



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

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

**EFFECTO DE LA INSULINA SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS  
Y PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS  
DE LA GRANULOSA DE CABRAS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**VICENTE CASTAÑEDA RODRÍGUEZ**

**TUTOR: DR. HÉCTOR JIMÉNEZ SEVERIANO**

**COMITÉ TUTORAL: DR. EVERARDO GONZÁLEZ PADILLA  
DR. HÉCTOR R. VERA ÁVILA**

**AJUCHITLÁN, QRO.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Cuautitlán, por darme la oportunidad de poder realizar los estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo mediante la beca económica, la cual fue de gran ayuda para realizar los estudios de maestría.

Al Dr. Héctor Jiménez Severiano, Dr. Everardo González Padilla y Dr. Héctor R. Vera Ávila, miembros de mi comité tutorial por el apoyo brindado y haber compartido sus conocimientos.

Al Dr. Eugenio Villagómez Amescua Manjarrez por todo su apoyo brindado para realizar este trabajo.

Al Dr. Jaime Gallegos Sánchez y al Dr. Joel Hernández Cerón por participar en la revisión de la tesis y formar parte de los sinodales para el examen de grado.

A la Dra. Ofelia Mora Izaguirre, Adriana González, Claudia, Laura y Paty del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla Querétaro, así como al Dr. Bojórquez, Susana, Reyna y Mario del laboratorio de Pronabive, por su valiosa ayuda para la realización de los cultivos celulares.

Al Sr. Alejandro por su disponibilidad para tomar las muestras que se utilizaron en los cultivos celulares de esta tesis.

Al MC Mario A. Espinosa por todo su apoyo que fue muy valioso en el escrito de la tesis, Leticia Díaz, al MC Rubén Santos, al MVZ Gerardo Díaz por toda su ayuda proporcionada y Arturo, Daniel, Eliab, Esperanza, Laura, Xochitl y a los compañeros, amigos y todos aquellos que no alcancé a mencionar.

## **DEDICATORIA.**

A mis padres Lucas Castañeda Prudente, Rosalía Rodríguez Villamil y mis hermanos Hugo Castañeda Rodríguez, Guadalupe Castañeda Rodríguez, que siempre me brindaron su apoyo y confianza cuando más los necesite.

## **CONTENIDO**

Resumen

I. Introducción

1. 2. Objetivos

1. 3. Hipótesis

II. Revisión de literatura

2.1. Desarrollo folicular

Crecimiento de los folículos primordiales a folículos preantrales

Factores de crecimiento involucrados en el desarrollo folicular

Reclutamiento folicular

Selección folicular

Folículo dominante

Folículo preovulatorio

2. 2. La insulina sobre la función ovárica

2.3. Participación de IGF's en la función ovárica

Las IGFBP's dentro de los folículos

2.4. El Cromo sobre la sensibilidad a la insulina

III. Materiales y métodos

IV. Resultados

V. Discusión

VI. Conclusiones

VII. Literatura citada

## ÍNDICE DE CUADROS.

	<b>Página.</b>
Cuadro 1. Efecto de la densidad de siembra sobre el número final de células de la granulosa después de 6 días de cultivo y producción promedio de $E_2$ y $E_2$ por 10 mil células durante el primer día del cultivo libre de suero, con diferentes concentraciones de FSH.	25
Cuadro 2. Efecto de FSH sobre el número final de células de la granulosa a los 6 días de cultivo, producción promedio de $E_2$ y $E_2$ por 10 mil células durante el primer día del cultivo libre de suero, con diferentes densidades de siembra.	25
Cuadro 3. Efecto de LR3-IGF-I sobre el número final de células de la granulosa a los 6 días de cultivo y de la producción promedio de $E_2$ y $E_2$ por 10 mil células durante el primer día del cultivo libre, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH a una densidad de siembra de $6 \times 10^4$ .	27
Cuadro 4. Efecto de la insulina sobre el número final de células de la granulosa a los 6 días de cultivo, de la producción promedio de $E_2$ y $E_2$ por 10 mil células de los 6 días del cultivo, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH a una densidad de siembra de $6 \times 10^4$ .	28
Cuadro 5. Efecto del día de cultivo sobre producción promedio de $E_2$ y $E_2$ por 10 mil células de los 6 días del cultivo, en condiciones de cultivo libre de suero, al incluir diferentes dosis de insulina, adicionado con 10 ng/ml de FSH a una densidad de siembra de $6 \times 10^4$ .	29
Cuadro 6. Efecto de la insulina sobre número final de células, de la producción promedio de $E_2$ y $E_2$ por 10 mil células de los 6 días del cultivo, en condiciones de cultivo libre de suero, en el que se probaron diferentes dosis de insulina, en combinación con diferentes dosis de CrCl, adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de $6 \times 10^4$ .	32
Cuadro 7. Efecto del CrCl sobre el número final de células, la producción promedio de $E_2$ y $E_2$ por 10 mil células a los 6 días del cultivo, en condiciones de cultivo libre de suero, en el que se probaron diferentes dosis de CrCl e insulina, adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de $6 \times 10^4$ .	32
Cuadro 8. Efecto del día de cultivo sobre la producción de $E_2$ y $E_2$ por 10 mil células de los 6 días del cultivo, en condiciones de cultivo libre de suero, donde se probaron diferentes dosis de insulina y CrCl, adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de $6 \times 10^4$ .	33

## ÍNDICE DE FIGURAS.

	<b>Pagina.</b>
Figura 1. Producción de E <sub>2</sub> durante el primer día del cultivo en el que se probaron diferentes densidades de siembra, en combinación con diferentes dosis de FSH. Efecto de la interacción densidad de siembra por dosis de FSH.	26
Figura 2. Producción de E <sub>2</sub> x 10 mil células, durante el primer día del cultivo, en el que se probaron diferentes densidades de siembra, en combinación con diferentes dosis de FSH. Efecto de la interacción densidad de siembra por dosis de FSH.	26
Figura 3. Producción de E <sub>2</sub> de los 6 días del cultivo de en el que se probaron diferentes dosis de insulina en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH a una densidad de siembra de 6x10 <sup>4</sup> .	29
Figura 4. Producción de E <sub>2</sub> x 10 mil células, de los 6 días del cultivo, en el que se probaron diferentes dosis de insulina en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH a una densidad de siembra de 6x10 <sup>4</sup> .	30
Figura 5. Producción de E <sub>2</sub> de los 6 días del cultivo, en el que se probaron diferentes dosis de insulina, en combinación con diferentes dosis de CrCl, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de 6x10 <sup>4</sup> .	33
Figura 6. Producción de E <sub>2</sub> x 10 mil células, de los 6 días del cultivo, en el que se probaron diferentes dosis de insulina, en combinación con diferentes dosis de CrCl, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de 6x10 <sup>4</sup> .	34
Figura 7. Producción de E <sub>2</sub> de los 6 días del cultivo de células, en el que se probaron diferentes dosis de CrCl, en combinación con diferentes dosis de insulina, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de 6x10 <sup>4</sup> .	34
Figura 8. Producción de E <sub>2</sub> x 10 mil células, de los 6 días del cultivo, en el que se probaron diferentes dosis de CrCl, en combinación con diferentes dosis de insulina, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de 6x10 <sup>4</sup> .	35

## RESUMEN.

Los objetivos fueron desarrollar un cultivo libre de suero para células de la granulosa de cabra y probar el efecto de FSH, IGF-I, insulina y cloruro de cromo (CrCl) sobre la proliferación y producción de estradiol ( $E_2$ ) de células de la granulosa obtenidas de folículos medianos (3 a 4 mm). Los ovarios fueron colectados de cabras criollas, adultas, entre Noviembre y Febrero. El medio de cultivo base contenía medio McCoy adicionado con 20 mM HEPES, penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100  $\mu$ g/ml), anfotericina (5  $\mu$ g/ml), 3 mM L-glutamina, 0.1% albúmina, testosterona (100 ng/ml), transferrina (2.5  $\mu$ M/ml) y selenito de sodio (4 ng/ml). Inicialmente se probaron diferentes concentraciones de FSH (0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml) y diferentes densidades de siembra (2, 4, 6 y 8  $\times 10^4$  células/pozo); en todos los cultivos subsiguientes se utilizaron  $6 \times 10^4$  células/pozo y 10 ng de FSH/ml, para evaluar lo siguiente: 1. Diferentes concentraciones del análogo de IGF-I, LR3-IGF-I (0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml) y 2. Diferentes concentraciones de insulina (0, 1, 10, 100, 1000 y 10000 ng/ml), sola o en combinación con LR3-IGF-I (1 ng/ml) o CrCl (0, 1 y 20  $\mu$ M/ml). Todos los cultivos tuvieron una duración de 6 días. Las concentraciones de  $E_2$  fueron medidas por RIA; el número de células fue calculado mediante la absorción del colorante rojo neutro. La concentración de  $E_2$  del primer día de cultivo y la proliferación celular fueron analizados como un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Las concentraciones de  $E_2$  en los 6 días de cultivo fueron analizados mediante modelos mixtos con medidas repetidas. En todos los experimentos las concentraciones de  $E_2$  disminuyeron drásticamente después de 24 h de cultivo. La interacción FSH x densidad tendió a ser significativa ( $P=0.08$ ) sobre la concentración de  $E_2$ , no así sobre el número de células ( $P=0.63$ ). Las concentraciones de 1 a 100 ng de FSH permitieron mayor sobrevivencia celular ( $P<0.01$ ), sin efecto sobre  $E_2$ , mientras que a mayores densidades de siembra hubo mayores concentraciones de  $E_2$  ( $P<0.01$ ). Las dosis medias de insulina (10 y 100 ng/ml) tuvieron efecto negativo sobre el número de células, mientras que dosis altas (1000 ng/ml) aumentaron la concentración de  $E_2$  a 24 h de cultivo ( $P<0.01$ ) y permitieron mayor persistencia en la producción de  $E_2$  en los siguientes días. La adición del análogo de IGF-I (1 a 100 ng/ml) favoreció la proliferación celular ( $P<0.0001$ ), sin efecto sobre  $E_2$  ( $P=0.27$ ); además, en combinación con dosis altas de insulina (100 a 10,000 ng/ml) favoreció la proliferación celular ( $P<0.01$ ) y la producción de  $E_2$  ( $P<0.01$ ). La dosis de 1  $\mu$ M de CrCl favoreció la proliferación celular ( $P<0.0002$ ), y la dosis de 20  $\mu$ M de CrCl tuvo efecto negativo sobre sobrevivencia celular y la producción de  $E_2$  ( $P<0.006$ ). Se concluye que FSH e IGF-I favorecen la sobrevivencia y(o) proliferación celular, mientras que la insulina, sola o en combinación con IGF-I favorece la producción de  $E_2$  a 24 h de cultivo y su persistencia en los días subsiguientes. Dosis bajas de CrCl favorece la sobrevivencia celular, pero a dosis alta tiene un efecto negativo sobre la sobrevivencia celular y la producción de  $E_2$ .

Palabras clave: Cabras; Células de la granulosa, Cultivo celular, Estradiol.

## ABSTRACT.

The objectives were to develop a serum-free goat granulosa cell culture system, and evaluate the effects of FSH, IGF-I, insulin and chromium chloride (CrCl) on estradiol (E<sub>2</sub>) production and proliferation of granulosa cells, from medium size follicles (2 to 4 mm). Ovaries were collected between November and February from adult, Creole goats. Cells were cultured in 96-well plates for 6 d, in McCoy's medium supplemented with 20 mM HEPES, penicillin (100 UI/ml), streptomycin (0.1 mg/ml), amphotericin (5 µg/ml), 3 mM L-glutamine, 0.1% BSA, testosterone (100 ng/ml), transferrin (2.5 µg/ml) and sodium selenite (4 ng/ml). Initially, different concentrations of FSH (0, 0.1, 1, 10 and 100 ng/ml), and seeding densities (2, 4, 6 and 8 x10<sup>4</sup> viable cells/well) were evaluated. In the subsequent experiments 6x10<sup>4</sup> cells/well and 10 ng FSH/ml were used to evaluate the effects of the IGF-I analog, LR3-IGF-I (0, 0.1, 1, 10 and 100 ng/ml), and insulin (0, 1, 10, 100, 1,000 and 10,000 ng/ml) on E<sub>2</sub> production and cell proliferation. Estradiol concentrations dropped drastically after 24 h of culture in all the experiments. The effect of FSH by density interaction tended to be significant (P=0.08) for E<sub>2</sub> but not for cell number (P=0.63). FSH (1 to 100 ng/ml) increased cell proliferation compared with control (24,239±3945 vs. 8,994±1464 cells/well; P<0.01), with no effect on E<sub>2</sub>, while greater cell densities increased E<sub>2</sub> (P<0.01). Medium doses of insulin (10 and 100 ng/ml) decreased cell number, while higher doses (1,000 ng/ml) increased E<sub>2</sub> at 24 h of culture (302±54 vs. 172±30 pg/ml; P<0.01), and allowed for E<sub>2</sub> production persistence in the subsequent days, compared with control. The addition of LR3-IGF-I (1 to 100 ng/ml) favored cell proliferation, compared with control (162,079 vs. 38,989 cells/well; P<0.001), with no effect on E<sub>2</sub> (P=0.27); moreover, along with high doses of insulin (100 to 10,000 ng/ml), favored cell proliferation (16,006±1,765 vs. 7,470±824 cells/well; P<0.01) and E<sub>2</sub> (157±55 vs. 11±4 pg/ml; P<0.01) compared with control. The Small doses of CrCl favored cell proliferation (P<0.0002), but the largest doses had a negative effect on cell proliferation and E<sub>2</sub> production (P<0.006). In conclusion, FSH and IGF-I increased cell proliferation capacity, while insulin, alone or along with IGF-I, favored E<sub>2</sub> production at 24 h of culture, and production persistence in the subsequent days. Low dose of CrCl favored cell proliferation, but the highest dose affected both cell proliferation and E<sub>2</sub> production.

Keywords: Goats; Granulosa cells, Cell culture, Estradiol.

## I. INTRODUCCIÓN

Se sabe que las gonadotropinas tienen un papel fundamental en el control del desarrollo folicular ovárico, pero no son las únicas implicadas en este proceso (Campbell *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2004); existen evidencias de que la insulina, al igual que algunos factores de crecimiento, participan durante diferentes etapas del desarrollo folicular (Webb *et al.*, 1994; McNatty *et al.*, 1999). En los ovarios de los rumiantes se han encontrado receptores para insulina, por lo que son un posible blanco para dicha hormona; la expresión del ARNm en las células de la granulosa, teca, lútea y del estroma cambia de acuerdo al avance del desarrollo de los folículos (Spicer y Echterkamp, 1995). Existen estudios donde se ha observado que la insulina es un potente estimulador de la proliferación de las células de la granulosa así como de la actividad esteroidogénica en rumiantes (Spicer *et al.*, 1993). En algunos trabajos se ha observado una correlación positiva entre el nivel de insulina en el suero sanguíneo y la actividad ovárica, previniendo la atresia folicular (Meza-Herrera *et al.*, 2004).

