

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

### **PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL**

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS DE LA  
GRANULOSA DE BOVINO EN CULTIVO PARA ESTUDIO DE PROTEÓMICA

Prestadora de Servicio Social: Guerrero Pérez Tiare Fernanda  
Matrícula: 2172032032

#### **Asesores**

Interno: Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado  
Número económico: 41207

Interno: Dra. Ana María Rosales Torres  
Número económico: 09283

Lugar de realización: Laboratorio de bioquímica de la reproducción de la  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Fecha de inicio y termino: 17 de octubre del 2022 – 17 de abril del 2023

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. MARCO TEORÍCO .....	4
2.1 Células de la granulosa (CG) .....	4
2.1.1 Importancia de IGF-1 en células de la granulosa .....	5
2.2 Hormona folículo estimulante (FSH) .....	6
3. OBJETIVOS .....	6
3.1 Objetivo General .....	7
3.2 Objetivos particulares.....	7
4.1 ..... Colección de folículos y obtención de sacos foliculares de bovinos .....	8
4.2 Número de células de la granulosa por azul de tripán (4%) .....	9
4.3 Cultivo de células de la granulosa .....	9
4.4 Determinación del número de células viables mediante el ensayo MTT .....	10
4.5 Ensayo de ELISA.....	10
6. ACTIVIDADES REALIZADAS .....	11
7. METAS ALCANZADAS .....	11
8. RESULTADOS Y CONCLUSIÓN.....	11
La FSH estimula la síntesis de estradiol y la viabilidad de células de la granulosa de bovino en presencia o no de IGF-1. ....	11
Gráfica 1. Efecto de FSH sobre la producción de estradiol en cultivos de CG de bovino con y sin IGF-1. Literales a y b indican diferencias significativas .....	12
9. DISCUSIÓN.....	13
10. RECOMENDACIONES .....	14
11. REFERENCIAS.....	15

### 1. INTRODUCCIÓN

El folículo es la estructura funcional del ovario, en él se almacena la célula germinal de la hembra que es el ovocito; este folículo está conformado por células como las células de la granulosa (CG) y las células de la teca (CT) las cuales

contribuyen en el desarrollo y maduración del ovocito (Barrios, et al., 2012). Se cree que el origen de las células de las CG es en el epitelio de la superficie del ovario, formando primero a las células pregranulosas que a su vez rodearán a los ovocitos primordiales. Algunos autores han reportado que de tres a cinco células progenitoras en un folículo maduro darán lugar al complemento completo de CG, posteriormente se forma una barrera sangre-folículo compuesto de una lámina basal que separa a las CT interna vascularizada con las CG que no reciben aporte sanguíneo directo restringiendo así el acceso de sustancia de alto peso molecular como las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El estradiol es la principal hormona esteroide producida por CG en respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH), sin embargo, la producción de esta hormona requiere de una colaboración entre las CT que en respuesta a la hormona luteinizante (LH) producen andrógenos tales como: dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediol, androstenediona y testosterona, que se difunden a las CG y así se convierten en estrógenos por medio de la citocromo P450 aromatasa (CYP19A1) (Strauss & Mc Allister, 2014)

El aislamiento de un tipo específico de células provenientes de tejidos u órganos animales que posteriormente se colocan en un medio “artificial” para favorecer su división, crecimiento, multiplicación y en algunos casos diferenciación, se denomina cultivo de células animales y es una herramienta útil para el conocimiento de muchos procesos fisiológicos. En el caso de las CG, dentro de los procesos a estudiar destacan la actividad intracelular, los flujos metabólicos, las interacciones con el medio ambiente, la genética, las interacciones célula-célula y las generaciones de metabolitos de interés como las hormonas esteroides (Tavira et al., 2010). Una herramienta útil para poder evaluar los procesos anteriormente señalados es la extracción y cuantificación de proteínas, estas técnicas permiten aislar proteínas citoplasmáticas y de membrana con la ayuda de detergentes y una acción mecánica para posteriormente poder emplear el extracto puro en ensayos más sofisticados y específicos como lo es la proteómica (Quero, et al., 2016). Esta técnica permitirá evaluar en determinado momento las proteínas funcionales y no funcionales comparado con los diversos tratamientos. Por lo anterior, y debido al interés en el grupo de investigación de conocer los procesos celulares y moleculares

que influyen el funcionamiento de las CG, el objetivo de este trabajo de servicio social es “Desarrollar y perfeccionar la metodología de extracción y cuantificación de proteínas de CG de bovino en cultivo para el análisis de proteómica”.

