



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

---

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**La esfingosina 1-fosfato (S1P) como mediador de los efectos biológicos de la hormona luteinizante (LH) en células de la teca de bovino.**

**T E S I S**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Biología de la Reproducción Animal**

PRESENTA

**Zaire Belen Medina Moctezuma**

COMITÉ TUTORAL

Co-Directora:

**Dra. Ana María Rosales Torres**

Co-Director:

**Dr. Adrián Guzmán Sánchez**

Asesor:

**Dr. Edmundo Bonilla González**

Iztapalapa, Ciudad de México, 08 de febrero del 2021.



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

**LA ESFINGOSINA 1-FOSFATO (S1P) COMO MEDIADOR DE LOS EFECTOS  
BIOLÓGICOS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH) EN CÉLULAS DE LA  
TECA DE BOVINO.**

La presente tesis fue realizada con el asesoramiento y vigilancia del comité tutorial que a continuación se menciona, siempre en apego a lo estipulado en el plan de estudios del posgrado.

**COMITÉ TUTORAL**

Co-Directora  
Dra. Ana María Rosales Torres

Profesor Investigador Titular "C" Tiempo completo  
Departamento de Producción Agrícola y Animal UAM-X  
Investigador Nacional Nivel II  
[anamexico@gmail.com](mailto:anamexico@gmail.com)

Co-Director  
Dr. Adrián Guzmán Sánchez

Profesor Investigador Titular "C" Tiempo completo  
Departamento de Producción Agrícola y Animal UAM-X  
Investigador Nacional Nivel I  
[aguzman051181@gmail.com](mailto:aguzman051181@gmail.com)

Asesor  
Dr. Edmundo Bonilla González

Profesor Investigador Titular "C" Tiempo completo  
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I  
Investigador Nacional Nivel II  
[mundo@xanum.uam.mx](mailto:mundo@xanum.uam.mx)

## **JURADO DE EXAMEN**

Dr. Edmundo Bonilla González  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa  
[mundo@xanum.uam.mx](mailto:mundo@xanum.uam.mx)

Dra. Edith Arenas Ríos  
Departamento de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa  
[editharenas2000@yahoo.com.mx](mailto:editharenas2000@yahoo.com.mx)

Dra. María Del Rosario Tarragó Castellanos  
Departamento de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa  
[mrtc@xanum.uam.mx](mailto:mrtc@xanum.uam.mx)

Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado  
Departamento de Reproducción  
Estancia Posdoctoral, UNAM, FMVZ.  
[cyndibash87@gmail.com](mailto:cyndibash87@gmail.com)

La presente tesis fue realizada en el laboratorio de Bioquímica de la Reproducción perteneciente al Departamento de Producción Agrícola y Animal en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Este trabajo fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por medio del proyecto “Esfingosina-1-fosfato (S1P) como mediador de hormonas que estimulan receptores ligados a proteína G” (No. de proyecto A1-S-21990).

El posgrado de Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT (PNCP) Registro 003797.

Durante mi formación en el posgrado de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con el número de becario 937011 durante el periodo 2018-2020.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **La esfingosina 1-fosfato (S1P) como mediador de los efectos biológicos de la hormona luteinizante (LH) en células de la teca de bovino**, con fecha 08 de febrero del 2021.



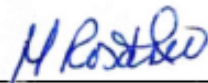
---

Dr. Edmundo Bonilla González  
PRESIDENTE



---

Dra. Edith Arenas Ríos  
SECRETARIO



---

Dra. María Del Rosario Tarragó Castellanos  
VOCAL



---

Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado  
VOCAL

## **DEDICADO A:**

A mis padres **Patricia Moctezuma** y **Miguel Ángel Medina** quienes me han brindado todo su amor y apoyo incondicional en todos los aspectos, siempre cuidándome y dándome todo lo necesario para que yo pudiera lograr mis objetivos. Gracias a ustedes he logrado llegar hasta este punto.

A mi hermana **Iran Medina** que siempre confía en mí, quien muchas veces me ha ayudado a creer en mí misma y no abandonar mis objetivos, es para mí un ejemplo de nunca rendirse pese a las circunstancias.

Y a mí adorada abuelita **Gloria Martínez** quien, con su sonrisa, su lindura y ternura, me hace ver que todo el esfuerzo ha valido la pena.

Ustedes son mi motor y mi motivación para nunca darme por vencida.

Con mucho amor, Zaire.

## **AGRADECIMIENTOS**

A **Dios** y a mi **Virgencita** por todas las bendiciones y abundancias en mi vida.

A mis amados **padres, hermana y abuelita**.

A mi alma mater, la **Universidad Autónoma Metropolitana** que me ha brindado la oportunidad de crecer en todos los sentidos por los últimos 8 años de mi vida.

A la **Dra. Ana María Rosales Torres**, quien sin conocerme me brindó toda su confianza y me incorporo a su equipo de investigación, quien me ha apoyado y guiado para lograr mis metas durante este tiempo. Es para mí un ejemplo a seguir.

Al **Dr. Adrián Guzmán Sánchez** quien también me abrió las puertas del laboratorio y me brindó todo su conocimiento e inspiró a crecer académicamente.

Al **Dr. Edmundo Bonilla González** por su gran apoyo y aportaciones en este proyecto.

A la **Dra. Cyndi Hernández Coronado**, quien me ha apoyado tanto académicamente como personalmente, de quien siempre aprendo algo nuevo, fomentando el deseo de cultivarme constantemente y la habilidad de siempre buscar alternativas. Gracias por todo el tiempo de trabajo que me has apoyado.

A la **Dra. Edith Arenas Ríos**, por su gran apoyo en todos los aspectos en la coordinación del posgrado. Así como a los **miembros de la comisión de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal**.