Por otra parte, existen ingredientes dietarios tal como el Cromo, que si bien no aumenta ni estimula la secreción de insulina endógena, puede aumentar la sensibilidad a esta hormona. Este mineral requiere administrarse en su forma trivalente y asociado a moléculas orgánicas (picolinato de Cromo, nicotidinato de Cromo, Cromo metionina), de lo contrario puede ser tóxico o presentar una baja absorción intestinal. El mecanismo mediante el cual el Cromo potencializa los efectos de la insulina no ha sido claramente definido, pero se ha propuesto que la acción biológica del Cromo, depende de su participación en la conformación de la molécula conocida como “Factor de Tolerancia a la Glucosa” o FTG (Mertz, 1988). Otra de las propuestas es que este mineral depende de su unión con un oligopéptido llamado cromodulina (oligopéptido unido al Cromo de bajo peso molecular; LMWCr; Vincent, 2000). La acción primaria del Cromo como complejo Cromo – cromodulina es mediante un sistema de autoamplificación de la señal de la insulina por la activación de la región tirosina cinasa en la subunidad  $\beta$  del receptor a insulina (Davis y Vincent, 1997). Estudios recientes han demostrado que el Cromo favorece la movilización de los transportadores de glucosa, GLUT's 4, hacia la membrana plasmática, con lo cual facilita el transporte de glucosa estimulado por insulina (Chen *et al.*, 2006).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la insulina y del Cloruro de Cromo (CrCl) *in vitro*, sobre la esteroidogénesis y la proliferación de las células de la granulosa de cabras.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 DESARROLLO FOLICULAR

La foliculogénesis ovárica es un proceso dinámico que está caracterizado por la proliferación y diferenciación de células somáticas que componen el folículo. El desarrollo folicular proporciona un microambiente óptimo que favorece la maduración del ovocito, para que éste pueda ser fertilizado posteriormente. Las gonadotropinas, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), tienen una participación primordial en la regulación del desarrollo folicular, mediante mecanismos endocrinos. Aparentemente, las gonadotropinas no están involucradas en el inicio del desarrollo folicular, por lo que en etapas tempranas no son indispensables (Campbell *et al.*, 2003; Webb *et al.*, 2003); sin embargo, las etapas posteriores a la formación del anro son claramente dependientes de estas hormonas, las cuales juegan un papel primordial para el desarrollo final de los folículos, hasta la ovulación. Las gonadotropinas proporcionan los mecanismos principales que controlan el reclutamiento, selección y dominancia folicular. A este sistema se unen otros mecanismos intraováricos (Adashi y Roban, 1992), así como factores de crecimiento locales (Webb *et al.*, 1994; Fortune *et al.*, 2004).

El desarrollo folicular en rumiantes se presenta en forma de oleadas foliculares (con fases de reclutamiento, selección y dominancia), que van desde 1 hasta 4 en cabras, las que culminan con la ovulación al término de la última oleada (Castro *et al.*, 1999). La oleada folicular aparece como un mecanismo constitutivo y esta presente desde antes de la pubertad (Adams *et al.*, 1994), durante la gestación (Ginther *et al.*, 1996). El inicio de una oleada folicular es precedida por un recurrente incremento en la secreción de la hormona FSH en bovinos (Adams *et al.*, 1994), ovinos (Webb *et al.*, 2003), en cerdos esta secreción es determinada y controlada por productos de los folículos dominantes grandes; estradiol e inhibina (Webb *et al.*, 1994), también se considera que tiene efecto sobre la oleada folicular de cabras (Bulnes *et al.*, 2004).

## **Crecimiento de los folículos primordiales a folículos preantrales.**

En la mayoría de los mamíferos los ovocitos se forman durante el desarrollo fetal, de tal forma que al nacimiento se cuenta con un número finito de ovocitos quiescente en la profase meiótica, rodeados de una capa de células alargadas (pre granulosa), formando los folículos primordiales. De esta forma, al nacimiento ya se tiene un número limitado (“pool” o reserva) de folículos primordiales, que entrarán a la etapa de crecimiento a lo largo de la vida reproductiva. Dentro de los folículos primordiales en su inicio y en el desarrollo de los folículos primarios y secundarios existe una independencia de gonadotropinas involucradas en la regulación de la retroalimentación (Campbell *et al.*, 2004). En la oveja algunos folículos primordiales abandonan este estadio durante la vida fetal (Mariana *et al.*, 1991). Estructuralmente, los folículos primordiales están compuestos por el ovocito, desprovisto de zona pelúcida, rodeado de un estrato de células epiteliales planas precursoras de las células de la granulosa y de una lámina basal externa. El índice de atresia de los folículos primordiales es sumamente bajo (Hirshfield, 1991), el inicio de su crecimiento no sólo es independiente de gonadotropinas, sino que al parecer se ve desencadenado por el propio ovocito.

Las gonadotropinas también podrían participar en etapas iniciales del desarrollo folicular, ya que receptores de FSH pueden expresarse y encontrarse en folículos pequeños con sólo una o dos capas de células de la granulosa (Xu *et al.*, 1995), indicando esto que FSH participa en la etapa de folículo pre-antral en el desarrollo folicular en bovinos. En ovejas el tiempo que transcurre desde un folículo primordial hasta que alcanza el tamaño de folículo dominante grande es aproximadamente de 4-6 meses (Gosden *et al.*, 1994).

## **Factores de crecimiento involucrados en el desarrollo folicular.**

En respuesta a la estimulación de FSH, las células de la granulosa sintetizan una serie de factores de crecimiento, estos son de naturaleza peptídica que actúan como reguladores autocrinos, potencializando el efecto estimulante de FSH sobre la actividad aromataza. Los factores de crecimiento pueden ser originados endocrinamente y

también pueden ser producidos localmente dentro de los folículos (Yuan *et al.*, 1996). Estos péptidos regulan paracrinamente la producción de andrógenos en las células de la teca en respuesta a LH (Cahill *et al.*, 1985).

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Perteneciente a esta familia el factor de unión heparina, es producido en células de la granulosa (Neufeld *et al.*, 1987), es un factor de crecimiento que estimula la mitosis en las células endoteliales en el ovario (Berisha *et al.*, 2000). FGFs tienen una potente función sobre la estimulación de la proliferación de células endoteliales (Redmer y Reynolds, 1996). Al parecer participa en la vascularización de la teca durante el desarrollo folicular.

El factor de crecimiento epitelial (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) y beta (TGF- $\beta$ ). EGF es un homólogo de TGF- $\alpha$ , estimula la proliferación de las células de la granulosa, e inhibe la diferenciación (Glister *et al.*, 2003). TGF- $\beta$  son proteínas con un potencial de acción intraovárico, este es un regulador local de la función ovárica, se expresa en células de la teca de mamíferos (Mulheron *et al.*, 1991) y en no mamíferos (Law *et al.*, 1995); en las células de la granulosa y de la teca de bovinos inhibe la proliferación y aumenta la esteroidogénesis mejorando el estímulo de las gonadotropinas sobre la formación de esteroides (Roberts y Skinner, 1991; Campbell *et al.*, 1995). El TGF- $\beta$  modula la acción de FSH, ejerciendo un efecto sobre la expresión de receptores de LH inducida por FSH, altera la esteroidogénesis en las células de la teca, en general inhibiendo la síntesis de andrógenos. EGF inhibe la producción de estradiol de las células de la granulosa, y provoca una inhibición dosis-dependiente en la producción de progesterona (Hsueh *et al.*, 1981). Además, EGF puede inhibir la producción de inhibina y progesterona en células de la granulosa de bovinos (Franchimont *et al.*, 1986).

Citocinas; Las citocinas son producidas en el ovario (Adashi, 1990), modifican la acción de las gonadotropinas sobre las células foliculares e inhiben la esteroidogénesis en las células de la granulosa.

La inhibina y la activina son heterodímeros de glicoproteínas con una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . El sistema de activina/inhibina es un componente importante dentro de los

mecanismos regulatorios intraováricos. La activina e inhibina tienen efectos opuestos sobre ciertas funciones ováricas (Knight y Glister, 2001).

La inhibina es producida por el folículo dominante (Bleach *et al.*, 2001). En el ovario, la inhibina se sintetiza en las células de la granulosa y en el testículo en las células de Sertoli, su actividad está regulada por las gonadotropinas (Hillier y Miro, 1993). La inhibina tiene efectos endocrinos al reducir la secreción de FSH y por lo tanto sus concentraciones plasmáticas (Beard *et al.*, 1990). Además, tiene acciones autocrinas y paracrinas, al incrementar la estimulación de gonadotropinas en la secreción de esteroides en las células de la granulosa y de la teca en ovinos (Campbell *et al.*, 1995). La inhibina mejora la producción de andrógenos inducida por la LH en células de la teca de bovinos (Wrathal y Knight, 1995). Este efecto se ve reducido por la activina, la cual induce la proliferación de las células de la granulosa, así como la expresión de receptores de FSH, y la esteroidogénesis en células de la granulosa, mejorando la actividad aromataza así como la producción de estradiol, por lo que retrasa el inicio del proceso de luteinización (Knight y Glister, 2001). La inhibina, al tener efectos sobre la supresión de la secreción de FSH hipofisaria, juega un papel activo en el proceso de selección y dominancia folicular.

La activina regula negativamente la producción de andrógenos en las células de la teca inducida por la LH, y en células de la granulosa, se ha observado *in vitro* que la activina actúa de manera autocrina para promover la respuesta de FSH en células de la granulosa indiferenciadas (Findlay, 1993; Knight, 1996); en la etapa dependiente de FSH del folículo hay un incremento en el tono de activina (Glister *et al.*, 2006). Se ha observado que la diferenciación de las células de la granulosa durante el periodo preantral puede ser estimulada por la activina sola o con la adición de FSH, induciendo en ellas la capacidad de respuesta a FSH y evitando la luteinización prematura de las células de la granulosa en periodos posteriores (Findlay, 1993). La activina promueve el desarrollo de los folículos preantrales y del ovocito en ovinos (Fiona *et al.*, 2003).

La folistatina es una glicoproteína monomérica con una alta afinidad al sitio de unión de la activina (Knight y Glister, 2001). La folistatina inhibe la liberación de FSH de las células hipofisarias en cultivo celular. A nivel intrafolicular, regula la función de las células de la granulosa favoreciendo los procesos de luteinización y atresia,

neutralizando los efectos de la activina. Ejerce un efecto directo sobre el metabolismo de la progesterona en las células de la granulosa (Xiao *et al.*, 1990; Xiao y Findlay, 1991).

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF): El VEGF estimula la mitosis de las células endoteliales e incrementa la permeabilidad vascular y la angiogénesis (Martínez – Chequer *et al.*, 2003; Ferrara *et al.*, 2003). Las células de la granulosa son la mayor fuente de VEGF en los folículos (Robinson *et al.*, 2004) y su síntesis *in vitro* puede ser estimulada por las gonadotropinas (Schams *et al.*, 2002).

### **Reclutamiento folicular.**

Reclutamiento es el proceso por medio del cual los folículos comienzan su maduración en un medio con la suficiente estimulación de gonadotropinas. El reclutamiento folicular se asocia con el inicio de la expresión simultánea de mRNA P450<sub>scc</sub> y P450<sub>aromatasa</sub> en las células de la granulosa dentro del “pool” de folículos reclutados (Bao *et al.*, 1998), lo que se puede observar en las células de la granulosa en bovinos. La inducción de mRNA de P450<sub>scc</sub> y P450<sub>aromatasa</sub> expresados en las células de la granulosa es probablemente estimulada por el creciente aumento de las concentraciones de FSH observadas antes del reclutamiento en bovinos (Roche y Boland, 1991; Bao *et al.*, 1997b; Garverick *et al.*, 2002). El aumento de la FSH en ovejas y bovinos, estimula el desarrollo de un número de folículos antrales que comienzan a adquirir algunas propiedades claves tal como el aumento de P450<sub>scc</sub> y P450<sub>aromatasa</sub> (Gaverick *et al.*, 2002). La fase de reclutamiento es seguida por una disminución de FSH debido a la retroalimentación negativa por el estradiol e inhibina de los folículos reclutados y de la selección folicular. Se produce un incremento en la producción de este esteroide como consecuencia de la creciente sensibilidad a FSH, del aumento en la producción de andrógenos y receptores de LH en las células de la teca (Fortune, 1986). La hormona LH es esencial con posterioridad en un periodo previo de estimulación de FSH puesto que induce la diferenciación de las células de la teca, las que adquieren una capacidad de síntesis de andrógenos, especialmente androstenediona (Fortune *et al.*, 1988). Así la hormona FSH induce la actividad aromatasa en las células de la granulosa, la cual aumenta paulatinamente en el transcurso de esta fase de

crecimiento; no obstante las concentraciones de estradiol no son significativas en el fluido folicular hasta que los folículos llegan a alcanzar un diámetro medio (McNatty *et al.*, 1992). El aumento de estradiol en la circulación reduce los niveles basales de FSH mediante una retroalimentación negativa (Fortune, 1994), en bovinos una disminución en la concentración circulante de FSH promueve una rápida divergencia en el tamaño del futuro folículo dominante y un folículo subordinado grande (Kulick *et al.*, 1999). La LH llega a tener un papel importante conforme avanza el desarrollo y maduración de los folículos (Lucy *et al.*, 1992), cuando se da la diferenciación celular se expresan los primeros receptores de FSH en las células de la granulosa (McNatty *et al.*, 1992) y LH en las de la teca. A medida que termina esta fase del desarrollo, los folículos reclutados dependen para su mantenimiento de FSH, la cual les permite mantener la actividad aromatasas en las células de la granulosa, así como de LH para generar un nivel suficiente de andrógenos, que las células de la granulosa aromatizan y transforman en estradiol. Un incremento en las concentraciones de estradiol en un futuro demuestran la existencia de un folículo dominante (Ginther *et al.*, 2002). La ausencia o en su caso el exceso de hormonas esteroides, compromete la función y fertilidad de los ovarios (Drummond *et al.*, 2006). Al evitar el descenso de las concentraciones plasmáticas de FSH en el momento de su descarga preovulatoria, permite el reclutamiento de folículos adicionales e incrementar la tasa de ovulación (Henderson *et al.*, 1988).

### **Selección folicular.**

Es el proceso donde uno o más folículos, dependiendo de la especie y la raza, es (son) escogido(s) desde el grupo de folículos medianos para continuar su desarrollo hasta la ovulación. La selección folicular es estimulada por FSH y LH para establecer y mantener la dominancia folicular (Gong *et al.*, 1996). La selección del folículo dominante en bovinos parece ocurrir entre 36 y 48 horas después de iniciar la primer oleada folicular (Bao *et al.*, 1997b), y está asociado con la expresión de mRNA para LHr y 3 $\beta$ -HSD en las células de la granulosa (Bao *et al.*, 1998). En la selección folicular las células de la granulosa adquieren receptores para LH siendo esto esencial para el posterior desarrollo del folículo (Webb *et al.*, 2003).

Los folículos antrales, con elevada actividad aromatasa son capaces de mantener un medio altamente estrogénico, lo cual mediante “feed-back” negativo inhibe la secreción de FSH, asegurando así que el resto de los folículos dependientes de gonadotropinas no reciban el suficiente aporte de FSH y sufran el proceso de atresia (McNatty, 1982).

La actividad aromatasa ya está presente en los folículos antrales pequeños, sin embargo, la producción de estrógenos en esta etapa del desarrollo folicular es limitada por la incapacidad de producir andrógenos (Carson *et al.*, 1981). El incremento en las concentraciones de estradiol folicular se encuentra asociado con el aumento de la frecuencia de los pulsos de LH después de la regresión del cuerpo lúteo, hecho que estimula la producción de andrógenos en las células de la teca (Hampton *et al.*, 2004). En bovinos los receptores para estradiol están presentes en células de la granulosa y de la teca (Schams y Berisha, 2002). Los receptores a estradiol se localizan en las células de la granulosa de folículos pequeños, medianos y grandes (Rosenfeld *et al.*, 2001). Los estrógenos también son responsables en la diferenciación de las células de la granulosa incluyendo la inducción de receptores para FSH, LH y prolactina (Bleach *et al.*, 2001).

El mecanismo de selección folicular en especies monoovulatorias podría operar mediante la activación de factores intraováricos con capacidad de alterar la viabilidad de folículos vecinos, modificando así el número de folículos antrales (Cahill *et al.*, 1985). La entrada de folículos al “pool” de folículos dependientes de gonadotropinas tiene lugar continuamente (Schvick *et al.*, 1993). Existe un umbral de estimulación con FSH por encima del cual tiene lugar las últimas fases del desarrollo folicular, y no prosiguen si la concentración mínima de FSH requerida no está presente. El comienzo del mecanismo de selección requiere una inducción inicial crítica de actividad aromatasa y capacidad de respuesta a LH, de tal manera que cuando el umbral de FSH se alcanza en un folículo (Hillier *et al.*, 1988), éste será el primero en aromatizar andrógenos tecales y en la producción de estrógenos, lo que a su vez sensibiliza a las células de la granulosa al efecto de FSH, de este modo las células de la granulosa quedan protegidas de los posteriores descensos en las concentraciones plasmáticas de esta hormona. Un incremento en la síntesis de IGF-I puede estimular la actividad aromatasa e incrementar el número de receptores para LH (Adashi *et al.*, 1985b).