## **2. MARCO TEORÍCO**

### **2.1 Células de la granulosa (CG)**

El desarrollo folicular es un proceso que involucra interacciones endocrinas, paracrinas y autocrinas presentando distintas etapas que ayudarán a clasificar a los folículos en primordiales, primarios, preantrales, antrales y preovulatorios, gracias a que la maduración del folículo involucra una serie de estadios secuenciales como iniciación, crecimiento, selección, ovulación y luteinización (Barrios, et al., 2012). Al estar compuestos por distintas capas de soporte el folículo ovárico resguarda dentro a la célula germinal; en los folículos antrales se encuentran distintos tipos de células, entre ellas las CG murales y las CG del cúmulo que rodean al ovocito (González Aretia, 2021). Las CG son parte de las células somáticas de los cordones sexuales del ovario y están asociadas al desarrollo del ovocito; produciendo esteroides sexuales y péptidos esenciales para la foliculogénesis y ovulación (Núñez, et al., 2016). Las CG comienzan a proliferar formándose un folículo preantral; este proceso es dependiente de las gonadotropinas y está correlacionado con la producción de estrógenos, progestinas y andrógenos (Barrios, et al., 2012). En el folículo antral la región avascular está compuesta por CG murales, este tipo de células poseen aparato de Golgi, retículo endoplasmático rugoso y liso, sus mitocondrias con alargadas y redondas, así como vesículas pequeñas; estructuralmente las CG del cúmulo son similares a las CG murales, pero presentan funciones específicas para llevar a cabo los mecanismos que se requieren para la síntesis de las hormonas esteroideas (González Aretia, 2021). El ovocito al ser rodeado por células de la granulosa forma la corona radiada y el líquido antral incrementará su volumen al aproximarse la ovulación, este engrosamiento de CG está acompañado de células de la Teca (CT) constituida por dos capas: CT interna que crece rápidamente y CT externa que contienen fibras de tejido contráctil (Barrios, et al., 2012).

La función de las CG está determinada principalmente por la hormona folículo estimulante (FSH), sin embargo, los factores de crecimiento son factores tróficos que se ha observado potencializan el efecto de esta gonadotropina. El factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF-1) es un polipéptido cuya producción es estimulada por la hormona del crecimiento (GH) y cuya estructura es similar a la insulina en un 50% (Conchillo, et al., 2007); se ha demostrado que IGF-1 tiene efectos sobre la sobrevivencia y proliferación de las células foliculares (Guzmán, et al., 2017); además de jugar un papel fundamental en el desarrollo folicular, de acuerdo con Hernández- Coronado et al. (2016) IGF-1 incrementa la secreción de estradiol y favorece la respuesta celular a las gonadotropinas en células de la granulosa en bovinos.

### **2.1.1 Importancia de IGF-1 en células de la granulosa**

Los efectos del IGF-1 en CG, están mediados por la interacción con su receptor de tipo tirosina cinasa. El receptor IGF tipo 1 (IGF-1R) posee un dominio extracelular, transmembrana y uno intracelular al que se une el ATP, sustratos proteicos y están de manera inactiva en forma de monómeros. Cuando IGF-1 se une al dominio extracelular de un monómero, el receptor migra a través de la membrana plasmática para encontrarse con otro monómero para así formar dímeros, posteriormente el receptor se autofosforila y en este estado el receptor es capaz de fosforilar otras proteínas y activar por completo la función enzimática del receptor. Dentro de las vías de señalización que IGF-1 activa está la vía fosfatidilinositol-3-cinasa (IP3K/PKC) mediante la cual inhibe la apoptosis de la célula y la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) para favorecer la proliferación (Guzmán, et al., 2017; Bielski, et al., 2016). Se ha reportado que la hormona folículo estimulante (FSH) e IGF-1 estimulan sinérgicamente la producción de esteroides gonadales. En células de la granulosa se ha demostrado que el IGF-1 potencia los efectos estimulantes de la FSH y el AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) sobre la expresión de genes esteroidogénicos, mientras que al inactivar la actividad del receptor de IGF-1 (IGF-1R) impide la expresión de estos genes, por lo tanto, la producción de estradiol