A la **Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos**, por sus enseñanzas dentro y fuera del aula, no solo académicas sino también personales, es una gran profesora que me ha dejado grandes aprendizajes.

A mis compañeras y amigas del laboratorio **Jahdai Hernández** y **Lydia Marín** con quienes he compartido mucho tiempo de trabajo, de enseñanzas, pero sobre todo de amistad, de apoyo y felicidad.

A mi gran compañero y amigo **David Aretia**, con quien he compartido tantos momentos de estrés y tristeza, pero sobre todo de risas y felicidad, porque al final siempre estamos el uno para el otro apoyándonos incondicionalmente, tanto académicamente como personalmente. Infinitas gracias por todo amigo.

A mis compañeros de la maestría, con quienes compartí muchos momentos de aprendizaje y felicidad. Muy en especial a **Gihovani Samano**, quien me apoyo en muchos aspectos de mi vida durante esta etapa.

A mis mejores amigos desde la licenciatura **Daniel Olalde**, **Diana Vázquez**, **Alexa Gutiérrez** y **Paloma Arenales**, quienes, a pesar del tiempo y la distancia, nos mantenemos unidos, siempre apoyándonos.

Finalmente, al **CONACYT** por la beca otorgada para llevar a cabo este proyecto.

Sin su apoyo no habría sido posible

Todo mi agradecimiento para ustedes

Zaire



## RESUMEN

La esfingosina 1-fosfato (S1P) es un esfingolípido implicado en procesos de esteroidogénesis, sobrevivencia y proliferación celular. El objetivo de este trabajo fue reconocer el papel de la S1P como mediador de los efectos biológicos de la hormona luteinizante (LH) en células de la teca de bovino. Células de la teca fueron cultivadas en medio MacCoys 5a modificado por 96 horas (37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad) con 0, 0.1, 1 y 10 ng/mL de LH, siendo las dosis bajas de LH (0.1 y 1 ng/mL) las que promueven la viabilidad celular ( $P < 0.05$ ). Adicionalmente, se cuantificó en el medio de cultivo la concentración de S1P por la técnica de ELISA, demostrando que la dosis de 0.1 ng/mL de LH estimula una mayor concentración de S1P ( $P < 0.05$ ), esta dosis fue elegida como ideal para los subsecuentes experimentos. Por otro lado, se identificó por Western Blot la presencia de la esfingosina cinasa 1 fosforilada (SK1p) en células de la teca. Para determinar el papel de S1P como mediador de LH en los efectos de viabilidad celular y esteroidogénesis. Se realizaron cultivos de células de la teca a los que se les adicionó un inhibidor de la esfingosina cinasa 1 (SKI-178) en presencia o ausencia de 0.1 ng/mL de LH. La viabilidad celular se determinó por la técnica de MTT y se observó un incremento en presencia de 0.1 ng/mL de LH y una reducción en presencia del SKI-178 ( $P < 0.05$ ). En cuanto a los efectos esteroidogénicos, se cuantificó la concentración de progesterona y testosterona por la técnica de ELISA. La síntesis de progesterona tiende a incrementar con 0.1 ng/mL de LH ( $P = 0.09$ ), mientras que en presencia del SKI-178 disminuyó marcadamente su síntesis ( $P < 0.05$ ). Finalmente, la concentración de testosterona no se modificó tras la adición de 0.1 ng/mL de LH ( $P = 0.41$ ), mientras que el uso del SKI-178 por sí solo, incrementó la concentración de esta hormona ( $P < 0.05$ ). En conclusión, en este trabajo se determina por primera vez, que la LH estimula la síntesis de S1P en células de la teca y, además, se reconoce el papel de este esfingolípido bioactivo como mediador de LH en la viabilidad celular y síntesis de progesterona en células de la teca de bovino en cultivo.

Palabras clave: Cultivo de células de la teca, bovino. LH, S1P.

## **ABSTRACT**

Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a sphingolipid involved in processes of steroidogenesis, survival and cell proliferation. The aim of this work was to recognize the role of S1P as mediator of the biological effects of luteinizing hormone (LH) on bovine theca cells. Theca cells were grown for 96 hours in modified McCoys 5a medium (37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity) with 0, 0.1, 1 and 10 ng/mL LH, where low doses of LH (0.1 and 1 ng/mL) were shown to promote cellular viability (P <0.05). In addition, the culture medium was quantified by the concentration of S1P by the ELISA technique, demonstrating that the dose of 0.1 ng/mL of LH stimulates a higher concentration of S1P (P<0.05), so the dose of 0.1 ng/mL was chosen as an ideal dose for subsequent experiments. On the other hand, the presence of sphingosine kinase 1 phosphorylated (SK1p) in theca cells by Western Blot is identified. To determine the role of S1P as an LH mediator in the effects of cell viability and steroidogenesis, theca cell cultures were performed to which a sphingosine kinase 1 inhibitor (SKI-178) was added in the presence or absence of 0.1 ng/mL of LH. Cell viability was determined by the MTT technique, where the viability was observed to increase in the presence of 0.1 ng/mL LH and reduced in the presence of SKI-178 (P<0.05). As for the steroidogenic effects, the concentration of progesterone and testosterone was quantified by the ELISA technique. Progesterone synthesis tends to increase after the stimulus of 0.1 ng/mL LH (P=0.09), while in the presence of SKI-178 sharply decreases synthesis (P<0.05). Finally, the concentration of testosterone was not modified after the addition of 0.1 ng/mL of LH (P=0.41), while only using the SKI-178, increased the concentration of this hormone (P<0.05). In conclusion, this work determines for the first time, the synthesis of S1P in LH stimulus theca cells and further recognizes the role of S1P as an LH mediator in cell viability and progesterone synthesis in cultured bovine theca cells.