### **Folículo dominante.**

Dominancia es el proceso en donde el folículo puede llegar a mantenerse sobre los demás folículos reclutados (Hodgen, 1982). Los folículos dominantes tienen una mayor vascularización y una mayor captación de gonadotropinas comparados con otros folículos de etapas tempranas, por lo que el grado de vascularización folicular juega un papel crítico en la selección del folículo ovulatorio (Zelenik *et al.*, 1981). Después de la selección, el folículo dominante desde la primer oleada folicular continua su desarrollo, se da la expresión de mRNA para receptores a gonadotropinas, enzimas esteroideogénicas y un incremento en las células de la teca y de la granulosa (Bao *et al.*, 1997a, b, c). Los cambios intrafoliculares que distinguen a un folículo a ser dominante es el aumento en su capacidad de producir estradiol y mantener niveles bajos de IGFBPs (Austin *et al.*, 2001).

El folículo dominante tiene una mayor concentración de estradiol (Ginther *et al.*, 2001). Los andrógenos, principalmente androstenediona y testosterona, son producidos en las células de la teca en respuesta a LH (Mihn *et al.*, 1997), los andrógenos se activan vía receptores (AR), que se localizan en las células de la granulosa, células del estroma (Tetsuka *et al.*, 1995), en humanos en células de la teca (Horie *et al.*, 1992), y recientemente en rata, cerdo y ratón (Gill *et al.*, 2004). La expresión de AR es muy alta en células de la granulosa de folículos preantrales y antrales en ovarios de primates (Weil *et al.*, 1999), folículos pequeños preantrales y en el inicio de antrales de ovarios de bovino, rata (Tetsuka y Millier, 1996), folículos antrales pequeños de cerdos (Szoltys y Slomczynska, 2000) y de folículos secundarios y dominantes en ovarios de humanos (Horie *et al.*, 1992). Sobre la diferenciación de las células de la granulosa, como un indicador de esto se da un incremento en la producción de progesterona y estradiol (Hillier y De Zwart, 1981), y juegan un papel importante en la maduración del ovocito, el IGF-I es regulado por los andrógenos.

### **Folículo preovulatorio.**

En especies con sólo una ovulación el folículo ovulatorio es seleccionado desde los folículos antrales de 2 a 3 mm de diámetro (Scaramuzzi *et al.*, 1993; Campbell *et al.*,

1995). El aumento de la frecuencia pulsátil de LH, permitido por las bajas concentraciones de progesterona, mantiene el desarrollo del folículo dominante (Stock y Fortune, 1993; Savio *et al.*, 1993). Aunque es claro que el inicio del desarrollo folicular no es dependiente de gonadotropinas, sin embargo FSH es requerida en etapas intermedias del desarrollo folicular y LH es indispensable en la etapa final (Gong *et al.*, 1996). La densidad de receptores de LH aumenta a medida que avanza el periodo preovulatorio. Este hecho forma parte del proceso final de maduración, lo que asegura que la ovulación tendrá lugar como consecuencia de la descarga preovulatoria de LH. Las células de la granulosa son altamente sensibles tanto a FSH como a LH (McNatty *et al.*, 1990), y la actividad aromatasa es máxima con un incremento en las concentraciones de estradiol e inhibina.

Las células de la granulosa muestran sus primeros receptores para LH cuando los folículos alcanzan un diámetro de 3.5 mm en ovejas, de 9-10 mm en vacas y 5 mm en cerdos (Campbell *et al.*, 2003), esta es una de las características de un folículo maduro ovulatorio, con una alta expresión de la aromatasa dentro de las células de la granulosa, altas concentraciones de estradiol en el fluido folicular y una inducción de receptores para LH en estas células (Webb *et al.*, 2003).

Durante la fase folicular, y después de la regresión completa del cuerpo lúteo, las concentraciones plasmáticas de progesterona descienden, permitiendo la liberación pulsátil de GnRH y LH en una frecuencia de hasta un pulso por hora (Baird, 1978), cuando la producción de estradiol en el folículo alcanza un nivel suficiente, lo cual desencadena el incremento preovulatorio de GnRH y LH, que causa la ovulación 24 horas después.

## **2. 2. LA INSULINA SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA.**

Los factores extraováricos, intraováricos y algunos otros factores ambientales, tales como la nutrición, son reguladores de la actividad ovárica y pueden llegar a alterar esta actividad. Esto puede estar relacionado a cambios en las concentraciones de las hormonas metabólicas, como la insulina, IGF-I, GH, y leptina (Webb *et al.*, 2004).

Se ha reportado que los ovarios de rumiantes tienen receptores para insulina (Spicer y Echterkamp., 1995). Se tienen reportes donde se ha observado que la insulina es un potente estimulador de la proliferación de las células de la granulosa al igual que la actividad esteroideogénica en rumiantes (Spicer *et al.*, 1993). En algunos estudios se ha reportado una correlación positiva entre las concentraciones séricas de insulina con una mayor tasa de ovulación, debido probablemente a una menor tasa de atresia folicular (Meza-Herrera *et al.*, 2004). La insulina puede tener un efecto directo sobre el ovario (Gutiérrez *et al.*, 1997a).

Algunas hormonas metabólicas, como la insulina, tienen una función importante en el desarrollo folicular y probablemente son mediadores del efecto de la dieta sobre la tasa ovulatoria (Gutiérrez *et al.*, 2002). El aumento en la dieta puede causar un aumento en la concentración de insulina, la cual tiene un efecto sobre la esteroideogénesis de las células de la granulosa de folículos pequeños de bovinos (Armstrong *et al.*, 2002b). La insulina y algunos factores de crecimiento regulan la función de los ovarios de tal manera que son importantes sobre la respuesta ovárica a las gonadotropinas (Poretsky *et al.*, 1999).

La nutrición modula la concentración de insulina durante el principio de la lactación, lo cual mejora la ovulación post parto, por lo que es posible entonces disminuir los problemas de fertilidad, manipulando apropiadamente la nutrición (Gong *et al.*, 2002). El incremento nutricional mejora la tasa ovulatoria en ovejas, tal vez por un estímulo directo sobre la foliculogénesis, principalmente sobre el reclutamiento y la selección folicular, las cuales son independientes de cambios en la concentración circulante de FSH (Gutiérrez *et al.*, 2002). En bovinos se ha reportado que al ofrecer dos veces el requerimiento nutricional de mantenimiento, se produce un cambio en la concentración circulante de hormonas metabólicas como insulina e IGF-I, teniendo un efecto sobre el potencial esteroideogénico de las células de la granulosa al aumentar la actividad aromatasas de folículos pequeños (1-4 mm), regula la dominancia folicular en bovinos (Armstrong *et al.*, 2002b).

Un incremento en el número de folículos pequeños se asocia positivamente con la concentración circulante de insulina, con esto se dice entonces que un aumento en la nutrición puede llegar a tener un efecto sobre el reclutamiento folicular en vaquillas

ciclando (Gutiérrez *et al.*, 1997a). Dosis suprafisiológicas de insulina son capaces de incrementar la producción de estrógenos y progesterona en respuesta a LH.

### **2. 3. PARTICIPACIÓN DE IGF'S EN LA FUNCIÓN OVÁRICA.**

El sistema de IGFs (factor de crecimiento parecido a insulina), se encarga de modular la acción de las gonadotropinas a nivel celular, estimulando la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y de la teca (Adashi *et al.*, 1985a), y tiene sinergia con las gonadotropinas para promover la diferenciación de las células de los folículos (Spicer y Echterkamp, 1995). Se ha reportado la producción de IGF en ovarios de mamíferos (Adashi y Roban 1992; Giudice, 1992) y no mamíferos (Armstrong *et al.*, 1996a). En bovinos se observan receptores a IGF-I en folículos pequeños, medianos y grandes (Bao *et al.*, 1997b). En ovejas IGF-I, actuando en sinergia con FSH, estimula la proliferación celular y la producción de estrógenos de las células de la granulosa *in vitro* (Glister *et al.*, 2001), lo que mejora la sensibilidad de las células de la granulosa a FSH (Spicer y Echterkamp, 1995), aisladas desde folículos pequeños (3.5mm), folículos que responden a gonadotropinas (Campbell *et al.* 1996; Armstrong *et al.*, 1996a) incrementa la secreción de inhibina, activina y folistatina desde las células de la granulosa, aunado con FSH incrementa el tono de la activina en las células de la granulosa (Glister *et al.*, 2001), incrementa el estímulo de LH para la síntesis de andrógenos (Stewart *et al.*, 1995). El estradiol promueve la síntesis de IGF-I (Spicer y Chamberlain, 2000). El IGF-II se ha detectado en las células de la teca en folículos antrales de bovino, participando como uno de los principales IGFs en el crecimiento de los folículos antrales y preantrales (Webb *et al.*, 2003). El efecto de IGFs exógeno inhibe la actividad folicular y la sobrevivencia de folículos primordiales *in vitro* (Fortune *et al.*, 2004).

#### **Las IGFBPs dentro de los folículos**

La bioactividad de IGF es regulada por sus proteínas ligadoras, las IGFBP's, que participan en la selectividad de unión de los IGF's (Davidson *et al.*, 2002), esto es importante durante la selección y dominancia folicular, donde existen altos niveles de

IGFBP's. Se producen en las células de la granulosa, la FSH atenúa la liberación de IGFBP, lo que mejora la bioactividad para IGFs al reconocer a su receptor, promoviendo FSH la biosíntesis de progesterona (Adashi y Roban 1992). La producción de IGFBP en ovinos es regulada por IGF y gonadotropinas (Armstrong *et al.*, 1996a). Los IGFs participan en la selección del folículo dominante (Hampton *et al.*, 2004). IGF-I en células de la granulosa e IGF-II en las células de la teca se incrementan cuando IGFBP-2 es reducido en los folículos dominantes (Bao *et al.*, 1998). En ovinos el desarrollo folicular es asociado con una disminución de IGFBP-2 y -5, mientras que el inicio de la atresia folicular se asocia con el incremento de la expresión folicular de IGFBP-4 y -5 (Armstrong *et al.*, 1996a; Besnard *et al.*, 1996a, b). IGFBP-2 y -4 se localizan en células de la granulosa y de la teca (Armstrong *et al.*, 1998) en bovinos (Armstrong *et al.*, 1996b) y ovejas (Besnard *et al.*, 1996b). La dominancia folicular en bovinos se asocia con la adquisición de IGFBP-4. La actividad de IGFBP-4 proteasa puede ser inducida *in vitro* por la FSH, lo que incrementa el desarrollo de folículos co-dominantes (Rivera *et al.*, 2001).

#### **2. 4. EL CROMO SOBRE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA**

Uno de los microminerales considerado como esencial o necesario para una o varias funciones del organismo humano, bajo concentraciones baja o altas es el Cromo. Se dice que algunas alteraciones en la secreción y en la acción de la insulina se han relacionado con un cambio en las concentraciones de Cromo o del Zinc (Gómez y Magaña, 2004).

El Cromo químicamente existe en diversos estados de oxidación los que van desde -2 hasta +6. Entre los estados de oxidación que son más estables se considera al trivalente ( $+3$ ) y al hexavalente ( $+6$ ). El  $Cr^{+3}$  es considerado como la forma con más estabilidad química el cual se enlaza con algunos ligandos que contienen nitrógeno, oxígeno o radicales sulfuro, formando complejos octaédricos. Por el contrario, el  $Cr^{+6}$  es tóxico para el organismo (Berner *et al.*, 2004).

La absorción de Cromo se lleva a cabo en el intestino delgado, especialmente en el yeyuno. Su mecanismo de acción aún no se conoce precisamente, pero se cree que

puede ser por difusión o por medio de una proteína transportadora. Algunos aminoácidos como la metionina y la histidina, al igual que la vitamina C pueden favorecer la absorción del Cromo; por el contrario, los fitatos y los antiácidos inhiben dicha absorción (Dowling *et al.*, 1990; Seaborn *et al.*, 1990). Dentro del organismo los órganos que almacenan Cromo son el riñón, hígado, corazón, páncreas y hueso; su excreción es principalmente por los riñones y en cantidades menores a través del sudor, heces y por el cabello (Striffer *et al.*, 1993).

Se ha propuesto un mecanismo mediante el cual el Cromo potencializa los efectos de la insulina, es que participa en la conformación de la molécula conocida como “Factor de Tolerancia a la Glucosa” o FTG (Mertz, 1993). También se ha propuesto que el Cromo depende de su unión con un oligopéptido llamado cromodulina (oligopéptido unido al Cromo de bajo peso molecular) (Vincent, 2000). La acción primaria del Cromo como complejo Cromo-cromodulina es mediante un sistema de autoamplificación de la señal de la insulina por la activación de la región tirosina cinasa en la subunidad beta del receptor a insulina (Davis *et al.*, 1997).

La activación del mecanismo de acción para la región tirosina cinasa en el receptor de insulina, comienza mediante la unión de la insulina con su receptor lo que permite la entrada del Cromo existente a las células que son dependientes de insulina; dentro de la célula el Cromo se une a la apocromodulina (forma inactiva de la cromodulina que no tiene iones de Cromo) y se convierte en cromodulina la cual se une al receptor de insulina y activa la cascada de las cinasas (Vincent, 2000; Sun *et al.*, 2000).

En el caso de rumiantes, la suplementación con fuentes orgánicas de Cromo, tiene un efecto inmunomodulador en vacas lecheras durante el periodo de periparto y principios de la lactación y puede aminorar el estrés en terneros (Burton *et al.*, 1993), aumenta la producción láctea en el periodo de posparto (Smith *et al.*, 2005), mejorando la acción de la insulina en periodo de periparto (Hayirli *et al.*, 2001). Además, la suplementación con Cromo reduce los problemas de posparto relacionados con un consumo bajo de la dieta, reduciendo la lipólisis y permitiendo un incremento en el consumo de alimento (McNamara y Valdez, 2005). En vacas, el Cromo incrementa la tasa de gestación en los primeros 28 días de la estación de apareamiento, al igual que

disminuye la concentración de ácidos grasos no esterificados en la circulación a principios de la lactación (Bryan *et al.*, 2004), y aunque de manera inconsistente, modifica los perfiles circulantes de metabolitos y hormonas metabólicas en borregos, lo que puede ser afectado por el nivel de proteína en la dieta (Gentry *et al.*, 1999).

Diversas investigaciones en cerdos han demostrado que la suplementación con Cromo mejora la calidad de la canal al incrementar la capacidad de retención de agua (Shelton *et al.*, 2003), aumentar la tasa de desaparición de glucosa y de su vida media en cerdos en crecimiento, al incrementar aparentemente los efectos generales de la insulina (Amoikon *et al.*, 1995) y su respuesta es dependiente de la forma y cantidad del Cromo suplementado (Anderson, 1997).

Se tienen evidencias de que el Cromo moviliza los transportadores de glucosa (GLUT4), a la membrana plasmática en células 3T3-L1 de adipocitos, reduce el colesterol en la membrana plasmática, con lo cual se incrementa la fluidez de la membrana y, de esta forma, se facilita la inserción de los GLUT4 en la membrana, lo que mejora la tolerancia a la glucosa y disminuye los niveles de colesterol circulantes (Chen *et al.*, 2006).

## **1.2. Objetivo.**

1. Estandarizar un sistema libre de suero para el cultivo *in vitro* de células de la granulosa de cabras, para evaluar el efecto de la adición de FSH, IGF-I e insulina sobre la producción de estradiol (E<sub>2</sub>) y proliferación celular.
2. Evaluar el efecto del Cromo sobre la sensibilidad de las células de la granulosa hacia la insulina, en términos de capacidad esteroideogénica y proliferación celular.

### **1.3. Hipótesis.**

La adición de cloruro de Cromo al medio de cultivo mejorará la sensibilidad de las células de la granulosa de cabras hacia la insulina, lo cual se reflejará en una mayor proliferación y capacidad de esteroidogénesis *in vitro*.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Materiales y reactivos**

Medio Mc Coy's 5<sup>a</sup>, penicilina (10,000 UI/ml)-estreptomicina (10,000 µg/ml), L-glutamina (200 mM/ml), anfotericina (250 µg/ml), fueron comprados a Gibco; insulina bovina (10 mg/ml), FSH ovina, LR3-IGF-I, HEPES (1mM), transferrina (10 ng/ml), selenito de sodio (20 µg/ml), CrCl, colorante rojo neutro y azul Trypan fueron comprados a Sigma, testosterona (100 ng/ml), fue comprado a Fluka.