inducida por FSH en CG es afectada (Murugan, et al., 2013). El IGF-1 está también asociado a otras funciones reproductivas, dentro de ellas se ha encontrado que puede incrementar la respuesta folicular a las gonadotropinas debido a que promueve la síntesis de receptores para estas hormonas. Además de estar involucrado en la liberación de GnRH (Hormona liberadora de gonadotropinas) en la eminencia media del hipotálamo durante la pubertad y el ciclo estral (Guzmán, et al., 2017).

## **2.2 Hormona folículo estimulante (FSH)**

La FSH es una proteína que pertenece a la familia de las glicoproteínas adenohipofisarias y está unida a diferentes moléculas de carbohidratos. Comparte características con la hormona luteinizante (LH) y la hormona tiroestimulante (TSH) como la unión de cadenas laterales de oligosacáridos a un residuo de Asparagina (N) en el caso de la FSH o Treonina (T) o Serina (S) en caso de la LH. Estas hormonas están formadas por subunidades y comparten la subunidad  $\alpha$ , ya que es codificada por el mismo gen. Presentan una secuencia de aminoácidos casi idéntica, que consta de 92 a 96 residuos y tienen dos cadenas de oligosacáridos unidos a N; por otro lado, la subunidad  $\beta$  es específica para cada hormona, siendo codificada por diferentes genes proporcionándole a la hormona especificidad bioquímica e inmunológica. Esta subunidad consta de 111-112 residuos de aminoácidos y presenta dos sitios de glicosilación (Guzmán, et al., 2017; Barrios, et al., 2012). En CG la FSH actúa a través de receptores acoplados a proteína Gs, cuando se activa el complejo hormona-receptor, la subunidad Gas migra a través de la membrana plasmática para activar a adenilato ciclasa (AC) esto a su vez convierte el ATP en AMPc para activar a PKA lo que permite que se fosforilen enzimas esteroideogénicas como la P450arom quien se encarga de transformar los andrógenos provenientes de la teca en estrógenos (Guzmán, et al., 2017).

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo General**

Desarrollar y perfeccionar la metodología de extracción y cuantificación de proteínas de CG de bovino en cultivo para el análisis de proteómica.

### **3.2 Objetivos particulares**

1. Precisar el método de extracción de proteínas de CG en cultivo para estudio de proteómica.

2. Exponer el método de Bradford para cuantificación de proteínas de las CG de bovino en cultivo para proteómica.

3. Relacionar la concentración de proteína extraída en células de la granulosa de bovinos sometidas a distintos estímulos tróficos.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

Este servicio social deriva de un proyecto Conacyt vigente en el cual tenemos el compromiso de analizar extractos de proteínas obtenidos de células foliculares en cultivo y se desarrolla en el laboratorio desde hace ya algunos años. Sin embargo, debido a que manejamos diversos tratamientos, ocupamos material de rastro y para procesar las muestras debemos enviar proteína de calidad, tuvimos que asegurar una buena ejecución experimental, razón por la cual, no se lograron alcanzar los objetivos planteados en este servicio social.

Primero, tuvimos que probar el efecto de la FSH en medio suplementado o no con IGF-1. Este factor de crecimiento ha sido utilizado por diferentes investigadores como un factor trófico basal de las CG por su acción sobre la proliferación, sobrevivencia y esteroidogénesis, por lo que, quisimos asegurarnos que no interfiriera con los efectos de esta gonadotropina. Y segundo, debido a que, para la realización de los cultivos dependemos de ovarios de vacas sacrificadas en rastro y considerando que es muy variable la cantidad de muestras colectadas por día, esto contribuyó aún más en el retraso.