Keywords: Theca cell culture, cattle. LH, S1P.

## **ÍNDICE GENERAL**

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Desarrollo folicular	3
2.1.1. Origen embrionario de folículos primordiales	3
2.1.2. Clasificación morfológica de los folículos	3
2.1.3. Regulación del desarrollo de folículos preantrales	6
2.1.4. Regulación del desarrollo de folículos antrales	6
2.1.4.1. Reclutamiento cíclico	6
2.1.4.2. Selección y dominancia	7
2.2. Gonadotropinas	9
2.2.1. Estructura	9
2.2.2. Síntesis	9
2.2.3. Mecanismo de acción	10
2.2.4. Hormona luteinizante	12
2.2.4.1. Funciones	12
2.2.4.2. Efecto sobre la supervivencia y proliferación celular	12
2.2.4.3. Efecto esteroideogénico	12
2.2.4.3.1. Progesterona	14

2.2.4.3.1.1. Mecanismo de acción	14
2.2.4.3.1.2. Funciones	15
2.2.4.3.2. Testosterona	16
2.2.4.3.2.1. Mecanismo de acción	17
2.2.4.3.2.2. Funciones	17
2.2.5. Hormona folículo estimulante	19
2.2.5.1. Funciones	19
2.2.5.1.1. Efecto sobre la sobrevivencia y proliferación celular	19
2.2.5.1.2. Efecto esteroideogénico	19
2.3. Esfingolípidos	21
2.3.1. Esfingosina 1 Fosfato	21
2.3.1.1. Estructura	21
2.3.1.2. Síntesis	22
2.3.1.3. Mecanismo de acción y vía de señalización	24
2.3.1.3.1. Intracelular	24
2.3.1.3.2. Extracelular	25
2.3.1.4. Funciones de S1P	27
2.3.1.4.1. S1P y la sobrevivencia celular	27
2.3.1.4.2. S1P y la esteroideogénesis	27
2.3.1.4.3. S1P en el desarrollo folicular	28

3. JUSTIFICACIÓN	30
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo general	31
4.2. Objetivos específicos	31
5. HIPÓTESIS	31
6. MATERIAL Y MÉTODOS	32
6.1. Diseño experimental	32
6.2. Colección de folículos y obtención de sacos foliculares	33
6.3. Obtención de células de la teca	34
6.3.1. Digestión enzimática	34
6.3.2. Número de células de la teca por azul de tripán (4%)	34
6.4. Cultivo de células de la teca	35
6.5. EXPERIMENTO 1	35
6.5.1. Efecto de LH sobre la síntesis de S1P	35
6.5.1.1 Determinación del número de células de la teca por MTT	36
6.5.1.2. Determinación de S1P en medio de cultivo de células de la teca	36
6.5.1.3. Identificación de esfingosina cinasa 1 en células de la teca mediante Western Blot.	37

6.6. EXPERIMENTO 2	
6.6.1. La síntesis de S1P en respuesta a LH es un mediador de los efectos de esta hormona en células de la teca.	38
6.6.1.1. Determinación de viabilidad de células de la teca en respuesta a S1P como mediador de LH por MTT.	38
6.6.1.2. Determinación de los efectos esteroideogénicos de células de la teca en respuesta a S1P como mediador de LH por ELISA.	40
6.7. Análisis estadístico	40
7. RESULTADOS	41
7.1. La LH incrementa la viabilidad de células de la teca de bovino en cultivo.	41
7.2. La LH estimula la síntesis de S1P en células de la teca	42
7.3 Identificación de la enzima esfingosina cinasa 1 fosforilada en células de la teca de bovino.	43
7.4. La síntesis de S1P en respuesta LH es un mediador de los efectos de esta hormona en células de la teca de bovino.	44
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES	54
10. BIBLIOGRAFÍA	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación morfológica de los folículos	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura de una molécula de progesterona	<b>14</b>
<b>Figura 3.</b> Estructura de una molécula de testosterona	<b>16</b>
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de la LH y principales efectos biológicos en las células de la teca	<b>18</b>
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de la FSH y principales efectos biológicos en las células de la granulosa	<b>20</b>
<b>Figura 6.</b> Metabolismo y función celular de los principales esfingolípidos bioactivos.	<b>24</b>
<b>Figura 7.</b> Diseño experimental	<b>32</b>
<b>Figura 8.</b> Cinco cultivos de células de la teca	<b>36</b>
<b>Figura 9.</b> Curva estándar de células de la teca viables	<b>39</b>
<b>Figura 10.</b> Efecto de diferentes dosis de la hormona luteinizante (LH) sobre el número de células de la teca viables después de 96 h de cultivo.	<b>41</b>
<b>Figura 11.</b> Concentración de S1P en el medio de cultivo de células de la teca cultivadas por 96 h, y tratadas con cuatro dosis de LH (0, 0.1, 1 y 10 ng/mL).	<b>42</b>
<b>Figura 12.</b> Presencia de esfingosina cinasa 1 fosforilada (SK1p) y GAPDH.	<b>43</b>
<b>Figura 13.</b> Efecto del inhibidor de SK1 en presencia o no de 0.1 ng/mL de LH, sobre la viabilidad de las células de la teca de bovino en cultivo por 96 h.	<b>44</b>
<b>Figura 14.</b> Efecto del inhibidor de SK1 en presencia o no de 0.1 ng/mL de LH, sobre la síntesis de progesterona de las células de la teca de bovino en cultivo de 96 h.	<b>45</b>
<b>Figura 15.</b> Efecto del inhibidor de SK1 en presencia o no de 0.1 ng/mL de LH, sobre la síntesis de testosterona de las células de la teca de bovino en cultivo de 96 h.	<b>46</b>