#### **Aislamiento de las células de la granulosa.**

Los ovarios fueron obtenidos de cabras criollas adultas, sacrificadas en el rastro de Santiago de Querétaro, Qro. 37' latitud norte, 100° 28' longitud oeste, 1825 msnm y en el de San José Iturbide, Gto. 21° 07' latitud norte, 100° 32' longitud oeste 2100 msnm durante los meses de noviembre de 2006 a febrero de 2007. No se conocía la etapa del ciclo estral al momento del sacrificio. Se colectaron ovarios de por lo menos 5 cabras recién sacrificadas por cada cultivo realizado.

Inmediatamente después de colectar los ovarios, estos fueron lavados con solución salina fisiológica, colocados en medio de cultivo a 4 °C (Medio Mc Coy's 5<sup>a</sup>, adicionado con 20 mM de Hepes, 2.5 µg/ml de transferrina, 4 ng/ml de selenito de sodio, 10,000 UI/ml de penicilina, 10,000 µg/ml de estreptomicina, 3 mM L-glutamina, 0.1% albúmina, 100 ng/ml testosterona y 250 µg/ml de anfotericina), en completa ausencia de suero, (este medio de cultivo se utilizó para todos los cultivos celulares realizados) y transportados al laboratorio en un tiempo aproximado de 3 a 4 horas. Los ovarios fueron lavados con etanol al 70% por 30 segundos, después se enjuagaron con PBS y se mantuvieron en medio de colección a 4 °C hasta su disección. Los folículos visibles en los ovarios, fueron obtenidos mediante disección roma con unas micro pinzas de disección y se clasificaron de acuerdo a su diámetro (Yu *et al.*, 2005), en pequeños (<3mm), medianos (3 a 5mm) y grandes (>5mm), pero para los cultivos se utilizaron sólo los folículos medianos. Después de la disección los folículos fueron

lavados con etanol al 70% y colocados en una caja de Petri con medio de cultivo, se procedió al disgregado con unas micro pinzas de disección. La suspensión resultante se homogeneizó y centrifugó a 800 g durante 5 minutos, al pellet obtenido (fracción rica en células de la granulosa) se le realizó un lavado con medio de cultivo, se volvió a centrifugar a 800 g durante 5 minutos. Al finalizar el procedimiento de centrifugación, el pellet se resuspendió en medio de cultivo, se procedió a estimar el número y la viabilidad de las células de la granulosa en un hemocitómetro usando el método de exclusión del colorante azul Trypan (Campbell *et al.*, 1996), ver más adelante.

### **Cultivos celulares.**

Las células fueron cultivadas en cajas de cultivo de 96 pozos, en 200  $\mu$ l de medio de cultivo. Las células de la granulosa fueron incubadas en un ambiente húmedo a 37 °C, con 3.8 % de CO<sub>2</sub> y mantenidas por 6 días, el medio de cultivo se les cambio diariamente y se guardo a -20 °C hasta que se analizó mediante RIA para medir la concentración de estradiol. Al término del cultivo se determinó el número de células de la granulosa viables mediante la prueba de incorporación de rojo neutro (Gutiérrez *et al.*, 1997b).

Cultivo I. Efecto de la densidad de siembra de células de la granulosa y concentración de FSH sobre la proliferación y la esteroidogénesis de células de la granulosa de cabras. Con la finalidad de determinar la densidad optima de siembra y la concentración idónea de FSH, para utilizar en los cultivos siguientes, se utilizaron cuatro densidades de siembra (2, 4, 6 y 8 x10<sup>4</sup> células por pozo), por cuadruplicado. A cada pozo se le adicionaron 200  $\mu$ l de medio de cultivo y se probaron diferentes concentraciones de FSH (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml).

Cultivo II. Efecto de la adición de un análogo de IGF-I (LR3-IGF-I), al medio de cultivo sobre la proliferación y la esteroidogénesis de células de la granulosa de cabras. En este cultivo se probaron varias concentraciones del análogo de IGF-I, LR3 IGF-I (0.1, 1, 10, 100 ng/ml), el cual es 10 veces más potente que el IGF-I natural (Gutiérrez *et al.*, 1997b). Con base en los resultados del experimento anterior, se utilizó una densidad de siembra de 6x10<sup>4</sup> células por pozo, adicionado con 10 ng/ml de FSH.

Cultivo III. Efecto de la adición de insulina al medio de cultivo conteniendo una densidad de siembra celular de  $6 \times 10^4$  y 10 ng/ml de FSH, sobre la proliferación y la esteroidogénesis de células de la granulosa de cabras. En este cultivo se probaron concentraciones de 0, 1, 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  ng/ml de insulina, con una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$  células por pozo, así como una suplementación de 10 ng/ml de FSH.

Cultivo IV. Para probar el efecto de la adición de Cromo sobre la sensibilidad de las células de la granulosa a la insulina, se cultivaron células de la granulosa con diferentes concentraciones de insulina (0, 1, 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  ng/ml), y diferentes concentraciones de CrCl (0, 1 y 20  $\mu$ M), utilizando una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$  células/pozo, adicionadas con 10 ng de FSH/ml y 1 ng de LR3 IGF-I /ml. Para determinar las concentraciones que se utilizarían para este cultivo, previamente se hizo una prueba de toxicidad del CrCl sobre las células de la granulosa, cultivando las células a diferentes concentraciones de Cromo y observando los efectos sobre su viabilidad.

#### **Determinación del número de células de la granulosa.**

Después de los 6 días de cultivo, el medio fue colectado, y el número de células de la granulosa viables se estimó por medio de la captación del colorante rojo neutro como lo describe Campbell *et al.* (1996). El medio se sustituyó por 200  $\mu$ l de medio de cultivo conteniendo 10  $\mu$ g/ml del colorante rojo neutro adicionada a cada pozo de cultivo e incubado por 3 horas. Al término de ese periodo de incubación el medio con rojo neutro fue removido y sustituido por 200  $\mu$ l de una solución (4% de formaldehído, 1% de cloruro de calcio) para fijar las células por 3 minutos, esta solución fue removida y sustituida por 200  $\mu$ l de solución que contenía 50% de etanol y 1% de ácido acético. La absorbancia de esta solución fue determinada a 540 nm usando un lector multipozos (Espectrofotometro Multiskan® EX Labsystems). La relación entre absorbancia y número de células se estableció cultivando un gran número de células de la granulosa bajo condiciones similares e incubando con el mismo medio de cultivo con rojo neutro por 3 horas, al término del periodo de incubación las células de la granulosa se despegaron del piso del plato de cultivo con una espátula de plástico (gendarme), se contaron las células de la granulosa usando un hemocitómetro. La suspensión fue

centrifugada a 800 g. durante 5 minutos, el pellet fue tratado con una solución con (formol-calcio, ácido acético-etanol). La solución resultante se hizo en alícuotas por triplicado y cada alícuota se colocó en un pozo de una caja de cultivo de 96 pozos, la absorbancia se determinó a 540 nm. La relación entre el número de células y la absorbancia se estimó mediante una ecuación de regresión (Gutiérrez *et al.*, 1997b).

### **Radioinmunoanálisis**

Las concentraciones de estradiol se midieron mediante un radioinmunoensayo de fase sólida (Coat-A-Count®, Siemens Medical Solutions Diagnostic), en el medio de cultivo sin extracción. La sensibilidad del ensayo fue de 8 pg/ml y los coeficientes de variación inter e intraensayo fueron 8.2% y 7.9% respectivamente.

### **Análisis estadístico.**

Los datos de producción de estradiol, así como el número final de células de la granulosa fueron transformados a su logaritmo natural previo al análisis estadístico, posteriormente se retransformaron a datos reales para su presentación en los cuadros y gráficas. Algunos datos de producción de estradiol se presentan como concentraciones totales, mientras que algunos son expresados como producción por 10 mil células. Cuando se obtuvieron concentraciones de estradiol sólo en las primeras 24 h de cultivo, esta variable se obtuvo considerando el número de células sembradas inicialmente, mientras que para los cultivos en los que se obtuvo producción de estradiol en los 6 días de cultivo se consideró el número final de células.

Los datos de los cultivos fueron analizados como un DCA con arreglo factorial mediante el procedimiento GLM de SAS (SAS Inst. Inc., Cary NC, USA) para las variables número final de células y para producción de estradiol, de este último sólo se analizaron los datos del primer día en algunos cultivos, pues en los siguientes días muchas de las concentraciones fueron no detectables. Cuando hubo concentraciones detectables de estradiol durante los 6 días de cultivo, los datos fueron analizados mediante el procedimiento PROC MIXED de SAS para medidas repetidas.

#### **IV. RESULTADOS.**

##### **Cultivo I. Efecto de la densidad de siembra de células de la granulosa y la concentración de FSH sobre la proliferación y la esteroidogénesis de células de la granulosa de cabras.**

Los resultados encontrados en el número final de células de la granulosa al término del cultivo fue menor que el número de células sembradas al inicio. Los porcentajes de sobrevivencia celular fueron inversamente proporcional a la densidad de siembra inicial (73, 40, 31 y 19%, para 2, 4, 6 y 8 x 10<sup>4</sup>, respectivamente; datos no presentados). La interacción entre la densidad de siembra de células de la granulosa y la concentración de FSH no afectó el número de células totales (P>0.05). La densidad de siembra tampoco afectó el número de células totales (P>0.05; CUADRO 1), pero si se encontró un efecto favorable de la concentración de FSH utilizada en el medio de cultivo (P<0.0001; CUADRO 2), obteniéndose mayor número de células con dosis de 1, 10 y 100 ng/ml de FSH, comparadas con las dosis de 0 y 0.1 ng/ml.

Con relación a las concentraciones de estradiol (E<sub>2</sub>) en el medio de cultivo, sólo se reportan resultados para el primer día de cultivo, ya que no se detectó E<sub>2</sub> en los días restantes. Se observó una tendencia a ser afectada la concentración de E<sub>2</sub> por la interacción de la densidad de siembra de células de la granulosa x la dosis de FSH en el medio de cultivo (P=0.07). La densidad de siembra tuvo efecto favorable sobre la concentración de E<sub>2</sub>, tanto total como por 10 mil células (P<0.0001; CUADRO 1). Por otro lado, no se observó efecto de la dosis de FSH sobre la producción total de E<sub>2</sub>, ni la producción por 10 mil células (P=0.18; CUADRO 2). En la interacción, se pudo observar que la concentración de E<sub>2</sub> fue similar para todas las dosis de FSH utilizadas en el medio de cultivo, a una densidad de siembra de 2x10<sup>4</sup> (P=0.07; FIGURA 1), pero se observó un aumento en las densidades restantes con todas las dosis de FSH en el que la dosis de 0 ng/ml, con una densidad de siembra de 6 y 8x10<sup>4</sup> mostró una mayor concentración de E<sub>2</sub> en comparación a los demás tratamientos, y en la concentración de estradiol por 10 mil células se observó que a una densidad de 4x10<sup>4</sup> si hubo efecto de las dosis de 0.1, 10 y 100 ng de FSH/ml (P=0.07; FIGURA 2).

Cuadro 1. Efecto de la densidad de siembra sobre el número final de células de la granulosa después de 6 días de cultivo y producción promedio de estradiol (E<sub>2</sub>; pg/ml) y E<sub>2</sub> por 10 mil células sólo durante el primer día del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes densidades de siembra, en combinación con diferentes dosis de FSH, en condiciones de cultivo libre de suero.

Celx10 <sup>4</sup>	Número final de células	E <sub>2</sub> pg/ml	E <sub>2</sub> pg/ml x 10mil células
2	14601 ± 2096.67	20.1 ± 1.28 <sup>d</sup>	10 ± 0.6 <sup>c</sup>
4	15893 ± 2282.11	49.8 ± 3.17 <sup>c</sup>	12.4 ± 0.8 <sup>b</sup>
6	18880 ± 2711.01	110.4 ± 7.02 <sup>b</sup>	18.4 ± 1.2 <sup>a</sup>
8	15361 ± 3820.33	157.8 ± 10.03 <sup>a</sup>	19.8 ± 1.2 <sup>a</sup>

Datos presentados como media ± ee.

Diferente literal en una misma columna indica diferencias (P<0.0001)<sup>abcd</sup>.

Cuadro 2. Efecto de FSH sobre el número final de células de la granulosa a los 6 días de cultivo, producción promedio de estradiol (E<sub>2</sub>; pg/ml) y E<sub>2</sub> por 10 mil células durante el primer día del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes dosis de FSH, en combinación con diferentes densidades de siembra en condiciones de cultivo libre de suero.

FSH ng/ml	Número final de células	E <sub>2</sub> pg/ml	E <sub>2</sub> pg/ml x 10mil células
0	8994 ± 1463.72 <sup>a</sup>	68.5 ± 4.9	11.4 ± 1.1
0.1	8477 ± 1379.6 <sup>a</sup>	72.3 ± 5.17	12 ± 1.2
1	20380 ± 3316.75 <sup>b</sup>	58.1 ± 4.15	9.7 ± 0.9
10	24239 ± 3944.71 <sup>b</sup>	63.2 ± 4.52	10.5 ± 1
100	28779 ± 4683.68 <sup>b</sup>	61.9 ± 4.42	10.5 ± 1

Datos presentados como media ± ee.

Diferente literal en una misma columna indica diferencias (P<0.0001)<sup>ab</sup>.

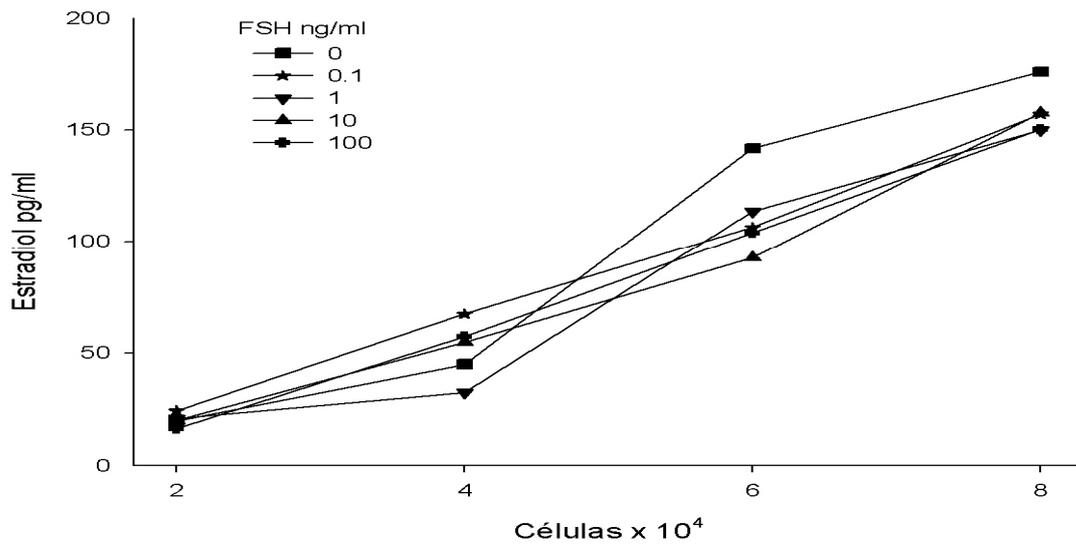


Figura 1. Producción de E<sub>2</sub> (pg/ml) durante el primer día del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes densidades de siembra y dosis de FSH. Efecto de la interacción densidad de siembra X dosis de FSH (P=0.07).