Por lo anterior, consideramos que, aun cuando la alumna Tiare no logró abordar los objetivos planteados, tiene resultados que reportar, es en lo que estuvo trabajando

durante su servicio social y se explica tanto en materiales y métodos como en los resultados.

#### **4.1 Colección de folículos y obtención de sacos foliculares de bovinos**

De un rastro particular ubicado en Temamatla, Estado de México, México se obtuvieron ovarios de vacas sacrificadas. Posteriormente fueron lavados y transportados al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco en solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% con un rango de temperatura de 35 a 36 °C en un lapso no mayor a 120 minutos. Posterior a llegar al laboratorio se retiró el exceso de tejido realizando varios lavados con SSF al 0.9% a 37°C, después un lavado con etanol al 75% y posteriormente más lavados con SSF con la finalidad de quitar exceso de sangre y contaminantes presentes. Los ovarios se mantuvieron a 37°C en SSF y medio de cultivo (10:1) hasta la disección.

Se continuó disecando los folículos de 4-15 mm de diámetro, eliminando los folículos atrésicos y separándolos del estroma ovárico, para posteriormente en una campana de flujo laminar esterilizada realizar una incisión en el folículo para liberar el líquido folicular, el ovocito y exponer el saco en su interior retirando las CT a través de un ligero raspado. Posteriormente los sacos foliculares se lavarán con medio McCoy's 5ª modificado con bicarbonato de sodio (in vitro-ME-043) previamente gaseado y suplementado con 20Mm HEPES (SIGMA H6147), 100 IU/ML de penicilina (P4333-sigma), 0.1 mg/mL de estreptomicina, 3mM L-glutamina (G8540-sigma), 0.1% de BSA (A7030-sigma), 10ng/mL de insulina (I3769-sigma), 1ng/mL de IGF-1 (Gropep). 100µL de testosterona (50µg/mL), 2.5 ug/ml transferrina (T8158-sigma) y 4 ng/mL de selenito (S5261-sigma) en ausencia de suero con el propósito de eliminar en su totalidad los restos CT y el líquido folicular. A cada folículo se le retiró el suero y se expuso la cara interna del saco folicular para posteriormente, hacer un ligero raspado con el fin de separar de la lámina basal de CG. Todas las células fueron ser colocadas en medio McCoy's 5ª modificado y suplementado en cajas Petri para formar Pooles. Cada uno se pasó por un filtro de 70 µm (Cell strainer FALCON a Corning Brand, 352350) para colocarlos en un tubo



de 50mL; a continuación, se lavaron dos veces utilizando 3mL de medio de cultivo gaseado en la incubadora de CO<sub>2</sub>, posteriormente se llevará a cabo una centrifugación a 18000rpm durante 10 minutos para obtener pellet de células. Después se lavó con medio McCoy's 5<sup>a</sup> y después con DPBS 10x (Fosfato Dubuleco con buffer salino; In Vitro-SS-05) y agua estéril (1:10) logrando una solución de DPBS 1X eliminando así los eritrocitos presentes. Primero se añade el agua estéril y se suspenderán las células con ayuda de una micropipeta durante 3 segundos e inmediatamente se adicionará el DPSB 10X y se homogeniza, posteriormente se centrifuga nuevamente para colocarlo en medio McCoy's 5<sup>a</sup> modificado (Hernández Coronado, 2016).

#### **4.2 Número de células de la granulosa por azul de tripán (4%)**

Para realizar el conteo de CG se tomaron 90 µL de la suspensión celular y 10 µL de solución azul Tripán (4%). Esta mezcla fue colocada en una cámara de Neubauer doble para realizar el conteo de las 2 cámaras en 5 cuadrantes de cada una. La siguiente fórmula indicó el número de células totales:

Número de células viables = (Promedio del número de células totales  
contadas en las 2 cámaras) (10,000) (5 cuadrantes) (dilución en mL)

#### **4.3 Cultivo de células de la granulosa**

Las CG fueron cultivadas en placas con 96 pozos con tapa (Thermoscientific, NUNC estéril, 16008), en medio de cultivo McCoy's 5<sup>a</sup> modificado. Previamente las placas se incubaron por 3 horas en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C con 90% de humedad. Posteriormente se sembraron 75,000 células viables, los tratamientos se distribuyeron de la siguiente manera: se sembraron 48 pozos con medio suplementado con IGF-1; control y 1ng/ml FSH y 48 sin suplementar con IGF-1; control y 1ng/ml FSH y se dejaron estableciendo 24 h para después realizar un recambio de medio de cultivo. Las células se incubaron con los tratamientos durante 48 h y se almacenaron las células y los medios de cultivo por separado a -70°C hasta su uso (Hernández Coronado, 2016).