## ABREVIATURAS

**AC:** Adenilato ciclasa

**ACTH:** Hormona adrenocorticotropa

**AKT/PKB:** Proteína cinasa B

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**AR:** Receptor androgénico

**ATP:** Adenosín trifosfato

**CGP:** Células germinales primordiales

**COX-2:** Ciclooxygenasa-2

**CREB:** Proteína de unión a elementos reguladores cAMP

**DAG:** Diacilglicerol

**E2:** Estradiol

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

**ERK:** MAP quinasa

**ERK1/2:** Proteínas cinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2

**FD:** Folículo dominante

**FSH:** Hormona foliculoestimulante

**FSH:** Receptor de LH

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GDF9:** Factor de crecimiento de fibroblastos-9

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas

**GREL:** Gonadal Ridge Epithelial-Like

**GTPasa:** Guanosina trifosfatasa

**HDL:** Lipoproteínas de alta densidad

**HGF:** Factor de crecimiento de hepatocitos

**IFNG:** Interferón gamma

**IGF-1:** Factor de crecimiento similar a la insulina 1

**IP3:** Inositol trifosfato

**IP3K:** Vía de fosfoinositol-3 quinasa

**JNKs:** cinasas N-terminales C-Jun



**LAL:** Lipasa de ácido lisosomal

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad

**LH:** Hormona luteinizante

**LHR:** Receptor de LH

**LPP:** Fosfohidrolasa de fosfato lipídico

**LRH-1:** Receptor hepático homólogo 1

**MAPK/ERK:** Proteínas cinasas activadas por mitógenos.

**NFAT:** Factor nuclear de células T activadas

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa B

**PGE2:** Prostaglandina E2

**PKA:** Proteína cinasa A

**PKC:** Proteína Cinasa C

**PLC:** Fosfolipasa C

**PLD:** Fosfolipasa D

**PP2A:** Proteína fosfatasa 2

**S1P:** Esfingosina 1-Fosfato

**S1PRs:** Receptores de S1P

**S1PL:** Liasa de S1P

**SHBG:** Globulina transportadora de hormonas sexuales

**SK-178:** Inhibidor de SK1

**SK1:** Esfingosina cinasa 1

**SK1p:** Esfingosina cinasa 1 fosforilada

**SK2:** Esfingosina cinasa 2

**SPP:** Fosfatasa de S1P

**SREP:** Elemento regulador de esteroides

**StAR:** Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular

**3 $\beta$ -HSD:** 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo folicular depende principalmente de la diferenciación, proliferación y sobrevivencia de las células foliculares (Rosales-Torres & Guzmán, 2011). Existen factores de crecimiento y hormonas que promueven estos procesos dentro de los cuales destacan la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Aerts & Bols, 2010; Rosales-Torres & Guzmán, 2011). La LH actúa en células de la teca durante todo el desarrollo de folículos antrales, mientras que durante la dominancia folicular actúa también en células de la granulosa (Young & McNeilly, 2010). En células de la teca, la LH se une a su receptor acoplado a proteína Gs, incrementa la producción de AMP cíclico (AMPc) y con ello permite la activación de la proteína cinasa A dependiente de AMPc (PKA), la cual favorece la esteroidogénesis, la proliferación y sobrevivencia de células de la teca (Guzmán, *et al.*, 2017).

Además de la LH y la FSH existen otras moléculas que favorecen la esteroidogénesis, la proliferación y sobrevivencia celular durante el desarrollo de folículos antrales (Rosales-Torres & Guzmán, 2011). La esfingosina 1-fosfato (S1P), es un esfingolípido bioactivo y pleiotrópico que promueve, la proliferación, sobrevivencia y migración en muchos tipos celulares (Daum, *et al.*, 2009; Bartke & Hannun 2009; Mendelson, *et al.*, 2014) y es considerada un mediador de la esteroidogénesis adrenal y gonadal (Ozbay, *et al.*, 2006). La S1P es sintetizada a partir de precursores como la ceramida y la esfingosina, los cuales participan en funciones antagónicas a S1P, es decir, en la senescencia, apoptosis, necrosis, entre otros (Bartke & Hannun, 2009). La esfingosina cinasa 1 (SK1), es activada por diversos factores de crecimiento y hormonas, como la FSH (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016), esta enzima fosforilada es la encargada de agregar un grupo fosfato a la esfingosina, transformándola en S1P. Dichos esfingolípidos sintetizados tienen la capacidad de ser moléculas interconvertibles en su metabolismo, por lo tanto, la relación entre las concentraciones de los esfingolípidos determina el destino celular (Guo, *et al.*, 2014).

Recientemente, se demostró que la producción de S1P es mayor en células de la teca de folículos sanos que en células de folículos atrésicos (Hernández-Coronado, *et al.*, 2015). Además, en células de la granulosa en cultivo se comprobó que la FSH a través de la activación de SK1 estimula la producción de S1P y que la inhibición de esta enzima reduce la síntesis de S1P y con ello el número de células de la granulosa metabólicamente activas en el cultivo (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016). Adicionalmente, se mostró que dosis bajas de S1P (0.1  $\mu$ M) favorecen la proliferación de células de la granulosa en cultivo (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016). Asimismo, S1P ha demostrado estimular la proliferación de células del estroma ovárico (Soleimani, *et al.*, 2011). Además, S1P presenta un efecto antiapoptótico cuando se adiciona (1 y 10 mM) en presencia de peróxido de hidrógeno como inductor de la apoptosis, en células de la granulosa luteinizadas de humano (Nakahara, *et al.*, 2012). En otros estudios se ha reconocido el papel de S1P como agente citoprotector en la terapia contra el cáncer y en la criopreservación (Hernández-Coronado, *et al.*, 2019). La S1P ha demostrado un efecto positivo en la calidad de los folículos primordiales y un estímulo en la proliferación de las células de la granulosa de ovarios de oveja post criopreservados (Henry, *et al.*, 2016). En ovocitos de rata inducidos a radioterapia, la administración de 200  $\mu$ M de S1P favorece la sobrevivencia (Morita, *et al.*, 2000). Finalmente, el uso de S1P incrementa en el número de folículos primordiales sanos y de la concentración del ARNm de la hormona anti-Mülleriana en estímulo de un quimioterapéutico (Tan, *et al.*, 2014).