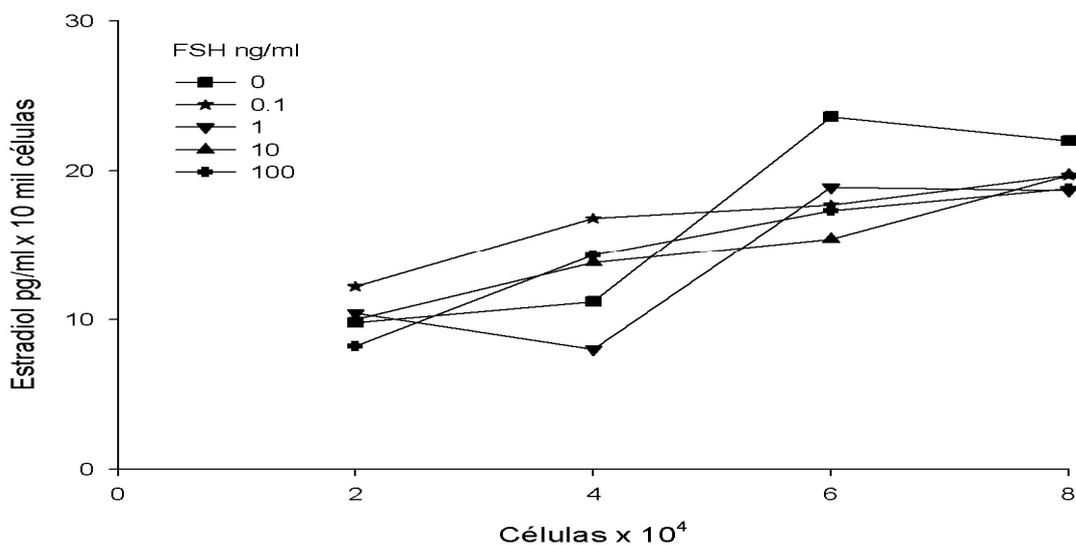


Figura 2. Producción de E<sub>2</sub> (pg/ml) x 10 mil células, durante el primer día del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes densidades de siembra y dosis de FSH. Efecto de la interacción densidad de siembra X dosis de FSH (P=0.07).

**Cultivo II. Efecto de la adición de un análogo de IGF-I (LR3-IGF-I) al medio de cultivo conteniendo una concentración de FHS de 10 ng/ml a una densidad de siembra de 6x10<sup>4</sup> células de la granulosa de cabras.**

El análogo de IGF-I adicionado al medio de cultivo favoreció la proliferación celular ( $P < 0.0001$ ; CUADRO 3), obteniéndose entre 1.8 y 2.7% más células al final del estudio con las dosis de 1, 10 y 100 ng/ml, mientras que con las dosis de 0 y 0.1 ng/ml, sólo se obtuvo el 65 y 24% de la densidad inicial, respectivamente. Los resultados de estradiol sólo se obtuvieron en el primer día de cultivo, el promedio de  $E_2$  ( $P = 0.27$ ) y  $E_2$  por 10 mil células no fue afectada por la dosis de LR3-IGF-I adicionado al medio de cultivo ( $P = 0.72$ ; CUADRO 3).

Cuadro 3. Efecto de LR3-IGF-I sobre el número final de células de la granulosa a los 6 días de cultivo y de la producción promedio de estradiol ( $E_2$ ; pg/ml) y  $E_2$  por 10 mil células durante el primer día del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes dosis de LR3-IGF-I, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH a una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$ .

IGF- I ng/ml	Número final de células	$E_2$ pg/ml	$E_2$ pg/ml x 10mil células
0	$38989 \pm 3331.68^b$	$6.3 \pm 1.96$	$1.4 \pm 1$
0.1	$14140 \pm 1208.27^a$	$4.6 \pm 1.42$	$0.7 \pm 0.7$
1	$136097 \pm 11629.69^{cd}$	$8.4 \pm 2.63$	$1.4 \pm 1$
10	$110298 \pm 9425.09^c$	$9.2 \pm 2.85$	$0.8 \pm 0.6$
100	$162079 \pm 13849.9^d$	$5.6 \pm 1.76$	$0.8 \pm 0.6$

Datos presentados como media  $\pm$  ee.

Diferente literal en una misma columna indica diferencias ( $P < 0.0001$ )<sup>abcd</sup>.

### **Cultivo III. Efecto de la adición de insulina al medio de cultivo, sobre la proliferación y esteroidogénesis de células de la granulosa de cabras.**

El número final de células de la granulosa fue afectado por la dosis de insulina ( $P = 0.003$ ; CUADRO 4), presentándose una respuesta inhibitoria de la proliferación celular, con las dosis de 10 y 100 ng/ml en las que se mantuvo el número inicial de células, mientras que con las otras dosis (incluyendo 0 ng/ml) el número de células se duplicó.

La insulina tuvo efecto sobre la producción de  $E_2$  (CUADRO 4), tanto total ( $P = 0.008$ ), como expresada por 10 mil células ( $P = 0.0702$ ); la mayor concentración de  $E_2$  se observó con la dosis de 1,000 ng/ml. El día de cultivo influyó tanto en la producción promedio de  $E_2$ , como en la producción de  $E_2$  por 10 mil células ( $P = 0.0001$ ;

Cuadro 5), observándose la mayor producción de E<sub>2</sub> en el día 1 de cultivo y posteriormente disminuyó drásticamente, aunque siempre hubo concentraciones detectables. La concentración promedio y por 10 mil células de esta hormona a partir del día 2 mostró un comportamiento similar con todas las dosis de insulina utilizadas, aunque con la dosis de 1000 ng/ml se observó mayor persistencia en la concentración de E<sub>2</sub> (P<0.0001; FIGURAS 3 y 4).

Cuadro 4. Efecto de la insulina sobre el número final de células de la granulosa a los 6 días de cultivo, de la producción promedio de E<sub>2</sub> pg/ml y E<sub>2</sub> pg/ml por 10 mil células de los 6 días del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes dosis de insulina, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH a una densidad de siembra de 6x10<sup>4</sup>.

Insulina ng/ml	Número final de células	E <sub>2</sub> pg/ml	E <sub>2</sub> pg/ml x 10mil células
0	114800 ± 17176.07 <sup>a</sup>	171.6 ± 30.49 <sup>b</sup>	13.5 ± 3.1 <sup>b</sup>
1	114948 ± 17198.21 <sup>a</sup>	141.2 ± 25.09 <sup>bc</sup>	11.1 ± 2.6 <sup>b</sup>
10	62101 ± 9291.38 <sup>b</sup>	149.9 ± 26.64 <sup>bc</sup>	20.9 ± 4.8 <sup>ab</sup>
100	70075 ± 10484.42 <sup>b</sup>	108.2 ± 19.22 <sup>c</sup>	17.4 ± 4 <sup>ab</sup>
1000	123330 ± 18452.41 <sup>a</sup>	301.5 ± 53.57 <sup>a</sup>	27.7 ± 6.4 <sup>a</sup>
10000	123530 ± 18482.33 <sup>a</sup>	222 ± 39.44 <sup>ab</sup>	16.4 ± 3.8 <sup>ab</sup>

Datos presentados como media ± ee.

Diferente literal en una misma columna indica diferencia significativa, para número final de células (P<0.003)<sup>ab</sup>, concentración total de E<sub>2</sub> (P=0.008)<sup>abc</sup> y concentración de E<sub>2</sub> x 10 mil células. (P=0.0702)<sup>ab</sup>.

Cuadro 5. Efecto del día de cultivo sobre la producción promedio de estradiol (E<sub>2</sub>; pg/ml) y E<sub>2</sub> por 10 mil células de los 6 días del cultivo de células de la granulosa de cabras, al incluir diferentes dosis de insulina en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH a una densidad de siembra de 6x10<sup>4</sup>.

Día	E <sub>2</sub> pg/ml	E <sub>2</sub> pg/ml x 10mil células
1	1716.9 ± 135.46 <sup>a</sup>	170 ± 16.2 <sup>a</sup>
2	499.5 ± 39.41 <sup>b</sup>	49.5 ± 4.7 <sup>b</sup>
3	154.1 ± 12.16 <sup>c</sup>	15.3 ± 1.5 <sup>c</sup>
4	79.3 ± 6.25 <sup>d</sup>	7.8 ± 0.7 <sup>d</sup>
5	66.7 ± 5.26 <sup>c</sup>	6.6 ± 0.6 <sup>c</sup>
6	13.66 ± 2.97 <sup>f</sup>	3.7 ± 0.4 <sup>f</sup>

Datos presentados como media ± ee.

Diferente literal en una misma columna indica diferencia significativa (P<0.0001)<sup>abcdef</sup>.

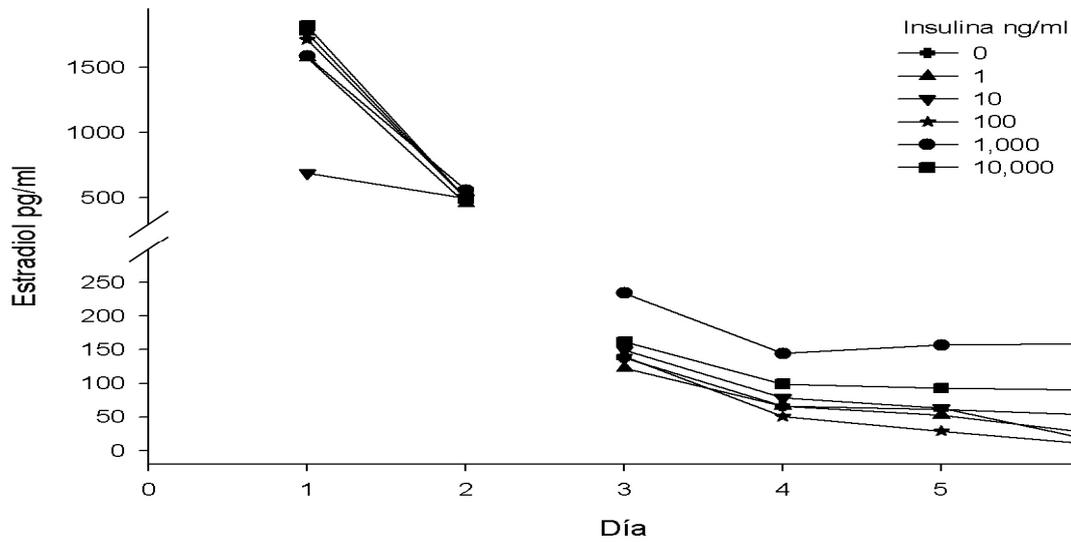


Figura 3. Producción de E<sub>2</sub> (pg/ml) de los 6 días del cultivo de células de la granulosa de cabras en que se probaron diferentes dosis de insulina en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH a una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$  ( $P < 0.0001$ ) para ver el efecto de interacción dosis de insulina x día de cultivo.

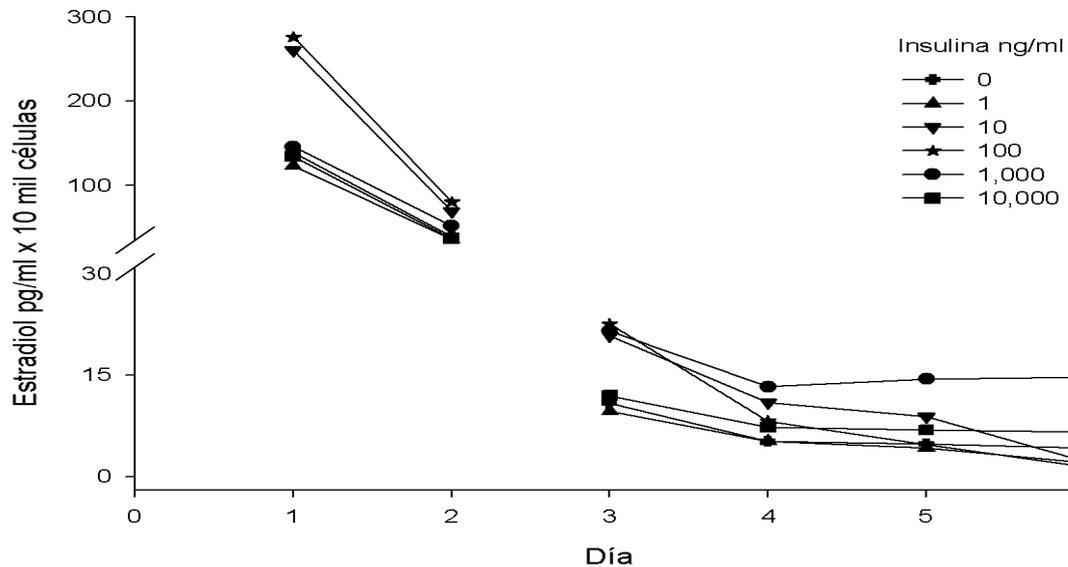


Figura 4. Producción de E<sub>2</sub> (pg/ml) x 10 mil células, de los 6 días del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes dosis de insulina en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH a una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$  ( $P < 0.0001$ ).

#### **Cultivo IV. Efecto de la adición de insulina en combinación con Cloruro de Cromo (CrCl) al medio de cultivo sobre la proliferación y esteroidogénesis de células de la granulosa de cabras.**

El número final de células de la granulosa fue menor que la densidad sembrada inicialmente, sin observarse un efecto de la interacción de las dosis de insulina x dosis de CrCl ( $P=0.23$ ). La inclusión de insulina en el medio de cultivo favoreció la sobrevivencia de las células de la granulosa. El número final de células fue mayor en las dosis de 100 ng/ml o mayores en comparación con las dosis inferiores de insulina ( $P<0.0002$ ; CUADRO 6). Las dosis de CrCl, también mostraron un efecto sobre el número final de células de la granulosa. Mientras que la dosis baja (1  $\mu\text{M}$  de CrCl) favoreció la sobrevivencia celular, la dosis alta (20  $\mu\text{M}$ ) tuvo un efecto negativo ( $P<0.0002$ ; CUADRO 7).

La insulina mostró un efecto al aumentar la concentración media de  $E_2$  y también sobre  $E_2$  por 10 mil células ( $P<0.0001$ ; CUADRO 6). La dosis baja de CrCl mantuvo la concentración promedio de  $E_2$  ( $P=0.006$ ), mientras que con la dosis alta disminuyó. Por otro lado, no hubo efecto del cromo sobre la producción de  $E_2$  por 10 mil células ( $P=0.12$ ; CUADRO 7). Las concentraciones de  $E_2$  también fueron afectadas por el día de cultivo ( $P<0.0001$ ; CUADRO 8), la interacción de las dosis de insulina x el día de cultivo ( $P<0.0001$ ; FIGURA 5), y la interacción de la dosis de CrCl x el día de cultivo ( $P<0.0001$ ; FIGURA 7). No se observó un efecto en interacción de dosis de insulina x dosis de CrCl x día de cultivo ( $P=0.1$ ). La concentración de  $E_2$  fue menor a dosis de 0 y 10 ng/ml y se observó mayor concentración de  $E_2$  con dosis de 1000 ng/ml de insulina ( $P<0.0001$ ; CUADRO 6). La concentración de  $E_2$  a dosis de 20  $\mu\text{M}$  de CrCl fue menor que la de las dosis de 0 y 1  $\mu\text{M}$  de CrCl ( $P<0.006$ ; CUADRO 7). Existió una concentración alta en el primer día de cultivo en todas las dosis de insulina utilizadas y al día dos muestra una drástica caída, manteniéndose de esta manera en los días restantes de cultivo, observándose generalmente una mayor concentración de  $E_2$  con las dosis altas de insulina (100 y 1000 ng/ml) en estos días ( $P<0.0001$ ; FIGURA 5), la concentración de estradiol por 10 mil células mostró que a partir del día 3 de cultivo influyó para una mayor concentración de esta hormona la dosis mayores de 100 ng/ml de insulina ( $P<0.0001$ ; FIGURA 6). La concentración de  $E_2$  con las diferentes dosis de CrCl en los primeros tres días de cultivo fue similar para las diferentes dosis y mostró

una tendencia similar a la baja, pero a dosis de 0 y 1  $\mu\text{M}$  de CrCl en los días restantes de cultivo fue mayor que con la dosis de 20  $\mu\text{M}$  de CrCl ( $P < 0.0001$ ; FIGURA 7), por 10 mil células la concentración de estradiol se observó que a partir del día 4 de cultivo hubo un efecto negativo de la dosis de CrCl ( $P < 0.0001$ ; FIGURA 8).

Cuadro 6. Efecto de la insulina sobre número final de células de la granulosa a los 6 días de cultivo, de la producción promedio de  $E_2$  ( $E_2$  pg/ml) y  $E_2$  por 10 mil células de los 6 días del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes dosis de insulina, en combinación con diferentes dosis de CrCl, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$ .