#### **4.4 Determinación del número de células viables mediante el ensayo MTT**

El ensayo de MTT está basado en la reducción metabólica de sales de tetrazolio por el succinato deshidrogenasa (enzima mitocondrial) que a través de NADH y NADPH como coenzimas convierten el tetrazolio a formazán (de amarillo a azul) lo cual permite evaluar la funcionalidad de la mitocondria de las células expuestas a este ensayo determinando la cantidad de células vivas a través de la cantidad de formazán producido en la actividad metabólica (González Aretia, 2021).

Después de haber transcurrido las 48 horas de cultivo, se retiraron 180µL de medio y se adicionaron 20µL de la solución MTT (5mg/mL de Tetrazolio-Sigma M5655) a cada pozo, incubando en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° y 90% de humedad durante 4h. Una vez pasado el tiempo se adicionó a cada pozo de la placa 100 µL de buffer de lisis (5mL de H<sub>2</sub>O destilada, 5mL de N-Dimetilformamida (D4551-sigma), 2 g de SDS (161-0301-50 Biorad), 500 µL de ácido acético 1 N (9507-02- J.T. Baker) y 500 µL de ácido clorhídico 1 N) y se dejaron incubar las CG a temperatura ambiente durante 4 h en total oscuridad y se midió la densidad óptica del medio a 595 nm en un espectrofotómetro Smartec Plus-BIORAD (González Aretia, 2021).

#### **4.5 Ensayo de ELISA**

Los 180µL de medio retirados de la placa durante el ensayo MTT se añadieron a una nueva placa de 96 pozos manteniendo la organización de los tratamientos y cultivos, posteriormente se mantuvo en congelación a -80°C (Ultracongelador Revco ElitePlus). Las concentraciones de estradiol (E<sub>2</sub>) se cuantificaron mediante técnica ELISA con un Kit comercial Bovine Estradiol ELISA KIT. Primero se aseguró el número de pozos necesarios y se dispensaron 25 µL de cada Standard, Control y Muestras, luego se agregaron 100 µL de la solución de conjugado a cada pocillo y se mezcló durante 10 segundos para posteriormente ser incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se lavaron los pocillos 3 veces con 400 µL de solución de lavado, se sacudió energéticamente el contenido de los pozos y realizaron pequeños golpes contra papel absorbente

para eliminar gotas residuales, en seguida se añadieron 100  $\mu$ L de la solución sustrato a cada pocillo y se incubó nuevamente durante 30 minutos, posteriormente se paró la reacción añadiendo 50  $\mu$ L de solución stop a cada pocillo. Finalmente se leyó la placa a 450nm en un espectrofotómetro.

## **6. ACTIVIDADES REALIZADAS**

Durante el tiempo transcurrido de este servicio social realicé diferentes actividades que enriquecieron mi formación académica, participé en prácticas de pipeteo, en disección de folículos ováricos, en recolección de ovarios en las visitas al rastro, realicé prácticas de recambio de medio utilizando simuladores de cultivo celular, apoyé en ensayos ELISA para la determinación de concentración de estradiol, progesterona, esfingosina-1-fosfato, androstenediona y testosterona, realicé la disección de glándulas tiroideas, apoyé en cultivos y ensayos MTT para CG y CT, y en ensayos de extracción de proteínas; además de realizar actividades de limpieza dentro del laboratorio, control de inventario de reactivos, desechables y artículos de limpieza y papelería.