Debido a que las hormonas gonadotróficas y la S1P comparten algunos efectos biológicos en su célula blanco. Adicionalmente, la FSH estimula la producción de S1P en células de la granulosa y dado que la FSH y la LH actúan a través de receptores Gs, proponemos que la LH participa en la modulación de la síntesis de la S1P y que este esfingolípido es un mediador de los efectos de viabilidad y esteroidogénesis de células de la teca de bovino en cultivo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Desarrollo folicular

#### 2.1.1. Origen embrionario de folículos primordiales

El desarrollo de los folículos primordiales de la hembra bovina y en la mayoría de los mamíferos comienza desde la etapa fetal (Peña, *et al.*, 2007). Las células germinales primordiales (CGP) que darán origen a los ovocitos provienen del saco vitelino y se dirigen hacia la cresta gonadal ubicada en la superficie mesonéfrica, la cresta gonadal se desarrolla mediante la presencia de células epiteliales que se diferencian a células GREL (Gonadal Ridge Epithelial-Like) las cuales se diferencian a células de la granulosa. Un ovocito primario rodeado de una capa de células GREL y la lámina basal da origen a un folículo primordial (Hummitzsch, *et al.*, 2013). Los folículos primordiales se albergan en la región interna de la corteza ovárica a partir del día 90 de gestación en bovinos (Yang & Fortune, 2008).

#### 2.1.2. Clasificación morfológica de los folículos

Los folículos ováricos se pueden clasificar con base en sus características anatómicas, regulación hormonal y presencia o no del antro folicular. Basado en las características anatómicas los folículos se clasifican como folículos primordiales, primarios, secundarios tempranos y tardíos, terciarios pequeños y grandes y preovulatorios. Con base a la regulación hormonal los folículos se clasifican en folículos independientes de gonadotropinas que incluye a los folículos primordiales, primarios, secundarios tempranos y en folículos dependientes de gonadotropinas que son los folículos secundarios tardíos, terciarios y preovulatorios. Finalmente, una característica anatómica del folículo terciario es el desarrollo de un antro folicular, así que, basados en la presencia de esta estructura, los folículos también pueden clasificarse en preantrales (primarios y secundarios tempranos y tardíos) y antrales (terciarios y preovulatorios). Para que un folículo pueda liberar al ovocito durante la ovulación éste

debe desarrollarse desde primordial hasta preovulatorio, proceso que en bovinos ocurre en un lapso de 3 a 4 meses aproximadamente (Webb *et al.*, 2004).

El folículo primordial está constituido por un ovocito primario, una capa de células planas denominadas células de la pregranulosa, rodeados por una lámina basal, esta lámina basal está presente en todos los estadios del desarrollo folicular (Wear, *et al.*, 2016). El folículo primordial tiene un diámetro de 30  $\mu\text{m}$  aproximadamente en bovinos (Filipiak, *et al.*, 2016).

Una vez activado el folículo primordial dará origen a un folículo primario, la mayoría de estos folículos primarios (aproximadamente 83%) presentan forma elipsoide (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010), las células de la pregranulosa que lo conforman cambian morfológicamente de aplanadas a cuboidales, denominándose células de la granulosa. Además, estas células proliferan aumentando aproximadamente de 11 a 40 células (Rosales-Torres & Guzmán, 2011). Los folículos primarios tienen un diámetro de 40-80  $\mu\text{m}$  en bovinos (Filipiak, *et al.*, 2016).

El folículo primario se desarrolla a folículo secundario, en el cual las células de la granulosa continúan proliferando hasta formar dos o más capas. En el estadio de folículo secundario, se presentan los gránulos corticales en el citoplasma del ovocito (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010) inicia la formación de la zona pelúcida cuando el ovocito alcanza un diámetro de 81  $\mu\text{m}$  en bovinos (Filipiak, *et al.*, 2016) y comienza la diferenciación de las células de la teca a partir de células estromales próximas a la lámina basal o reclutadas del estroma ovárico, dando lugar a las células de la teca interna y células de la teca externa (Young & McNeilly, 2010). La matriz extracelular de dichas células posee vasos sanguíneos proporcionándole irrigación propia al folículo (Richards, *et al.* 2018; Pawlina & Ross, 2016). El folículo secundario de bovino tiene un tamaño de 80 a 250  $\mu\text{m}$  (Filipiak, *et al.*, 2016).

Como consecuencia de los cambios morfológicos producidos en el folículo secundario inicia la formación del antro folicular, dando origen a un folículo terciario pequeño que contiene alrededor 6 o más capas de células de la granulosa y capas de células de la teca diferenciadas (Torres & Sánchez, 2008). La proliferación celular continúa durante el desarrollo del folículo terciario y el antro folicular también aumenta su volumen hasta alcanzar el estadio preovulatorio, con un diámetro de 20 mm en vacas (Evans, 2003) (Figura 1).

