embriões em fase de pré-implantação constataram que o desenvolvimento embrionário é melhorado após suplementação do meio de cultivo

com insulina e IGF-I (Spanos et al., 2000). Em vacas, RNAm que codifica o receptor para insulina tem sido detectado em todos os estádios embrionários de zigoto a blastocisto (Schultz et al., 1992).

Em camundongos, receptores funcionais para insulina são expressos a partir do estágio pré-implantacional de oito células, mais especificamente durante a compactação (Smith et al., 1993). A partir desse último estágio, que marca o início da diferenciação embrionária levando à formação do blastocisto, muitos parâmetros da fisiologia embrionária podem ser regulados por insulina exógena (Kaye et al., 1997). Em bovinos, a insulina estimula o desenvolvimento de embriões com oito células até o estágio de blastocisto eclodido e durante os estádios de mórula e blastocisto estimula a síntese de RNA e DNA (Paria et al., 1990).

Nesse contexto, sabe-se que embriões em estágio de pré-implantação não sintetizam insulina ou seu RNAm específico (Kaye, 1997), mas têm acesso à insulina materna *in vivo* via oviduto e fluidos uterinos (Taniguchi et al., 2006). Deste modo, em condições *in vitro*, embriões em estádios iniciais são privados de tal hormônio materno, sofrendo um retardo no seu desenvolvimento morfológico e na sua proliferação celular durante a embriogênese pré-implantacional (Gardner et al., 1991). Assim, é possível constatar a importância da adição de insulina exógena para o sucesso do cultivo *in vitro* de embriões.

Estudos têm relatado que a adição de níveis fisiológicos de insulina durante o cultivo *in vitro*, além de resultar em uma redução da apoptose (Augustin et al., 2003), promove um aumento da proliferação celular em blastocistos de humanos, camundongos, coelhos e bovinos (Herrler et al., 1998; Makarevich et al., 2002; Augustin et al., 2003). Além disso, outros trabalhos demonstraram que, em bovinos e murinos, a adição exógena de insulina em embriões promove um aumento no número de células, especificamente na massa celular interna (MCI) de blastocistos em desenvolvimento (Sirisathien et al., 2003).

De acordo com Harvey & Kaye (1990), a insulina aumenta as taxas de compactação e formação de blastocistos *in vitro*, sendo os blastocistos resultantes dotados de 25% a mais de células, sendo todas localizadas na MCI. Considerando que a proporção de células presentes na MCI é um fator determinante para o crescimento fetal, o acesso do embrião à insulina materna durante a pré-implantação é requerido para a obtenção de um crescimento fetal ótimo.

Matsui et al. (1997) reportaram que a insulina em concentrações de 0,5–10 µg/ml tem um efeito benéfico na taxa de desenvolvimento para o estágio de mórula no dia 5 do cultivo embrionário e que essa estimulação do desenvolvimento embrionário foi mediado através do receptor para IGF-I. Entretanto, esses autores não reportaram a progressão do desenvolvimento para o estágio de blastocisto.

CONCLUSÕES

A função ovariana é controlada, primariamente, pela interação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Contudo, há hormônios envolvidos nos processos metabólicos, como a insulina que regulam o desenvolvimento folicular modulando o recrutamento, o desenvolvimento e a maturação folicular. Além disso, é possível verificar que a insulina e os fatores de crescimento semelhantes à insulina fornecem também um importante suporte ao crescimento e desenvolvimento embrionário.

Apesar dos grandes avanços científicos ocorridos sobre os mecanismos de ação da insulina, ainda verifica-se a necessidade de mais estudos com a finalidade de explicar melhor seus efeitos na foliculogênese inicial e final em mamíferos, bem como a influência desses efeitos na posterior maturação dos oócitos crescidos *in vitro*. Desta forma, futuras pesquisas deveriam focar no estudo dos mediadores hormonais que influenciam esse microambiente ovariano.