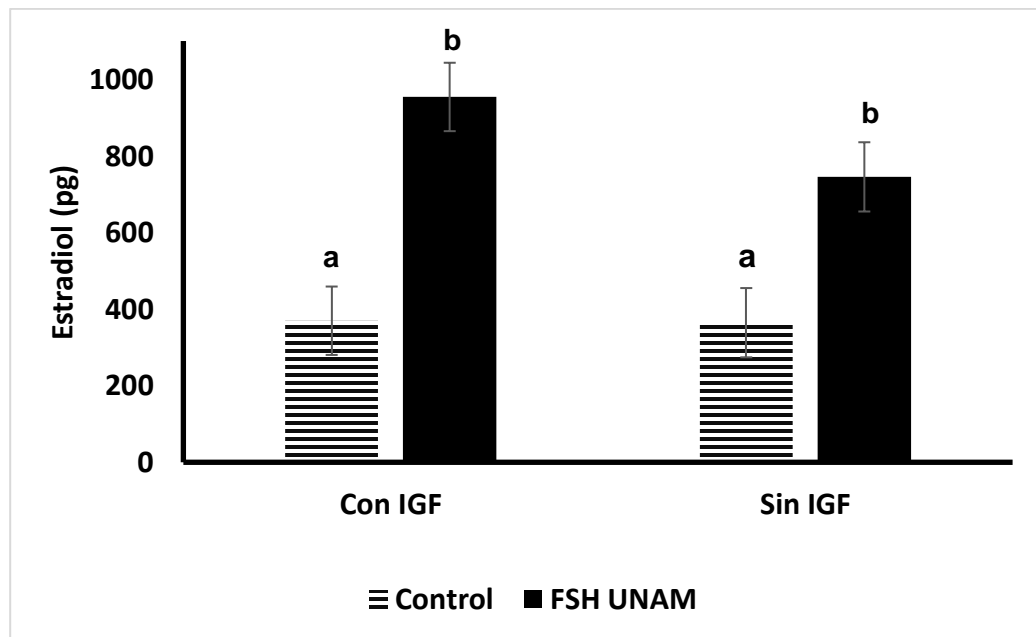
## **7. METAS ALCANZADAS**

En el periodo de tiempo de servicio social en el laboratorio, realicé 10 visitas al rastro para obtener ovarios de bovino o glándulas tiroides y adrenales; apoyé en 10 cultivos de CG , participé en 10 ensayos de MTT de CG, ayudé con 2 ensayos ELISA de estradiol, 2 de progesterona, 2 de androstenediona, 2 de testosterona, 1 de S1P, asistí con 8 pruebas de extracción de proteína de CG, además de consultar aproximadamente 15 fuentes bibliográficas para la realización de este informe y para mi formación dentro del laboratorio.