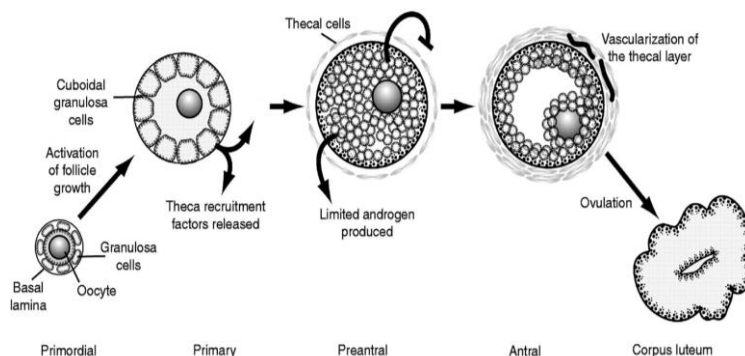


Figura 1. Clasificación morfológica de los folículos (Modificado de Young & McNeilly, 2010).

Al nacimiento el ovario bovino posee alrededor de 150,000 folículos primordiales de los cuales solo el 0.05% alcanzará el estadio preovulatorio (Peña, et al. 2007). Por lo tanto, cada folículo primordial posee dos destinos, el primero es desarrollarse en respuesta a los estímulos hormonales, atravesando las etapas anteriormente mencionadas hasta alcanzar la ovulación, mientras que el segundo y más frecuente es sufrir atresia, degradarse y desaparecer del ovario, durante alguna etapa del desarrollo folicular (Flores-Pérez, et al., 2005).

### 2.1.3. Regulación del desarrollo de folículos preantrales

Se denomina reclutamiento inicial, a la incorporación de algunos folículos primordiales al grupo de folículos en crecimiento para alcanzar el estadio de un folículo secundario que alberga a un ovocito detenido en la profase de la meiosis I (McGee & Hsueh, 2000). Algunos de los principales factores implicados en dicha activación de folículos primordiales y el crecimiento de folículos preantrales son: El ligando de Kit (Hutt, *et al.*, 2006), el factor inhibidor de leucemia (Fitzgerald, *et al.*, 2001), miembros de la familia TGF- $\beta$ : como el factor de crecimiento de fibroblastos-9 (Lobo, 2007), la proteína morfogénica ósea 15 (Rimoin, *et al.*, 2007) y la proteína morfogénica ósea 4 (Bakrania, *et al.*, 2008), entre otros. Por otro lado, FOXO3 (Cui, *et al.*, 2019) y la hormona anti-Mülleriana (Umer, *et al.*, 2019) son los principales reguladores de la activación folicular primordial (Yang & Fortune, 2015) ya sea por vía paracrina o endocrina (Belli & Shimasaki, 2018).

### 2.1.4. Regulación del desarrollo de folículos antrales

En bovinos los folículos ováricos se desarrollan en un patrón de olas u ondas y se sabe que durante el ciclo estral de 21 días emergen de dos a tres ondas (Ireland, *et al.*, 2000). La primera onda folicular surge después de la ovulación, la segunda en los días 8 o 9 y la tercera al día 15 o 16 del ciclo estral (Gebremedhn, *et al.*, 2015). Cada ola de crecimiento del desarrollo de folículos antrales consta de tres etapas: Reclutamiento, selección y dominancia.

#### 2.1.4.1. Reclutamiento cíclico

El reclutamiento cíclico es el comienzo de una ola folicular el cual comienza con el crecimiento de una cohorte de folículos antrales en respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH) que se eleva de manera transitoria de 1 a 2 días (Rosales-Torres & Guzmán, 2012). Dicha cohorte de folículos está conformada por un grupo de 5-20 folículos antrales pequeños que son competentes para responder a FSH y en bovinos tienen un diámetro de 4-5 mm (Hernández-Coronado, 2012; McGee & Hsueh,

2000). La FSH estimula el crecimiento de esta corte de folículos y la síntesis de estrógenos en las células de la granulosa (Baird & McNeilly, 1981). Se ha reportado que las células de la granulosa de los folículos reclutados tienen una mayor expresión del ARNm que codifica el complejo P450scc (escisión de la cadena lateral) y el complejo P450arom (aromatasa) en comparación con los folículos no reclutados (Webb, *et al.*, 1999). Por otro lado, las células de la teca tienen en su membrana celular receptores para la hormona luteinizante (LH), a los cuales se une para favorecer la sobrevivencia y la síntesis de andrógenos, siendo estos esteroides los precursores de estrógenos que se producirán en las células de la granulosa (Ginther, *et al.*, 2001). Así que la capacidad de los folículos para responder a las gonadotropinas es importante para ser reclutados y continuar con el desarrollo folicular.

#### 2.1.4.2. Selección y dominancia

La etapa de selección ocurre 2.5 días después del inicio de la ola folicular (Girard, *et al.*, 2015). En esta fase se reduce el número de folículos de la cohorte creciente a la cantidad de folículos que ovulan (Ireland, *et al.*, 2000), por lo que en bovinos solo un folículo continúa con su crecimiento y se denomina folículo dominante (FD) (Mihm, *et al.*, 2002). El FD tiene un diámetro de 8.5 mm (Motta, *et al.*, 2011) y mayor capacidad de responder a los bajos niveles de FSH y al estímulo de LH (Rosales-Torres & Guzmán, 2011) ya que presenta mayor cantidad de estos receptores, por lo tanto, el FD es dependiente de la LH, presentando una mayor expresión del ARNm del receptor de LH (LHR) no sólo en la membrana de las células de la teca, sino ahora también en células de la granulosa (Flores-Pérez., *et al.*, 2005). Por lo que el cambio de dependencia de FSH a LH, es un “efecto protector” del desarrollo folicular, en consecuencia, a la disminución de FSH (Zelevnik, 2004). Otros factores también participan en la selección del FD, como es el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF; Fortune, *et al.*, 2004), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; Rosales Torres & Guzmán Sánchez, 2012). Así como de algunos miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , como son las inhibinas, activinas y proteínas morfogenéticas óseas (Webb, *et al.*, 2003).