REFERÊNCIAS

- Acevedo N., Ding J. & Smith G.D. 2007. Insulin Signaling in Mouse Oocytes. *Biol. Reprod.* 77(5):872-879.
- Almeida F.R.C.L., Mao J., Novack S., Cosgrove J.R. & Foxcroft G.R. 2001. Effects of different patterns of feed restriction and insulin treatment during the luteal phase on reproductive, metabolic and endocrine parameters in cyclic gilts. *J. Anim. Sci.* 799(1):200-212.
- Arunakumari G., Shanmugasundaram N. & Rao V.H. 2010. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, in press.
- Augustin R., Pocar P., Wrenzycki C., Niemann H. & Fischer B. 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*. 126(1):91-99.
- Beam S.W. & Butler W.R. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation post-partum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56(1):133-142.
- Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L. & Vigneri R. 2009. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrinol. Rev.* 30:586-623.
- Bhatia B. & Price C.A. 2001. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells in vitro. *Steroid*. 66(6):511-519.
- Boland M.P., Lonergan P. & Callaghan D. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*. 55(6):1323-1340.
- Cama A., Sierra M.L., Ottini L., Kadowaki T., Gorden, P., Imperato – Mcginley J. & Taylor S.I. 1991. A mutation in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor associated with insulin resistance in an obese woman. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73(4):894-901.
- Carvalho J.B.C., Zecchin H.G. & Saad M.J.A. 2002. Vias de sinalização da insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 46(4):419-425.
- Chang A.S., Dale A.N. & Moley K.H. 2005. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 146(5):2445-2453.
- Cheatham B. & Kahn C.R. 1996. The biochemistry of insulin action. p. 139-147. In: LeRoith D., Taylor S.I. & Olefsky J.M. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Coelho L.A., Esper C.R., Garcia J.M., Vantini R., Silva Filho I.R. & Almeida Jr. I.L. 1998. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção in vitro de embriões bovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 35(3):120-122.
- Colton S.A., Humpherson P.G., Leese H.J. & Downs S.M. 2003. Physiological changes in oocyte-cumulus cell complexes from diabetic mice that potentially influence meiotic regulation. *Biol. Reprod.* 69(3):761-770.
- De Hertogh R., Vanderheyden I., Pampfer S., Robin D. & Delcourt J. 1992. Maternal insulin treatment improves pre-implantation embryo development in diabetic rats. *Diabetologia*. 35(5):406-408.
- 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(3-4):345-370.
- Duleba A.J., Spaczynski R.Z., Olive D.L. & Behrman H.R. 1997. Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol. Reprod.* 56(4):891-897.
- Dumonteil E. & Philippe J. 1996. Insulin gene: organisation, expression and regulation. *Diab. Med.* 22(3):164-173.
- El-Roeiy A., Chen X., Roberts V.J., Leroith D., Roberts Jr. C.T. & Yen S.S. 1993. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77(5):1411-1418.
- Fouladi-Nashta A.A. & Campbell K.H.S. 2006. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction*. 131(3):449-460.
- Gardner H.G. & Kaye P.L. 1991. Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse pre-implantation embryos in vitro. *Reprod. Fertil. Develop.* 3(1):79-91.
- Glister C., Tannetta D.S., Groome N.P. & Knight P. 2001. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related

- peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 65(4):1020-1028.
- Gong J.G., Bramley T.A. & Webb R. 1993. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 97(1):247-254.
- Harvey M.B. & Kaye P.L. 1990. Insulin increases the cell number of inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocyst *in vitro*. *Development.* 110(3):963-967.
- Herrler A., Krusche C.A. & Beier H.M. 1998. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol. Reprod.* 59(6):1302-1310.
- Itoh T., Kacchi M., Abe H., Sendai Y. & Hoshi H. 2002. Growth, Antrum Formation, and Estradiol Production of Bovine Preantral Follicles Cultured in a Serum-Free Medium. *Biol. Reprod.* 67(4):1099-1105.
- Jeong Y.W., Hossein M.S., Bhandari D.P., Kim Y.W., Kim J.H. & Park S.W. 2008. Effects of insulin-transferrin-selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. *Anim. Reprod. Sci.* 106(1-2):13-24.
- Jewgenow K., Penfold L.M., Meyer H.H.D. & Wildt D.E. 1998. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* 112(1):39-47.
- Kawauchi H. & Sower S.A. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148(1):3-14.
- Kaye P.L. & Harvey M.B. 1995. The role of growth factors in preimplantation development. *Progress Growth Fact. Res.* 6(1):1-24.
- Kaye P.L. 1997. Preimplantation growth factor physiology. *Rev. Reprod.* 2(2):121-127.
- Kezele P.R., Nilsson E.E. & Skinner M.K. 2002. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 192(1-2):37-43.
- Lawrence M.C., Mckern N.M. & Ward C.W. 2007. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17:699-705.
- Leroith D., Werner H., Beitner-Johnson D. & Roberts Jr. C.T. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endoc. Rev.* 16(2):143-63.
- Lessman C.A. & Schuetz A.W. 1981. Role of follicle wall in meiosis reinitiation induced by insulin in *Rana pipiens* oocytes. *Am. J. Phys.* 241(1):51-56.
- Li J.S., Ito Y., Zheng J. & Imanishi Y. 1997. Enhancement of artificial juxtacrine stimulation of insulin by co-immobilization with adhesion factors. *J. Biomed. Mat. Res.* 37(2):190-197.
- Louhio H., Hovatta O., Sjoberg J. & Tuuri T. 2000. The effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol. Hum. Reprod.* 6(8):694-698.
- Makarevich A.V. & Markkula M. 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. *Biol. Reprod.* 66(2):386-392.
- Matsui M., Takahashi Y., Hishinuma A. & Kanagawa H. 1997. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology.* 48(4):605-616.
- McLaughlin M., Bromfield J.J., Albertini D.F. & Telfer E.E. 2010. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *Mol. Hum. Reprod.* 16:644-653.
- Monget P. & Martin G.B. 1997. Involvement of insulin-like growth factor in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Hum. Reprod.* 12(1):33-52.
- Myers M.G., Backer J.M., Siddle K. & White M.F. 1991 The insulin receptor functions normally in Chinese hamster ovary cells after truncation of the C terminus. *J. Biol. Chem.* 266:10616-10623.
- Nandi A., Wang X., Accili D. & Wolgemuth D.J. 2010. The effect of insulin signaling on female reproductive function independent of adiposity and hyperglycemia. *Endocrinology.* 151(4):1863-1871.
- Nation A. & Selwood L. 2009. The production of mature oocytes from adult ovaries following primary follicle culture in a marsupial. *Reproduction.* 138(2):247-255.
- Nestler J.E., Jakubowicz D.J., De Vargas A.F., Brik C., Quintero N. & Medina F. 1998. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(6):2001-2005.
- Paria B.C. & Dey S.K. 1990. Preimplantation embryo development *in vitro*: Cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Develop. Biol.* 87(12):4756-4760.
- Peluso J.J., Delidow B.C., Lynch J. & White B.A. 1991. Follicle-stimulating hormone and insulin regulation of 17 beta-estradiol secretion and granulosa cell proliferation within immature rat ovaries maintained in perfusion culture. *Endocrinology.* 128(1):191-196.
- Ponchirolli C.B. 2003. Influência dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular. In: SEMINÁRIO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2003, São Paulo. Anais... São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 2003, p. 12.
- Poretsky L., Cataldo N.A., Rosenwaks Z. & Giudice L.C. 1999. The Insulin-Related Ovarian Regulatory System in Health and Disease. *Endoc. Rev.* 20(4):535-582.
- Raghu H.M., Nandi S. & Reddy S.M. 2002. Effect of insulin, transferrin and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage *in vitro* in serum-free, semidefined media. *The Vet. Record.* 151(9):260-265.
- Roy, S.K. 1993. Epidermal growth factor and transforming growth factor: modulation of follicle-stimulating hormone-induced deoxyribonucleic acid synthesis in hamster preantral and early antral follicles. *Biol. Reprod.* 48(3):552-557.
- Saltiel A.R. 1991. Second messengers of insulin action. *Diabetes Care.* 13(3):244-256.
- Samoto T., Maruo T., Ladines-Llave C.A., Matsuo H., Deguchi J., Barnea E.R. & Mochizuki M. 1993. Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia. *Endoc. J.* 40(6):715-726.
- Sasaki, S. 2002. Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants. *Anim. Sci. J.* 73(9):423-433.
- Scaramuzzi R.J., Campbell B.K., Downing J.A., Kendall N.R., Khalid M., Munoz-Gutierrez M. & Somchit A. 2006. A review of