Insulina ng/ml	Número final de células	$E_2$ pg/ml	$E_2$ pg/ml x 10mil células
0	$7470 \pm 823.87^a$	$11 \pm 3.77^c$	$14.4 \pm 5.1^c$
1	$9405 \pm 1037.24^a$	$26 \pm 9.27^b$	$27.3 \pm 9.7^{bc}$
10	$9791 \pm 1079.76^{ab}$	$11 \pm 3.91^c$	$12 \pm 4.3^c$
100	$12527 \pm 1381.58^b$	$91 \pm 31.75^a$	$72.3 \pm 25.8^a$
1000	$14496 \pm 1598.72^b$	$157 \pm 54.94^a$	$104.8 \pm 37.4^a$
10000	$16006 \pm 1765.28^b$	$51 \pm 17.95^{ab}$	$32 \pm 11.4^b$

Datos presentados como media  $\pm$  ee.

Diferente literal en una misma columna indica diferencia significativa, para número final de células ( $P < 0.0002$ )<sup>ab</sup> y producción de estradiol ( $P < 0.0001$ )<sup>abc</sup>.

Cuadro 7. Efecto del CrCl sobre el número final de células de la granulosa a los 6 días de cultivo, de la producción promedio de  $E_2$  pg/ml y  $E_2$  pg/ml por 10 mil células a los 6 días del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes dosis de CrCl, en combinación con diferentes dosis de insulina, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$ .

CrCl $\mu\text{M}$	Número final de células	$E_2$ pg/ml	$E_2$ pg/ml x 10mil células
0	$11251 \pm 851.44^a$	$51 \pm 1.67^a$	$44.7 \pm 10.4$
1	$15662 \pm 1185.25^b$	$43 \pm 9.76^a$	$27.9 \pm 6.5$
20	$8025 \pm 607.28^c$	$22 \pm 5^b$	$27.1 \pm 6.3$

Datos presentados como media  $\pm$  ee.

Diferente literal en una misma columna indica diferencia significativa para número final de células ( $P < 0.0002$ )<sup>abc</sup> y producción de estradiol ( $P < 0.006$ )<sup>ab</sup>.

Cuadro 8. Efecto del día de cultivo sobre la producción de E<sub>2</sub> pg/ml y E<sub>2</sub> pg/ml por 10 mil células de los 6 días del cultivo de células de la granulosa, del cultivo donde se probaron diferentes dosis de insulina, en combinación con diferentes dosis de CrCl, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de 6x10<sup>4</sup>.

Día	E <sub>2</sub> pg/ml	E <sub>2</sub> pg/ml x 10mil células
1	932 ± 163.61 <sup>a</sup>	803.3 ± 139.2 <sup>a</sup>
2	158 ± 27.79 <sup>b</sup>	140.9 ± 24.4 <sup>b</sup>
3	22 ± 3.87 <sup>c</sup>	19.6 ± 19.6 <sup>c</sup>
4	10 ± 1.8 <sup>d</sup>	9.7 ± 1.7 <sup>d</sup>
5	10 ± 1.79 <sup>d</sup>	8.8 ± 1.5 <sup>e</sup>
6	7 ± 1.19 <sup>e</sup>	6.1 ± 1 <sup>f</sup>

Datos presentados como media ± ee.

Diferente literal entre una misma columna, indica diferencias (P<0.0001)<sup>abcdef</sup>.

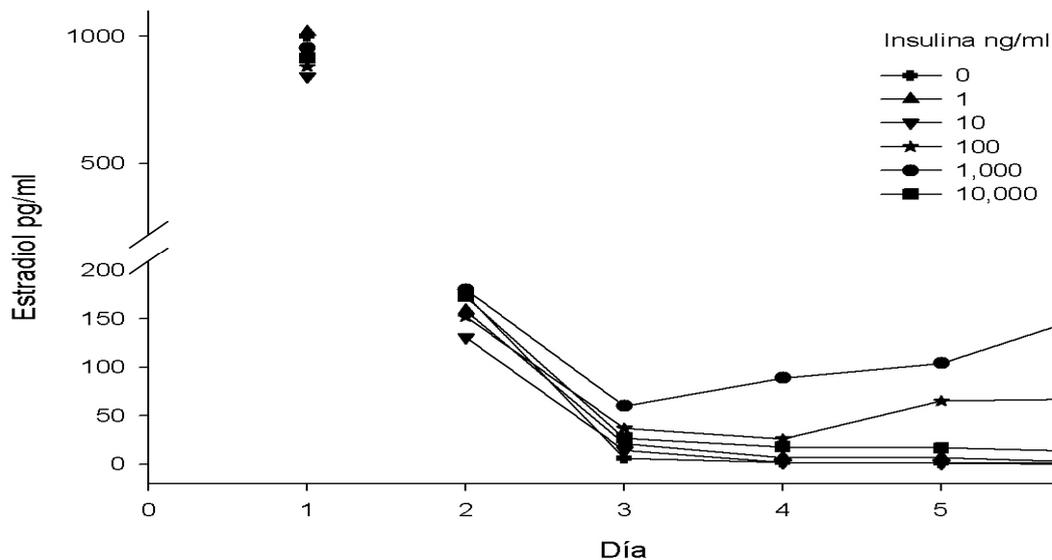


Figura 5. Producción de E<sub>2</sub> pg/ml de los 6 días del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes dosis de insulina, en combinación con diferentes dosis de CrCl, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de 6x10<sup>4</sup> (P<0.0001).

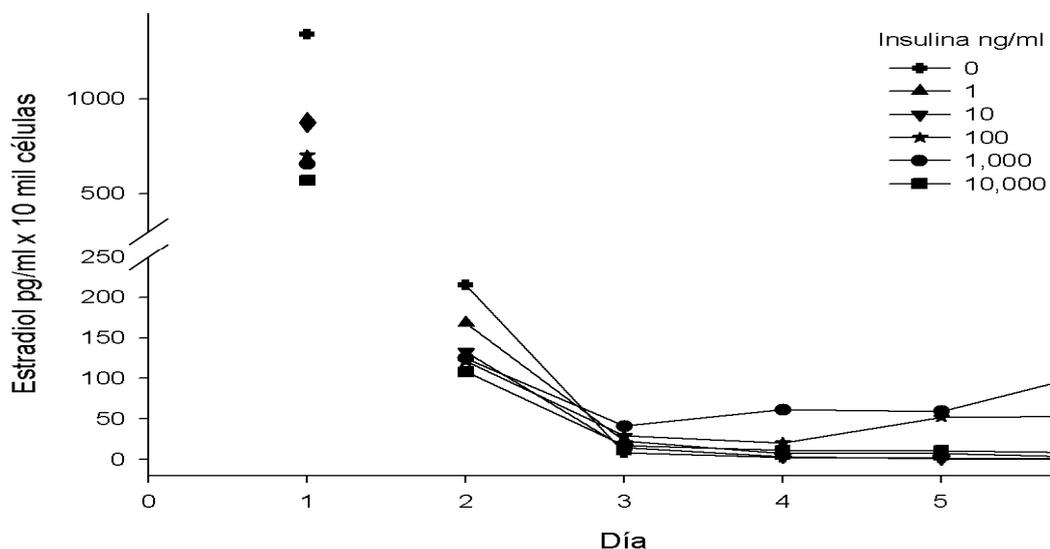


Figura 6. Producción de E<sub>2</sub> pg/ml x 10 mil células, de los 6 días del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes dosis de insulina, en combinación con diferentes dosis de CrCl, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$  ( $P < 0.0001$ ).

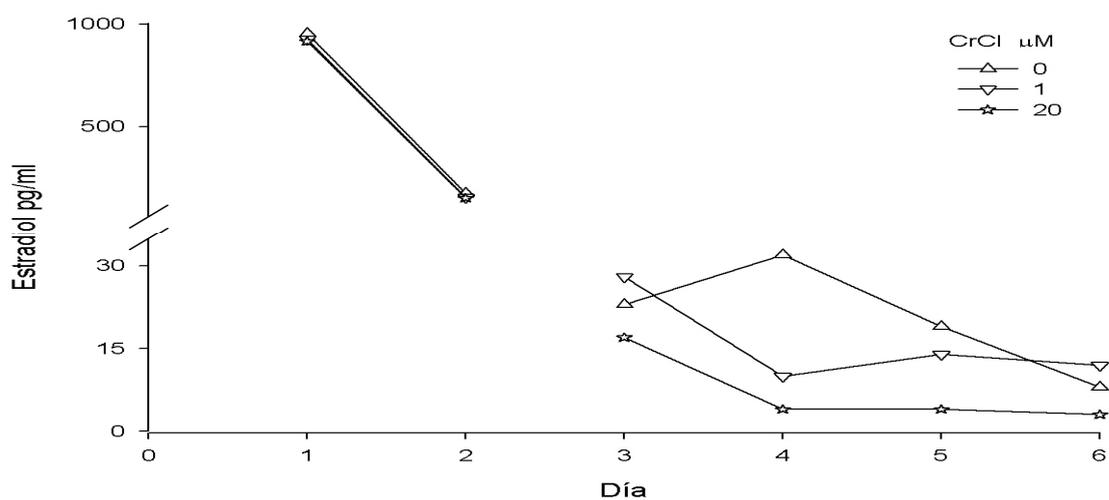


Figura 7. Producción de E<sub>2</sub> pg/ml de los 6 días del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes dosis de CrCl e insulina, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$  ( $P < 0.0001$ ).

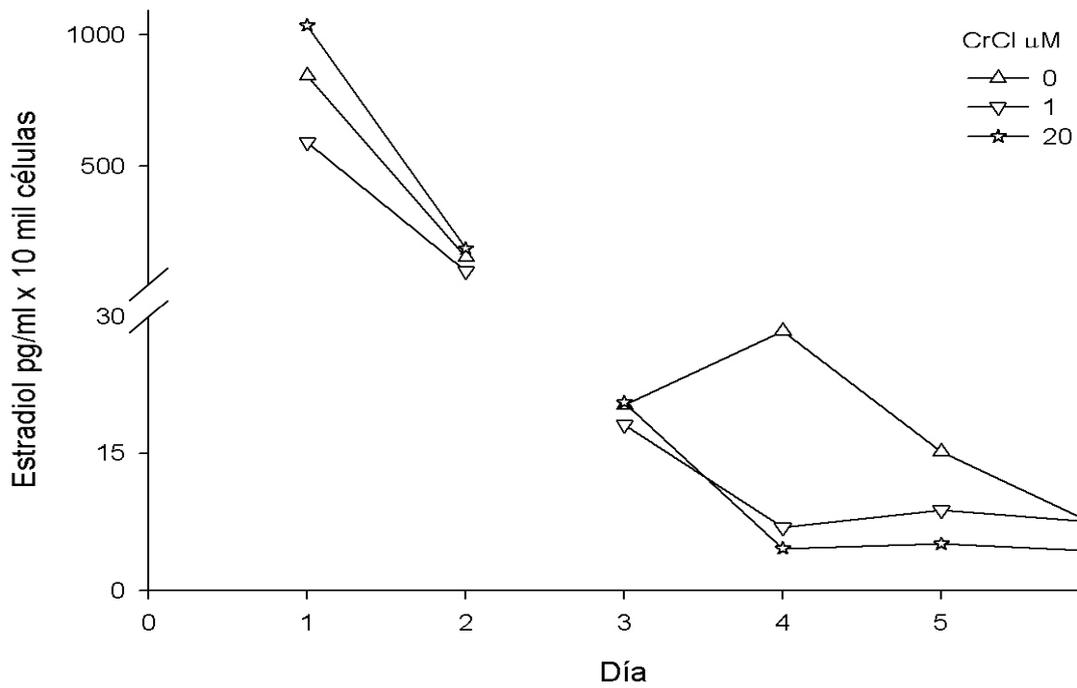


Figura 8. Producción de E<sub>2</sub> pg/ml x 10 mil células, de los 6 días del cultivo de células de la granulosa de cabras en el que se probaron diferentes dosis de CrCl, en combinación con diferentes dosis de insulina, en condiciones de cultivo libre de suero adicionado con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, a una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$  ( $P < 0.0001$ ).

## V. DISCUSIÓN.

Actualmente, no se cuenta con suficiente información del sistema de cultivo libre de suero que se utilizó para ver el efecto de insulina y CrCl sobre la esteroidogénesis y la proliferación en las células de la granulosa de cabras. Sin embargo, se han publicado algunos sistemas de cultivo libre de suero en bovinos (Gutiérrez *et al.*, 1997b), y ovejas (Campbell *et al.*, 1996), los cuales fueron considerados como referencia, en el sistema de cultivo probado sobre células de la granulosa de cabras se difiere en algunos resultados comparados con los encontrados en cultivos de células de bovinos y ovinos, haciéndose mención de que en el cultivo de células de la granulosa de cabras, sólo en algunos casos se logró que los cultivos realizados produjeran E<sub>2</sub> durante los 6 días de cultivo, los cultivos que sólo tuvieron resultados de producción de esta hormona en el primer día fueron los cultivos probados con FSH y en que se usó LR3 IGF-I. En los cultivos de FSH y el de insulina adicionados con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3 IGF-I, no se observó un efecto sobre la proliferación de las células pero si existió una influencia sobre la sobrevivencia de las células de la granulosa. En los cultivos de células de la granulosa de bovinos (Gutiérrez *et al.*, 1997b), y ovejas (Campbell *et al.*, 1996), se ha reportado producción de estradiol durante los seis días de cultivo y proliferación celular con la estimulación de estas hormonas mencionadas.

Se decidió probar diferentes densidades para determinar la más apropiada para utilizar en este sistema de cultivo y se lograron evaluar las variables descritas en este estudio, debido a que se cuenta con poca información de cultivos de células de la granulosa en la que indiquen la densidad óptima de siembra, la densidad de siembra no afectó la proliferación celular, pero si afectó la sobrevivencia y de manera paralela hubo un efecto de la densidad de siembra sobre la producción de E<sub>2</sub> (CUADRO 1), al aumentar la densidad de siembra se observó un aumento en la producción de E<sub>2</sub>, asociado a la comunicación intercelular, que participa sobre la regulación de las enzimas esteroidogénicas (Amsterdam *et al.*, 1992), esta comunicación entre las células de la granulosa se mantiene por la formación de las uniones GAP (Gutiérrez *et al.*, 1997c), y se observó que a una densidad de siembra de  $6 \times 10^4$  células se daba una mayor producción de estradiol en interacción con las dosis de 0 y 1 ng/ml de FSH (FIGURA 1). Con estos resultados se decidió utilizar para los cultivos posteriores esta densidad de siembra.

Los resultados de la proliferación de las células de la granulosa con la adición de FSH en el cultivo no mostraron un aumento en esta proliferación, sin embargo se observó que con una dosis de 1, 10 ó 100 ng/ml de FSH (CUADRO 2), se logró un efecto positivo sobre la sobrevivencia de las células de la granulosa y no una proliferación hasta el termino de cultivo, algunos estudios en bovinos reportan que a dosis de 200 ng/ml de FSH no observaron un efecto sobre la proliferación (Langhout *et al.*, 1991). En rumiantes esta hormona tiene una función primordial sobre el desarrollo folicular participando en la diferenciación celular (Gaverick *et al.*, 2002), de las células de granulosa *in vitro* (Campebell *et al.*, 2001), y retrasa la apoptosis celular (Yang *et al.*, 2000). En células de la granulosa de folículos grandes de ovinos expuestas a dosis de 1 ng/ml de FSH no se observó un efecto sobre la proliferación, al igual que se ha reportado una diferenciación *in vitro* de estas células al luteinizarse ya que observaron una disminución en la contracción de estradiol y un incremento en la concentración de progesterona (Campbell *et al.*, 1996), en nuestro cultivo se registraron concentraciones de progesterona; sin embargo, no se observó un incremento en su concentración (datos no presentados). En células de la granulosa de bovinos se ha observado proliferación con la adición de 10 ng/ml al cultivo de FSH, al igual que con insulina, LR3 IGF-I y la combinación de estos dos (Gutiérrez *et al.*, 1997b).

Mediante el sistema de cultivo empleado se logró la producción de estradiol *in vitro* de células de la granulosa de cabras. Aunque las diferentes dosis de FSH en el medio de cultivo no afectaron la producción de estradiol durante todo el tiempo de cultivo, sólo se detectó en el primer día de cultivo. FSH en bovinos estimula la secreción de E<sub>2</sub> *in vitro* al estimular la actividad aromatasasa (Silva *et al.*, 2000) esto con una interacción a dosis bajas de insulina (Bhatia *et al.*, 2001). Sin embargo en otro estudio reportan que a dosis menores de 1 ng/ml de FSH no observaron efecto sobre E<sub>2</sub> y si hubo mayor producción de esta hormona a dosis altas (Spicer *et al.*, 2002). La respuesta de las células de la granulosa sobre la proliferación y la esteroidogénesis no sólo depende de la dosis de FSH, además se ve fluida por la diferenciación de células de la granulosa al luteinizarse (Campbell *et al.*, 1996). En células de la granulosa de bovinos han reportado la producción de estradiol durante seis días de cultivo con la adición de FSH y con LR3 IGF-I en el medio (Gutiérrez *et al.*, 1997b; Allegrucci *et al.*, 2003).