El FD también presenta mayor expresión del ARNm de enzimas implicadas en la esteroidogénesis como la  $17\alpha$ -OH, P450<sub>scc</sub>  $3\beta$ -HSD y StAR en comparación de folículos reclutados (Fortune, *et al.*, 2001). La síntesis de estrógenos junto a la de inhibina por las células de la granulosa del FD, provocan la disminución en la secreción de FSH por debajo de la necesaria para el desarrollo de los folículos no seleccionados, induciendo la atresia de estos (Baird & McNeilly, 1981). Este proceso se denomina “etapa de dominancia” donde el FD continúa creciendo aproximadamente 1.6 mm por día (Sirois & Fortune, 1988). El crecimiento del FD continua hasta alcanzar la fase de meseta de crecimiento no exponencial, donde el crecimiento se reduce por la disminución mitótica de las células foliculares (Andrade, *et al.*, 2019), alcanzando un diámetro aproximado de 20 mm y un estadio de folículo preovulatorio (Evans, 2003).

El folículo preovulatorio sintetiza grandes cantidades de estradiol, las cuales están asociadas con la secreción preovulatoria de LH en respuesta a GnRH (Karsch, *et al.*, 1997; Caraty, *et al.*, 2002). Se sabe que estradiol reduce el tamaño del pulso de GnRH, pero aumenta la frecuencia del mismo (Evans *et al.*, 1994), regulando las señales de los estímulos que controlan la secreción de GnRH en el hipotálamo e incrementa la expresión de los receptores de GnRH en los gonadótropos (Looper, *et al.*, 2003). Por lo tanto, el estradiol controla el patrón de secreción y sensibilidad hipofisaria a GnRH, al aumentar la síntesis y la secreción de LH e inhibir la de FSH (Rosales-Torres & Guzmán, 2011). Una vez que el folículo ha alcanzado el estadio preovulatorio la progesterona determina su destino. En ausencia de la misma el folículo procederá a la ovulación en respuesta al pico preovulatorio de LH, mientras que altas concentraciones de progesterona impedirá la producción del pico preovulatorio de LH y el folículo dominante sufrirá atresia, dando lugar a una nueva oleada folicular (Espinoza-Villavicencio, *et al.*, 2007; Girard, *et al.*, 2015).

## 2.2. Gonadotropinas

La LH y la FSH son hormonas adenohipofisarias que poseen dos similitudes importantes. La primera se refiere a una similitud estructural ya que están conformadas por una subunidad  $\alpha$  la cual es compatible para la LH, la FSH y la TSH (Tirotropina) y una subunidad  $\beta$  que les confiere su acción biológica propia de cada hormona (Choi & Smitz, 2014). Mientras que la segunda, la LH y la FSH utilizan el mismo mecanismo de acción en su célula blanco a través de receptores acoplados a proteína G (Bousfield & Dias, 2011).

### 2.2.1. Estructura

La LH y la FSH son glucoproteínas adenohipofisarias heterodiméricas. La subunidad  $\alpha$  es transcrita por el gen localizado en el cromosoma 6q12-q12 en humanos que codifica una cadena de 92 aminoácidos (Choi & Smitz, 2014). Mientras que la subunidad  $\beta$  de la LH es transcrita de múltiples genes situados en una región de 45,165 pares de bases en el cromosoma 19q13.32, que tras la traducción origina una cadena de 112 a 114 aminoácidos (Guzmán, *et al.*, 2017). Ambas subunidades se encuentran unidas por 6 puentes disulfuro. La LH tiene un peso molecular de 29,400 daltons (Palermo, 2007) y posee en su estructura residuos de carbohidratos como la fructosa, manosa, galactosa, acetilglucosamina y N-acetylneuraminidasa, además de concentraciones elevadas de ácido siálico (Palermo, 2007), confiriéndole una vida media de 20 min aproximadamente. Por otro lado, la subunidad  $\beta$  de la FSH, es transcrita de un gen ubicado en el cromosoma 11p13 formado de 4262 pares de base (Guzmán, *et al.*, 2017), para dar lugar a 111 aminoácidos, por lo que, la FSH tiene un peso molecular aproximado de 35,000-45,000 daltons (Palermo, 2007).

### 2.2.2. Síntesis

La LH y la FSH son sintetizadas y secretadas en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH; Coss, 2018). El GnRH es un decapeptido producido por neuronas hipotalámicas localizadas en el área preóptica y secretado en un patrón