- the affects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nut. Develop.* 46(4):339-354.
- Schultz G.A., Hogan A., Watson A.J., Smith R.M. & Taniguchi S. 1992. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod. Fertil. Develop.* 4(4):361-371.
- Seino S., Seino M. & Bell G.I. 1990. Human insulin-receptor gene. *Diabetes.* 39(2):129-133.
- Shimizu T., Murayama C., Sudo N., Kawashima C., Masa Tetsuka M. & Miyamoto A. 2008. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim. Reprod. Sci.* 106(1-2):143-152.
- Shuldiner A.R., Barbetti F., Raben N., Scavo L. & Serrano J. Insulin. In: Leroith, D. *Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects.* CRC Press, Boca Raton, 1998, p. 181-219.
- Sirisathien S., Hernandez-Fonseca H.J. & Brackett B.G. 2003. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 77(1-2):21-32.
- Sirotkin A.V., Taradajnik T.E., Makarevich A.V. & Bulla J. 1998. Effect of follicular cells, IGF-I and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 51(4):333-344.
- Smith R.M., Garside W.T., Aghayan M., Shi C.Z., Shah N., Jarett L. & Taniguchi S. 1993. Mouse preimplantation embryos exhibit receptor mediated binding and transcytosis of maternal insulin-like growth factor I. *Biol. Reprod.* 49(1):1-12.
- Somchit A., Campbell B.K., Khalid M., Kendall N.R. & Scaramuzzi R.J. 2007. The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid. *Theriogenology.* 68(7):1037-1046.
- Souza F.A., Canisso I.F., Borges A.M., Vale Filho V.R., Lima A.L. & Silva E.C. 2009. Restrição alimentar e os mecanismos endócrinos associados ao desenvolvimento folicular ovariano em vacas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(2):61-65.
- Spanos S., Becker D.L., Winston R.M. & Hardy K. 2000. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol. Reprod.* 63(5):1413-1420.
- Stefanello J.R., Barreta M.H., Porciuncula P.M., Arruda J.N., Oliveira J.F., Oliveira M.A. & Gonçalves P.B. 2006. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology.* 66(9):2068-2076.
- Stewart R.E., Spicer L.J., Hamilton T.D. & Keefer B.E. 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(12):3719-3731.
- Suga J., Yoshimasa Y., Yamada K., Yamamoto Y., Inoue G., Okamoto M., Hayashi T., Shigemoto M., Kosaki A., Kuzuya H. & Nakao K. 1997. Differential activation of mitogen-activated protein kinase by insulin and epidermal growth factor in 3T3-L1 adipocytes: a possible involvement of PI3-kinase in the activation of the MAP kinase by insulin. *Diabetes.* 46(5):735-741.
- Summers S.A., Yin V.P., Whiteman E.L., Garza L.A., Cho H., Tuttle R.L. & Birnbaum M.J. 1999. Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport. *Annals of the New York Acadm. Sci.* 892(892):169-186.
- Sun L.L., Sun Z.Y., Zhang P., Zhai X.W., Tang J., Pan Q.J., Shi Q.H. & Shen W. 2010. Effect of insulin on oogenesis from mouse fetal germ cells in a serum-free 3D culture system. *Reprod. BioMed. Online.* 20:11-25.
- Smitz J., Dolmans M.M., Donnez J., Fortune J.E., Hovatta O., Jewgenow K., Picton H.M., Plancha C., Shea L.D., Stouffer R.L., Telfer E.E., Woodruff T.K. & Zelinski M.B. 2010. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum. Reprod. Update.* 16:395-414.
- Szymanski L.A., Schneider J.E., Friedman M.I., Ji H., Kurose Y., Blache D., Rao A., Dunschea F.R. & Clarke I.J. 2007. Changes in insulin, glucose and ketone bodies, but not leptin or body fat content precede restoration of luteinizing hormone secretion in ewes. *J. Neuroendocrinol.* 19(6):449-460.
- Taniguchi C.M., Emanuelli B. & Kahn C.R. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:85-96.
- Taylor S.I., Dons R.F., Hernandez E., Roth J. & Gorden P. 1982. Insulin resistance associated with androgen excess in women with autoantibodies to the insulin receptor. *Annals Int. Med.* 97(6):851-855.
- Tsafiriri A. & Channing C.P. 1975. Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 43(1):149-152.
- Van Den Hurk R. & Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 63(6):1717-1751.
- Viñoles C., Forsberg M., Martín G.B., Cajarville C., Repetto J. & Meikle A. 2005. Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction.* 129(3):299-309.
- Volp A.C.P., Rezende F.A.C. & Alfenas R.C.G. 2008. Insulina: mecanismo de ação e a homeostase metabólica. *Rev. Bras. Nut. Clín.* 23(2):158-64.
- White M.F. 1996. The role of IRS-1 during insulin signaling. In: LeRoith D., Taylor S.I., Olefsky J.M. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text.* Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 154-160.
- Willis D., Mason H., Gilling-Smith C. & Franks S. 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., Bernuci M.P., Lawson M.S., Yeoman R.R., Fisher T.E., Zelinski-Wooten M.B. & Stouffer R.L. 2010. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young and older adult, rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional (3D) culture: effects of gonadotropins and insulin. *Reproduction.* in press.
- Yang M.Y. & Fortune J.E. 2002. Insulin and insulin-like growth factor I exert opposite effects on the activation of bovine primordial follicles in vitro. *Biol. Reprod.* 66(1):111.

Yarak S., Bagatin E., Hassun K.M., Parada M.O.A.B. & Talarico Filho S. 2005. Hiperandrogenismo e pele: síndrome do ovário policístico e resistência periférica à insulina. *Anais Bras. Dermat.* 80(4):395-410.

Yaseen M.A., Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J.W. & Niemann H. 2001. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction*. 122(4):601-610.

Zhang P., Chao H., Sun X., Li L., Shi Q. & Shen W. 2010. Murine folliculogenesis in vitro is stage-specifically regulated by insulin via the Akt signaling pathway. *Histochem. Cell Biol.* 134(1):75-82.

Zhou H. & Zhang Y. 2005. Impact of growth factors on in vitro development of caprine oocytes at preantral stage. *Reprod. Dom. Anim.* 40(2):161-65.