En el cultivo que empleó dosis de LR-IGF-I se observó que con la dosis de 1 ng/ml (CUADRO 3), se lograba un aumento sobre la proliferación de células de la granulosa. Es probable que algunas de las causas del estímulo de la proliferación celular se deban a un aumento en la mitogénesis (Spicer *et al.*, 1995; Quirk *et al.*, 2004). El IGF-I en combinación con la FSH controlan la apoptosis celular en cabras (Hu *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004), y no mostró efecto sobre la esteroidogénesis, se ha reportado que IGF-I participa en la diferenciación celular (Adashi *et al.*, 1985a), por lo que puede faltar la producción de E<sub>2</sub>, en este cultivo sólo se obtuvieron resultados de la producción de estradiol el primer día de cultivo; sin embargo, en estudios *in vivo* con ovejas (Campbell *et al.*, 1995) y bovinos (Spicer, 2001), se observó un estímulo de IGF-I sobre la secreción de E<sub>2</sub>. En algunos cultivos también han reportado que IGF-I tiene un efecto inhibitorio en la producción de estradiol (Spicer *et al.*, 1995).

Las dosis de 10 y 100 ng/ml de insulina (CUADRO 4), del cultivo adicionado con 10 ng/ml de FSH mostraron un menor efecto sobre la proliferación de las células de la granulosa, comparadas con 0, 1, 1000 y 10000 ng/ml de insulina (CUADRO 4), en cultivos de células de la granulosa de búfalo reportan que no observaron efecto de la dosis de 10 ng/ml de insulina sobre la proliferación, proponen que quizá no participa de forma importante sobre la proliferación de células de la granulosa de búfalo (Bhiushan *et al.*, 2005), altas dosis de insulina pueden tener efecto al estimular la proliferación celular y la esteroidogénesis mediante la vía del receptor para IGF-I (Hadáis *et al.*, 1985a), trabajos reportan que a dosis de 6.25 µg/ml de insulina causa un retraso en el desarrollo del ovario, induciendo una degeneración del ovario (Yu y Roy, 1999). La dosis de 1000 ng/ml de insulina (CUADRO 4), fue la que obtuvo un mayor efecto sobre la esteroidogénesis, siendo más marcada la producción de estradiol en el día 1 de cultivo y en los días restantes una caída muy marcada en la producción de estradiol (CUADRO 5). La insulina *in vitro* en células de la granulosa de bovinos (Gutiérrez *et al.*, 1997b; Silva *et al.*, 2000) y ovinos (Campbell *et al.*, 1996), induce la secreción de E<sub>2</sub> asociado con una mayor actividad de la P450aromatasa, y en la ausencia de insulina se reduce la expresión RNAm P450aromatasa, también se ha notado ese efecto *in vivo* (Butler *et al.* 2004).

En el cultivo donde se usaron diferentes dosis de insulina en adición con 10 ng/ml de FSH y 1 ng/ml de LR3-IGF-I, no se ha observado una proliferación de las

células de la granulosa, sin embargo se vio que la insulina favoreció la sobrevivencia de las células al disminuir la atresia folicular (Meza-Herrera *et al.*, 2004). A partir de la dosis de 100 ng/ml de insulina (CUADRO 6), se observó un efecto sobre la sobrevivencia de células de la granulosa hasta el término del cultivo. En células de la granulosa de bovino también han reportado el efecto de LR3 IGF-I sobre la proliferación, aún en la ausencia de FSH (Gutiérrez *et al.*, 1997b). En este cultivo también se obtuvieron resultados sobre la producción de estradiol de los 6 días de cultivo, al igual que en el cultivo con diferentes dosis de insulina adicionado sólo con 10 ng/ml de FSH se observó una mayor producción de estradiol al aumentar la actividad aromatasas de las células de la granulosa, en el día 1 de cultivo y una menor concentración en los días restantes, haciendo muy notable esta disminución en la producción de esta hormona desde el día 2 y persistiendo la caída en la producción de la misma hormona hasta el día 6 del cultivo (CUADRO 8). En ovejas al infundir insulina y glucosa observaron una depresión significativa en la tasa de secreción de E<sub>2</sub>, y sugieren que puede deberse a una posible disminución de la capacidad de las células de la granulosa para convertir androstenediona a E<sub>2</sub>, según estos resultados proponen que el efecto sobre el incremento en la tasa ovulatoria, puede deberse al reducir la producción de E<sub>2</sub>, por el folículo dominante llevando a una reducción sobre la retroalimentación de FSH (Downing *et al.*, 1999). En bovinos se ha observado que un aumento en la circulación de IGF-I e insulina se mejora la esteroidogénesis (Armstrong *et al.*, 2002b).

Las dosis utilizadas de CrCl no favorecieron la proliferación de las células de la granulosa, pero sí influyó sobre la sobrevivencia la dosis de 1 µM de CrCl, mientras que la dosis de 20 µM de CrCl disminuyó la sobrevivencia con respecto al control (CUADRO 7), *in vitro* han observado que un exceso en la concentración de CrCl le causa daños a la ultraestructura de las células ováricas, lo que asocian a que las concentraciones utilizadas exceden la concentración que puede soportar las células *in vivo* (Stearns *et al.*, 2002), al igual en células ováricas de hámster observaron que altas concentraciones y una exposición prolongada de picolinato de Cromo inhibe el desarrollo folicular, reduciendo el índice mitótico (Gudi *et al.*, 2005), pero no se observó significancia de la interacción entre la insulina y el CrCl, pero se obtuvo una mayor sobrevivencia de las células hasta el término del cultivo. En cultivos de adipocitos observaron que el Cromo favorece la fluidez de la membrana plasmática

(Chen *et al.*, 2006), quizá esto tuvo que influir de alguna forma en la sobrevivencia de las células de la granulosa. En vacas se ha visto que el Cromo incrementa la tasa de gestación en los primeros 28 días de la estación de apareamiento, (Bryan *et al.*, 2004). El efecto del Cromo sobre la insulina aún no se ha explicado en su totalidad quizá esta regulado por algunos metabolitos o algunos factores hormonales que pudieran estar involucrados en este proceso (Amoikon *et al.* 1995). Al igual que en efecto sobre la sobrevivencia de las células la dosis de 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{CrCl}$ , en cuanto a la producción de estradiol fue similar que el control, pero a dosis de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{CrCl}$  (CUADRO 7), fue disminuida la concentración de estradiol, en este cultivo se detecto la producción de estradiol en los 6 días de cultivo, pero al igual que en los cultivos anteriores donde también se logró la producción de estradiol durante todo el tiempo de cultivo, fue en el primer día de cultivo en el que se detectó a mayor producción de estradiol, y una caída de esta muy evidente en el día 2 y así sucesivamente hasta el día 6 de cultivo.

### **En Resumen**

La FSH e IGF-I favorecen la proliferación y/o la proliferación celular *in vitro* de células de la granulosa de cabras. La insulina sola o asociada a IGF-I estimula la producción de estrógenos *in vitro* por células de la granulosa de cabras. Se recomienda el uso de dosis de FSH mayores o iguales a 1 ng/ml, para favorecer la proliferación de células de la granulosa *in vitro*. Dosis altas de  $\text{CrCl}$  (20  $\mu\text{M}$ ) pueden resultar perjudiciales para la proliferación *in vitro* de células de la granulosa de cabras, y dosis bajas de  $\text{CrCl}$  (1  $\mu\text{M}$ ) favorece la sobrevivencia *in vitro*, quizá por un mecanismo independiente a la acción de la insulina.

## VI. CONCLUSIONES.

- Nuestros resultados no sustentan la hipótesis original ya que *in vitro* el CrCl no mejora la sensibilidad de las células de la granulosa de cabras hacia la insulina; sin embargo, dosis bajas de CrCl favorecen la sobrevivencia de estas células.
- El sistema de cultivo libre de suero puede ser útil para probar cultivos en un periodo de 24 horas, en donde se cultiven células de la granulosa de cabras para evaluar la respuesta esteroideogénica de estas células. Si se quiere probar la proliferación o la sobrevivencia celular, este sistema puede aplicarse para un periodo de cultivo de 6 días.

## VI. LITERATURA CITADA.

Adams C. P. Evans A. C. O. Rawlings. N. C. 1994. Follicular waves and circulating gonatrophins in 8-month-old prepubertal heifer. *J. Reprod. Fertil.* 100: 27-33.

Adashi E. Resnick C. E. D'ercole A. J. Svoboda M. E. Van WYK J. J. 1985a. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev.* 6: 400-420.

Adashi E. Resnick C. E. Svoboda M. E. Van WYK J. J. 1985b. Somatomedin-C enhances induction of luteinizing hormone receptor by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 116: 2369-2375.

Adashi E. Y. 1990. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology the role of resident ovarian cells of the with blood series. *Endocr Rev.* 11: 454-464.

Adashi E. Y. and Roban. R. M. 1992. Intraovarian Regulation. Peptidergic signaling system. *Trends endocrinol Metab.* 3: 243-248.

Allegrucci C. Hunter M. G. Webb R. and M. R. Luck M. R. 2003. Interaction of bovine granulosa and theca cells in a novel serum-free co-culture system. *Reproduction.* 126: 527-538.

Amoikon E. K. Fernandez J. M. Southern L. Thompson D. L. Ward T. L. and Olcott B. M. 1995. Effect of chromium tripicolinate on growth, glucose tolerance, insulin sensitivity, plasma metabolites, and growth hormone in pigs. *J. h i m . Sci.* 73: 1123-1130.

Amsterdam A. Plehn-Dujowich D. and Suh B. S. 1992. Structure-function relationships during differentiation of normal and oncogene-transformed granulosa cells. *Biol Reprod.* 46: 513-522.

Anderson R. A. 1997. Chromium as an essential nutrient for humans. *Regul toxicol pharmacol.* 26: S35-S41.

Armstrong D. G. Hogg C. O. Campbell B. K. Webb R. 1996a. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein production by primary cultures of ovine granulosa and theca cells. The effect of IGF-I, gonadotropin and follicle size. *Biol Reprod.* 55: 1163-1171.

Armstrong D. T. Xia P. De Gannes G. Tekpetey F. R. and Khamsi F. 1996b. Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. *Biol reprod.* 54: 331-338.

Armstrong D. G. Baxter G. Gutierrez C. G. Hogg C. O. Glazyrin A. L. Campbell B. K. Bramley T. A. Webb R. 1998. Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4

messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology*. 139: 2146–2154.

Armstrong D. G. Baxter G. Hogg C. O. and Woad K. J. 2002a. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction*. 123: 789–797.

Armstrong D. G. Gong J. G. Gardner J. O. Baxter G. Hogg C. O. and Webb R. 2002b. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction*. 123: 371–378.

Austin E. J. Mihm M. Evans A. C. O. Knight P. G. Ireland J. L. H. Ireland J. J. Roche J. F. 2001. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod*. 64: 839–848.

Baird D. T. 1978. Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol Reprod*. 18: 359-364.

Bao B. M. D. Calder S. Xie M. F. Smith R. S. Youngquist and Garverick H. A. 1997a. Steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid (mRNA) expression is limited to theca of healthy bovine follicles. *Biol Reprod*. 56(Suppl. 1): 143 (Abstr.).

Bao B. Garverick H. A. Smith G. W. Smith M. F. Salfen B. E. and Youngquist R. S. 1997b. Changes in messenger RNA encoding LH receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod*. 56: 1158-1168.

Bao B. Garverick H. A. Smith G. W. Smith M. F. Salfen B. E. and Youngquist R. S. 1997c. Expression of messenger RNA encoding 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $^{\circ}$ 5- $^{\circ}$ 4 isomerase during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3 $\beta$ -HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biol Reprod*. 56: 1466-1473.

Bao B. Garverick H. A. 1998. Expression of steroidogenic enzymes and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci*. 76: 1903–1921.

Beard A. J. Castillo R. J. McLeod B. J. Glenetoss R. G. Knight P. G. 1990. Comparison of the effect of crude and highly purified bovine inhibin (Mr 32000) on plasma concentrations of FSH and LH in chronically ovariectomized prepubertal heifers. *J Endocrinol*. 125: 21-30.

Berisha B. Schams D. Kosmann D. Amselgruber W. Einspanier R. 2000. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol*. 167: 371–382.

Berner T. O. Murphy M. M. Slesinski R. 2004. Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. *Food Chem Toxicol*. 42: 1029–1042.

Besnard N. Pisselet C. Monniaux D. Locatelli A. Benne F. Gasser F. Hatey F. and Monget P. 1996a. Expression of messenger ribonucleic acids of insulinlike growth factor binding proteins-2, -4 and -5 in the ovine ovary: localization and changes during growth and atresia of antral follicles. *Biol Reprod.* 55: 1356–1367.

Besnard N. Pisselet C. Zapf J. Hornebeck W. Monniaux D. and Monget P. 1996b. Proteolytic activity is involved in changes in intrafollicular insulin-like growth factor-binding protein levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology.* 137: 1599-1607.

Bhatia B. Price C. A. 2001. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells in Vitro. *Steroids.* 66: 511–519.

Bhushan S. Palta P. Bansal N. Sharma V. Manik R. S. 2005. Effect of insulin on the proliferation of and progesterone production by buffalo granulosa cells in Vitro. *Vet Rec.* 157: 746-748

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

Bryan M. A. Socha M. T. and Tomlinson D. J. 2004. Supplementing intensively grazed late-gestation and early-lactation dairy cattle with chromium. *J Dairy Sci.* 87: 4269–4277.

Bulnes A. G. Garcia R. M. G. Carrizosa J. A. Urrutia B. Souza C. J. H. Cocero M. J. Sebastian A. L. McNeilly A. S. 2004. Plasma inhibin A determination at start superovulatory FSH treatments is predictive for embryo outcome in gotas. *Domestic Anim Endocrinol.* 26: 259–266.

Burton J. L. Mallard B. A. and Mowat D. N. 1993. Effects of supplemental chromium on immune responses of periparturient and early lactation dairy cows. *J. h i m . Sci.* 71: 1532-1539.

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

Cahill L. P. Driancourt M. A. Chamley W. A. Findlay J. K. 1985. Role of intrafollicular regulators and FSH in growth and development of large antral follicles in sheep. *J Reprod Fertil.* 75: 599-607.

Campbell B. K. Scaramuzzi R. J. Webb R. 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil. Suppl.* 49: 335-350.

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

Campbell B. K. and Baird D. T. 2001. Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep. *J Endocrinol.* 169: 333–345.

Campbell B. K. Souza C. Gong J. Webb R. Kendall N. Marsters P. Robinson G. Mitchell A. Telfer E. E. Baird D. T. 2003. Domestic ruminants as models for elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reproduction.* 61: 429–443.

Campbell B. K. Eelfer E. E. Webb R. and Baird D. T. 2004. Evidence of a role for follicle-stimulating hormone in controlling the rate of preantral follicle development in sheep. *Endocrinology.* 145: 1870–1879.

Carson R. S. Richards J. S. Kahn L. E. 1981. Functional and morphological differentiation of theca and granulosa cells during pregnancy in the rat: dependence on increased basal luteinising hormone activity. *Endocrinology.* 109: 1433-1441.

Castro T. Rubianes. E. Menchaca A. and Rivero A. 1999. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology.* 52: 399- 411.

Chen G. Liu P. Pattar G. R. Tackett L. Bhonagiri P. Strawbridge A. B. and Elmendorf J. S. 2006. Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Mol. Endocrinology.* 20: 857–870.

Davidson T. R. Chamberlain C. S. Bridges T. S. and Spicer L. J. 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.

Davis C. M. and Vincent J. B. 1997. Chromium oligopeptide activates insulin receptor kinase activity. *Biochemistry.* 36: 4382-4385.