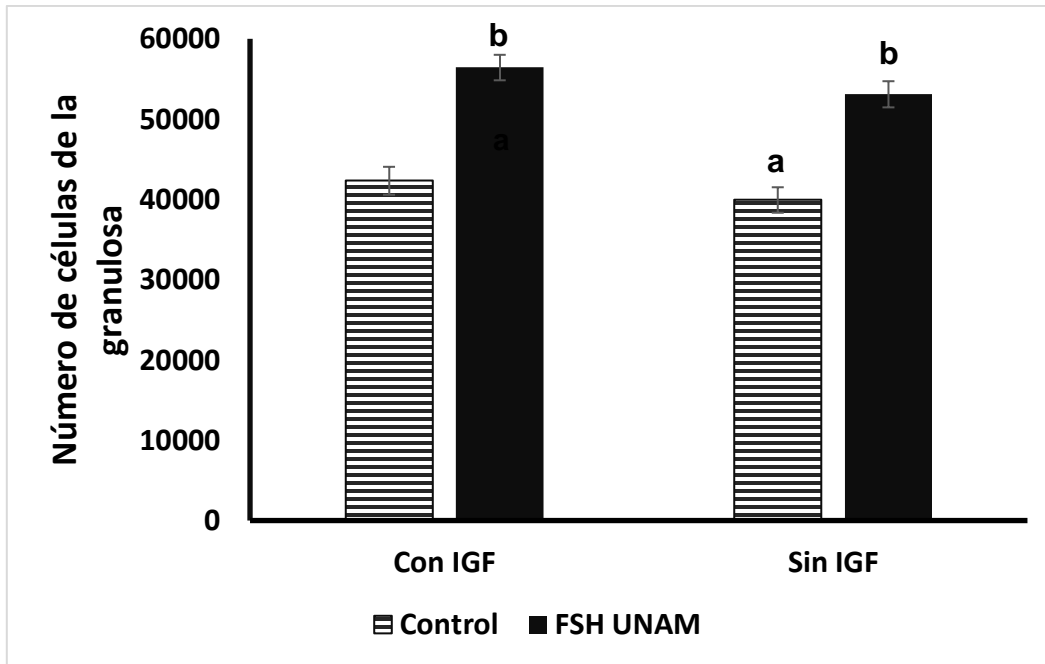
## **8. RESULTADOS Y CONCLUSIÓN**

**La FSH estimula la síntesis de estradiol y la viabilidad de células de la granulosa de bovino en presencia o no de IGF-1.**

Los resultados mostraron que, el uso de FSH (1ng/ml) en CG cultivadas en medio suplementado con IGF-1 (1ng/mL) y sin IGF-1 incrementó tanto la producción de estradiol ( $P < 0.05$ ; Gráfica 1) así como la viabilidad de estas células a las 48h de tratamiento ( $P < 0.05$ ; Gráfica 2). Además, aparentemente hay una tendencia tanto en la viabilidad como en la concentración de estradiol ante el uso de 1 ng/mL de FSH en medio suplementado con IGF-1. Estos resultados nos sugieren que dado que la concentración empleada de IGF-1 es basal, no interfiere con el efecto esperado de FSH sobre la proliferación y síntesis de estradiol.



**Gráfica 1. Efecto de FSH sobre la producción de estradiol en cultivos de CG de bovino con y sin IGF-1. Literales a y b indican diferencias significativas**



**Gráfica 2. Efecto de FSH sobre la viabilidad de CG de bovino en cultivo con y sin IGF-1.**

## 9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indicaron que FSH incrementó la producción de estradiol y la viabilidad en CG de bovino en medio suplementado con y sin IGF-1. Los procesos celulares en el folículo ovárico como la diferenciación, proliferación y supervivencia son regulados por las gonadotropinas, por factores de crecimiento y por las hormonas esteroides (Hernández *et al.*, 2016; Hernández *et al.*, 2019). La FSH está involucrada en el aumento de la vascularización del folículo dominante y en el aumento del tamaño folicular a través de la división por mitosis de CG; la FSH junto con estradiol estimulan la formación de la cavidad antral y la expresión de receptores para LH en CG del folículo preovulatorio, además de que transforma los andrógenos a estradiol mediante la activación de la aromatasa (Smith, *et al.*, 2012). Los factores de crecimiento producidos localmente actúan a través de mecanismos endocrinos, paracrinos y autocrinos regulando el potencial esteroidogénico de las CG; IGF-1 genera una sinergia con FSH para amplificar la producción de estradiol (Murugan *et al.*, 2010). Cultivos de CG

de bovino estimuladas con 50ng/mL de IGF-1 y 25 ng/mL de FSH mostraron una mayor esteroidogénesis y un efecto sobre el número de CG viables (Murugan et al., 2010). Similarmente, Gong *et al.*, (1994) reportaron que FSH (200 ng/ml) e IGF-I (200 ng/mL) en conjunto, incrementaron síntesis de estradiol en células de la CG provenientes de diferentes tamaños de folículos ováricos. De manera similar, Guthrie *et al.*, (1998) demostraron que en cultivos de CG, el uso de IGF y FSH evitó la apoptosis y por lo tanto favorecieron la viabilidad celular. Adicionalmente, Gutiérrez et al., (1997) mostraron que, bajas concentraciones de IGF-I (1ng/mL) estimulan la producción de estradiol y proliferación de CG en cultivo independientemente de las gonadotropinas, estos resultados destacan la acción potencial de este péptido como regulador intraovárico de la función folicular. Estos autores encontraron que, al adicionar 10ng/mL de IGF-1 como suplemento al medio de cultivo y no como tratamiento, incrementó la producción de estradiol por si solo en comparación con el uso de 1ng/mL de FSH como tratamiento, sin embargo, la viabilidad si fue mayor en conjunto y no por si solos (Gutiérrez et al., 1997).