Dowling H. Offenbacher E. Pi-Sunyer X. 1990. Effects of aminoacids on the absorption of trivalent chromium and its retention by regions of the rat small intestine. *Nutr Res.* 10: 1261-1271.

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

Drummond A. E. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol.* 4: 16.

Ferrara N. Gerber H. P. LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9: 669–676.

Findlay J. K. 1993. An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod.* 48: 15-23.

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

Fortune J. E. 1986. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol Reprod.* 35: 292-299.

Fortune J. E & Quirk S. M. 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J Anim Sci.* 66 (Supplement 2) 1–8.

Fortune J. E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 50: 225-232.

Fortune J. E. Rivera G. M. & Yang M. Y. 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reproduc Sci.* 82–83 109–126.

Franchimont P. Hazee-Hageltin M. T. Charlet-Renard C. H. Jasper J. M. 1986. Effect of mouse epidermal growth factor on DNA and protein synthesis, progesterone and inhibin production by bovine granulosa cells in culture. *Acta Endocrinol. (Copenh),* 111: 122.

Garverick H. A. Baxter G. Gong J. Armstrong D. G. Campbell B. K. Gutierrez C. G. Webb R. 2002. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding hypogonadotrophic cattle. *Reproduction.* 123: 651–661.

Gentry L. R. Fernandez J. M. Ward T. L. White T. W. Southern L. L. Bidner T. D. Thompson Jr. D. L. Horohov D. W. Chapa A. M. and Sahlu T. 1999. Dietary protein and chromium tripicolinate in suffolk wether lambs: Effects on production characteristics, metabolic and hormonal responses, and immune status. *J Anim Sci.* 77: 1284–1294.

Gill A. Jamnongjit M. Hammes S. R. 2004. Androgens promote maturation and signalling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. *Mol Endocrinol.* 18: 97-104.

Ginther O. J. Wiltbank M. C. Fricke P. M. Gibbons J. R. and Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod.* 55: 1187-1194.

Ginther O. J. Beg M. A. Bergfelt D. R. Donadeu F. X. Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod.* 65: 638–647.

Ginther O. J. Beg M. A. Bergfelt D. R. Kot K. 2002. Activin A, estradiol and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. *Biol Reprod.* 67: 14–19.

Giudice L. C. 1992. Insulin-like growth factors and ovarian development. *Endocr Rev.* 13: 641-669.

Glister C. Tannetta D. S. Groome N. P. & Knight P. G. 2001. Interaction between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and

inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* 65: 1020–1028.

Glister C. Groome N. P. and Knight P. G. 2003. Oocyte-mediated suppression of follicle-stimulating hormone- and insulin-like growth factor-induced secretion of steroids and inhibin-related proteins by bovine granulosa cells in Vitro: Possible role of transforming growth factor  $\alpha$ . *Biol Reprod.* 68: 758–765.

Glister C. Groome. N. P. and Knight. P. G. 2006. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *J Endocrinol.* 188: 215–225.

Gómez G. A. Magaña G. P. 2004. Papel del cromo y del cinc en el metabolismo de la insulina. *Rev Med IMSS.* 42 (4): 347-352 MG.

Gong J. G. Campbell B. K. Bramley T. A. Guterrez C. G. Peters A. R. Webb. R. 1996. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotrophin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod.* 55: 68-74.

Gong J. G. Lee W. J. Garnsworthy P. C. and Webb R. 2002. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction.* 123: 419–427.

Gosden R. G. Baird D. T. Wade J. C. Webb R. 1994. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autographs stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Hum Reprod.* 9: 597-603.

Gudi R, Slesinski R. S, Clarke J. J, San R. H. C. 2005. Chromium picolinate does not produce chromosome damage in CHO cells. *Mut Res.* 587: 140–146.

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

Gutiérrez C. G. Campbell B. K. and Webb R. 1997b. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: Induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol Reprod.* 56: 608-616.

Gutiérrez C. G. Glazyrin A. L. Robertson G. W. Campbell B. K. Gong J. G. Bramley T. A. Webb R. 1997c. Ultra-structural characteristics of bovine granulosa cells associated with maintenance of estradiol production in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 134: 51-58.

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

Hampton J. H. Bader J. F. Lamberson W. R. Smith M. F. Youngquist R. S. Garverick H. A. 2004. Gonadotropin requirements for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated dairy cows. *Reproduction*. 127: 695–703.

Hayirli A. Bremmer D. R. Bertics S. J. Socha M. T. and Grummer R. R. 2001. Effect of Chromium Supplementation on Production and Metabolic Parameters in Periparturient Dairy Cows. *J Dairy Sci*. 84: 1218–1230.

Henderson K. M. Savage L. C. Ellen R. L. Ball K. McNatty K. P. 1988. Consequences of increasing or decreasing plasma FSH concentration during the preovulatory period in Romney ewes. *J Reprod Fertil*. 84: 187-196.

Hillier S. G. De Zwart F. A. 1981. Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro. *Endocrinology*. 109: 1303-1305.

Hillier S. G. Harlow C. R. Shaw H. J. Wikings E. J. Dixon A. F. Hodges J. K. 1988. Cellular aspects of pre-ovulatory folliculogenesis in primate ovaries. *Hum Reprod*. 3: 507-511.

Hillier S. G. Miro F. 1993. Inhibin activin and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 687: 29-38.

Hirshfield A. N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev. Cytol*. 124: 43-101.

Hodgen G. D. 1982. The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril*. 38: 281-300.

Horie K. Takakura K. Fujiwara H. Suginami H. Liao S. Mori T. 1992. Immunohistochemical localisation of androgen receptor in the human ovary throughout the menstrual cycle in relation to oestrogen and progesterone receptor expression. *Hum Reprod*. 7: 184-190.

Hsueh A. J. W. Welsh T. H. Jones P. B. C. 1981. Inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis by epidermal growth factor. *Endocrinology*. 108: 2002-2004.

Hu C. Cowan R. G. Harman R. M. and Quirk S. M. 2004. Cell cycle progression and activation of Akt kinase are required for insulin-like growth factor I-mediated suppression of apoptosis in granulosa cells. *Mol Endocrinol*. 18(2): 326–338.

Knight P. G. 1996. Roles of inhibins activins and follistatin in the female reproductive system. *Front Neuroendocrinol*. 17: 476-509.

Knight P. G. & Glister C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*. 121: 503–512.

Kulick L. J. Kot K. Wiltbank M. C. Ginther O. J. 1999. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*. 52: 913–921.

Langhout D. J. Spice L. J. and Geisert R. D. 1991. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *J Anim Sci.* 69: 3321-3334

Law A. S. Burt D. W. and Armstrong D. G. 1995. Expression of transforming growth factor- $\alpha$ -mRNA in chicken ovarian follicular tissue general and comparative. *Endocrinology.* 98: 227-233.

Lucy M. C. J. D. Savio L. Badinga R. L. De La Sota and Thatcher W. W. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci.* 70: 3615-3626.

Mariana J. C. Monniaux D. Driancourt M. A. Mauleon P. 1991. Folliculogenesis. *En reproduction in domestic animals.* 4<sup>th</sup> Edn. Ed. P. T. Cupps. Academic Press. San Diego, pp: 119-1771.

Martinez-Chequer J. C. Stouffer R. L. Hazzard T. M. Patton P. E. & Molskness T. A. 2003. Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol Reprod.* 68: 1112-1118.

McNamara J. P. and Valdez F. 2005. Adipose Tissue Metabolism and Production Responses to Calcium Propionate and Chromium Propionate. *J. Dairy Sci.* 88: 2498-2507.

McNatty K. P. 1982. Ovarian follicular development from the onset of luteal regression in humans and sheep. In *Follicular maturation and ovulation* Edited by: Rolland R, van Hall EV, Hillier SG, McNatty KP, Shoemaker J. Amsterdam, Excerpta Medica: 1-18.

McNatty K. P. Lun S. Hudson N. L. Forbes S. 1990. Effect of follicle stimulating hormona, cholera toxin, pertussis toxin and forskolin on adenosine 3'5'-monophosphate output by granulosa cells from Booroola ewes with or without the f gene. *J Reprod Fertil.* 89: 553-563.

McNatty K. P. Smith P. Hudson N. L. Heath D. A. Lun S. 1992. Follicular development and steroidogenesis. *En Local regulation of Ovarian Funtion.* Eds N-O Sjoberg, L., Hamberger P. O., Jansen C., Owman y H. Il J. Coelingh. The Pathenon Publishing Group Carnforth. Lancs, UK, pp: 21-28.

McNatty K. P. Heath D. A. Lundy T. Fidler A. E. Quirke L. O'Connell A. Smith P. Groome N. and Tisdall D. J. 1999. Control of early ovarian follicular development. *J Reprod Fert Suppl.* 54: 3-16.

Mertz W. 1988. Is chromium essential for humans? *Nutr Rev.* 46: 17-20.

Meza-Herrera C. A. Sánchez S. J. M. Chávez-Perches J.G. Salinas H. and Mellado M. 2004. Protein supplementation, body condition and ovarian activity in goats - Pre-ovulatory serum profile of insulin. *South African J Anim Sci.* 34 (Supplement 1).

Mihm M. Good T. E. M. Ireland J. L. H. Ireland J. J. Knight P. G. Roche J. F. 1997. Decline in follicle stimulating concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in the selection of the dominant follicle in heifers. *Biol Reprod.* 63: 811-819.

- Mulheron G. W. Danielfour D. and Schomberg D. W. 1991. Rat thecal interstitial cells express transforming growth factor-type 1 and 2, but only type 2 is regulated by gonadotropins in vitro. *Endocrinology*. 129: 368–374.
- Neufeld G. Ferrara N. Schweigerer L. Mitchell R. Gospodarovicz. 1987. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth growth factor. *Endocrinology*. 121: 597-603.
- Poretsky L. Cataldo N. A. Osenwaks Z. Giudice L. C. 1999. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev*. 20: 535-582.
- Quirk S. M. Cowan R. G. Harman R. M. Hu C. L. and. Porter D. A. 2004. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci*. 82(E. Suppl.): E40–E52.
- Redner D. A. Reynolds L. P. 1996. Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod*. 1: 182-192.
- Rivera G. M. Chandrasekher Y. A. Evans A. C. O. Giudice L. C. Fortune J. E. 2001. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. *Biol Reprod*. 65: 102–111.
- Robinson R. S. Hammond A. J. Hunter M. G. Mann G. E. 2004. Pre-ovulatory follicle dynamics and subsequent corpus luteum function in the cow. *Reproduction*. Abstr. Ser. 31, 1.
- Roberts A. J. Skinner M. K. 1991. Transforming growth factor- $\alpha$  and  $-\beta$  differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology*. 129: 2041-2048.
- Roche J. F. and Boland M. P. 1991. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenology*. 35: 81-90.
- Rosenfeld C. S. Yuan X. Manikkam M. Calder M. D. & Garverick H. A. 2001. Cloning, sequencing and localization of bovine estrogen receptor-b within ovarian follicle. *Biol Reprod*. 60: 691–697.
- Savio J. D. Thatcher W. W. Badinga L. Sota R. L. D. I. Wolfenson D. 1993. Regulation of dominant Follicle turnover during the oestrous cycle of cows. *J Reprod Fertil*. 97: 1997-2003.
- Scaramuzzi R. J. Adams N. R. Baird D. T. et al. 1993. A model for follicle selection and the determination of the ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev*. 5: 459–478.
- Schams D. Berisha B. Kosmann M. & Amselgruber W. M. 2002. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domest Anim Endocrinol*. 22: 51–72.

Schvick F. N. Surface R. A. Pritchard J. Y. Dailey R. A. Townsend E. C. Inskeep E. K. 1993. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol Reprod.* 49: 1133-1140.

Seaborn C. Stoecker B. 1990. Effects of antacid ascorbic acid on tissue accumulation and urinary excretion of Cr51 chromium. *Res Nutr.* 10: 1401-1407.

Shelton J. L. Payne R. Johnston S. L. Bidner T. D. Southern L. L. Odgaard R. L. and Page T. G. 2003. Effect of chromium propionate on growth, carcass traits, pork quality, and plasma metabolites in growing-finishing pigs. *J Anim Sci.* 81: 2515–2524.

Silva J. M. and Price C. A. 2000. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding Cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in Vitro. *Biol Reprod.* 62: 186–191.

Smith K. L. Waldron M. R. Drackley J. K. Socha M. T. and Overton T. R. 2005. Performance of dairy cows as affected by prepartum dietary carbohydrate source and supplementation with chromium throughout the transition period. *J Dairy Sci.* 88: 255–263.

Spicer L. J. Alpizar E. and Echternkamp S. E. 1993. Effects of insulin, 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. Echternkamp S. E. 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Dom Anim Endocrinol.* 12: 223-245.

Spicer L. J. & Chamberlain C. S. 2000. Production of insulin-like growth factor-I by granulosa cells but not theca cells is hormonally responsive in cattle. *J Anim Sci.* 78: 2919–2926.

Spicer L. J. 2001. Receptors for insulin-like growth factor-I and tumor necrosis factor- $\alpha$  are hormonally regulated in bovine granulosa and thecal cells. *Anim Reprod Sci.* 67: 45–58.

Spicer L. J. Chamberlain C. S. Maciel S. M. 2002. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol.* 22: 237–254.

Stearns D. M, Silveira S. M, Wolf K. K, Luke A. M. 2002. Chromium (III) tris (picolinate) is mutagenic at the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res.* 513: 135–142.

Stewart R. E. Spicer L. J. Hamilton T. D. & Keefer B. E. 1995. Effects of insulinlike growth factor-I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: Involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. *J Anim Sci.* 73: 3719–3731.

Stock A. E. Fortune J. E. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle; relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*. 132: 1108-1114.

Striffer J. Polansky M. Anderson R. 1993. Dietary chromium enhances insulin secretion in perfused rat pancreas. *J Trace Elem Exper Med*. 6: 75-81.

Sun Y. Ramirez J. Stephen A. Woski J. Vincent B. 2000. The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr. *JBIC*. 5: 129-136.

Szoltys M. Slomczynska M. 2000. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 108: 228-234.

Tetsuka M. Whitelaw P. F. Bremner W. J. Millar M. R. Smyth C. D. Hillier S. G. 1995. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J Endocrinol*. 145: 535-543.

Tetsuka M. Hillier S. G. 1996. Androgen receptor gene expression in rat granulosa cells: the role of follicle-stimulating hormone and steroid hormones. *Endocrinology*. 137: 4392-4397.

Vincent J. B. 2000. The biochemistry of chromium. *J Nutr*. 130: 715-718.

Webb. R. Gong. L. G. Bramley T. A. 1994. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology*. 41: 25-30.

Webb R. Nicholas B. Gong J. G. Campbell B. K. Gutierrez C. G. Garverick H. A. Armstrong D. G. 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction*. 61: 71-90.

Webb R. Garnsworthy P. C. Gong J.-G. and Armstrong D. G. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci*. 82 (E. Suppl.): E63-E74.

Weil S. Vendola K. Zhou J. Bondy C. A. 1999. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*. 84: 2951-2956.

Xiao S. Findlay J. K. Robertson D. M. 1990. The effect of bovine activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH-induced differentiation of rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 69: 1-8.

Xiao S. Findlay J. K. 1991. Interactions between activin and FSH suppressing protein and their mechanisms of action on cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 79: 99-107.

Xu Z. Z. Garverick H. A. Smith G. W. Smith M. F. Hamilton S. A. Younquist R. S. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod.* 53: 951-957.

Yang M. Y. and Rajamahendran R. 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* 62: 1209–1217.

Yu N. and Roy S. K. 1999. Development of Primordial and Prenatal Follicles from Undifferentiated Somatic Cells and Oocytes in the Hamster Prenatal Ovary In Vitro: Effect of Insulin. *Biol Reprod.* 61: 1558–1567.

Yu Y. S. Sui H. S. Han Z. B. Li W. Luo M. J. Tan J. H. 2004. Apoptosis in Granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors. *Cell Res.* 14(4): 341-346.

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

Yuan W. Lucy M. C. Smith M. F. 1996. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and II, insulin-like growth factor binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biol Reprod.* 55: 1045–1054.

Zelenik A. J. Schuler H. M. Reichert J. R. L. E. 1981. Gonadotrophin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotrophin to the preovulatory follicle. *Endocrinology.* 109: 356–362.