Por lo anterior, aun cuando no se encontraron diferencias entre el uso de medio suplementado con o sin IGF-1 en CG estimuladas con FSH, consideramos que debido a que las concentraciones de IGF-1 empleadas son basales, no se alcanza a percibir un efecto tan marcado sobre la viabilidad y esteroidogénesis de estas células. Sin embargo, es importante destacar que aparentemente si hay un efecto mayor de FSH sobre estos efectos biológicos cuando se emplea como tratamiento en CG de bovino cultivadas en medio suplementado con IGF-1.

## **10. RECOMENDACIONES**

Realizar más cultivos bajo las mismas condiciones de estudio para hacer más evidente la tendencia de que FSH en células de la CG cultivadas en medio

suplementado con IGF-1, aparentemente tiene un efecto mayor sobre la viabilidad y esteroidogénesis.

## 11. REFERENCIAS

1. Barrios, J., Aguirre, A. & Francisco, A., 2012. Desarrollo folicular en el ovario.. *Revista de Salud de Quintana Roo*, 5(19), pp. 12-18.
2. Bielski, L., Orlandi, A. & Boquete, H., 2016. Inhibidores de tirosina cinasa y disfunción tiroidea. *Revista Argentina de Endocrinología y metabolismo*, 53(3), pp. 97-105.
3. Conchillo, M., Prieta, J., Quiroga & J., 2007. Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I) y cirrosis hepática. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99(3), pp. 156-164.
4. Gong, J., Mc Bride, D. & Bramley, T., 1994. steroidogenesis in vitro. *Journal of Endocrinology*, 143(1), pp. 157-164.
5. González Aretia, D., 2021. *La esfingosina 1-fosfato (s1p) como mediador de los efectos biológicos de la hormona folículo-estimulante (fsh) en las células de la granulosa de bovino*, Ciudad de México, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
6. Guthrie, H. D., Garrett, W. M., & Cooper, B. S. (1998). Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biology of reproduction*, 58(2), 390-396.
7. Gutierrez, C. G., Glazyrin, A. L., Robertson, G. W., Campbell, B. K., Gong, J. G., Bramley, T. A., & Webb, R. (1997). Ultra-structural characteristics of bovine granulosa cells associated with maintenance of oestradiol production in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, 134(1), 51-58.
8. Guzmán, A., Rosales, A. M. & Hernández, C., 2017. *Hormonas que regulan la reproducción*. 1ra ed. s.l.:Editorial Academica Española.
9. Hernández C., C. G., 2016. *Moduladores de la producción de S1P y efectos de este esfingolípido sobre la proliferación y sobrevivencia de células de la granulosa de bovino*. , Ciudad de México, México: Universidad Autónoma Metropolitana .
10. Hernández, y otros, 2016. Sphingosine-1-phosphate, regulated by FSH and VEGF, stimulates the granulosa cell replacement.. *Endocrinología General y Comparada*, 236(1), pp. 1-8.

11. Hernández, C. y otros, 2019. Sphingosine-1-phosphate (S1P) in ovarian physiology and disease.. *Annales d'Endocrinologie* , 80(1), pp. 263-272.
12. Murugan, A. y otros, 2013. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Molecular Endocrinology*, 27(3), pp. 511-523.
13. Núñez, J., Vilora, E., Delgado, M. & Romero, R., 2016. Tumor de las células de la granulosa: importancia inmunohistoquímica en el diagnóstico.. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 76(2), pp. 143-149.
14. Quero, S., Párraga, N., García, M. & Sabriá, M., 2016. Proteómica en enfermedades infecciosas. *Microbiología clínica*, 34(4), pp. 253-260.
15. Smith, O. y otros, 2012. Synergistic effects of insulina (IGF-I) and FSH on bovine granulosa cells. *Archivos de zootecnia*, 61(234), pp. 305-308.
16. Strauss, J. & Mc Allister, J., 2014. Defects in Ovarian Steroid Hormone Biosynthesis.. *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, pp. 285-309.