pulsátil (Pulsos de alta frecuencia con intervalos de 30 min estimulan la síntesis de la LH), al sistema porta hipofisiario ubicado en la eminencia media, para alcanzar a su célula blanco, los gonadótropos, presentes en la adenohipófisis (Whitlock, *et al.*, 2019). Los gonadótropos representan aproximadamente del 7 al 15% de las células presentes en la hipófisis anterior (Durán-Pastén & Fiordeliso, 2013) y expresan en su membrana celular los receptores para GnRH, los cuales son receptores acoplados a proteína Gαq, Gαs y Gα12/13 (Stamatiades, *et al.*, 2019). La unión de GnRH con su receptor Gαq principalmente, ocasiona un cambio conformacional del receptor que implica la activación de la fosfolipasa C, la cual tiene como función formar inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfadilinositol 4,5 bisfosfato, IP3 se une a la membrana del retículo endoplásmico y promueve la liberación de calcio, este aumento de calcio intracelular activa parcialmente a la proteína cinasa C (PKC), mientras que la acción de DAG la activa completamente (Janjic, *et al.*, 2017; Sperduti, *et al.*, 2019). La PKC por la vía principal, promueve la activación de factores de transcripción como la proteína de unión a elementos reguladores cAMP (CREB), la MAP quinasa (ERK) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT), los cuales se translocan al núcleo promoviendo la transcripción de las subunidades α y β de la LH y la FSH (Guzmán, *et al.*, 2017). Una vez transcritas a nivel nuclear y traducidas en el retículo endoplásmico, son transportadas al aparato de Golgi donde son modificadas postraduccionalmente y almacenadas en vesículas, para su secreción pulsátil en respuesta al ambiente hormonal (Durán-Pastén & Fiordeliso, 2013; Stamatiades & Kaiser, 2018).

### 2.2.3. Mecanismo de acción

La LH y la FSH viajan por vía endocrina para alcanzar a su célula blanco, en el caso de las hembras, la LH actúa en las células de la teca del folículo durante todo el desarrollo folicular y tras la etapa de selección en el FD, también en células de la granulosa (Hillier, 2001). Mientras que la célula diana de la FSH únicamente son las células de la granulosa (Ulloa-Aguirre, *et al.*, 2018). La LH y la FSH se unen a sus receptores específicos de membrana en su célula blanco. El receptor de LH (LHR) es un receptor acoplado a proteína Gαs, conformado por una cadena de 675 aminoácidos

(Choi & Smitz, 2014), divide por 3 dominios; un dominio extracelular que presenta sitios de glicosilación, siete dominios transmembrana conformados por siete hélices que le permiten su fijación en la membrana celular y un dominio intracelular que participa con el acoplamiento a la proteína G (García Sáinz, 2011). La proteína G que activa el receptor está formada por tres subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ , la subunidad  $G\alpha$  tiene afinidad por nucleótidos de guanina, que en estado inactivo GDP permanece asociada las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . La activación del receptor promueve la transición de GDP a GTP, ocasionando la disociación del heterotrímero y la activación de la subunidad  $G\alpha$ . (Romero-Castillo, *et al.*, 2015; Van Eps, *et al.*, 2018). Mientras que las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , pueden participar en vías alternas de señalización (García-Rico & Fierro, 2017). La subunidad  $G\alpha$ , activa la adenilato ciclasa (AC), una vez efectuada la vía de señalización de  $G\alpha$ , la acción de la guanosina trifosfatasa (GTPasa) permite volver a su estado inactivo a esta subunidad, asociándose con las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  nuevamente (McCudden, *et al.* 2005). La AC activa, induce la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), a partir de adenosín trifosfato (ATP). Tras el efecto de AC las concentraciones de AMPc se incrementan hasta 20 veces en relación a la concentración basal (Palermo, 2007; Alberts, *et al.* 2002). El incremento intracelular de AMPc permite su unión a las subunidades reguladoras de la proteína cinasa A (PKA), la cual es una holoenzima formada por dos unidades catalíticas y dos reguladoras. La unión del AMPc con las subunidades reguladoras provoca la activación de las subunidades catalíticas de PKA, la cual a su vez fosforila a otras proteínas efectoras (Turnham & Scott, 2016), tales como, proteínas esteroideogénicas, proteínas de la vía de fosfoinositol-3 quinasa (PI3K), PKB / Akt, o algunas de las proteínas de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK), entre otras, con el fin de regular la expresión génica y el metabolismo celular (Lizneva, *et al.*, 2019) (Figura 4). La FSH también sigue este mismo mecanismo de acción previamente descrito, en su célula diana a través de su receptor específico (FSHR) (Figura 5). Sin embargo, se sabe que la FSH puede actuar a través de receptores acoplados a proteína Gai y Gaq presentes en la membrana celular de las células de la granulosa (Ulloa-Aguirre, *et al.*, 2018).

## 2.2.4. Hormona luteinizante (LH)

### 2.2.4.1. Funciones

#### 2.2.4.2. Efecto sobre la sobrevivencia y proliferación celular

La LH promueve el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación de las células foliculares y células del cuerpo lúteo, mediante la activación de proteínas de las vías IP3K/AKT y MAPK/ERK (Noma, *et al.*, 2011). En células lúteas de bovino, la adición de LH a través de la vía dependiente de AMPc regula la expresión del ARNm de proteínas proapoptóticas como FAS, BAX y CASP3 (Okuda, *et al.*, 2009). Además, en ovocitos de rata sometidos a quimioterapia, la administración de la LH desencadena la vía AMPc/PKA y la activación de la AKT, reduciendo la expresión de la proteína proapoptótica TAp63 y favorecieron la reparación del ADN (Rossi, *et al.*, 2017). En células de la granulosa de rata, el aumento de LH, induce la salida del ciclo celular, elevando la expresión de inhibidores del ciclo celular (p27Kip1 y p21Cip), además de regular a la baja a la ciclina D2, para promover la luteinización (Robker & Richards, 1998). En otro estudio, la adición de LH promovió efectos antiapoptóticos a través de la activación de la PKA, en líneas celulares de cáncer epitelial de ovario humano inducidas a apoptosis por Fas (Slot, *et al.*, 2006). En células de la granulosa de humano, el tratamiento de LH promovió un aumento en la expresión de ERK 1 / 2 y AKT, además su acción antiapoptótica se potencializa en sinergia con FSH (Casarini, *et al.*, 2016). Finalmente, el uso de LH favorece el reinicio de la meiosis, disminuyendo las concentraciones de GMPc producido por las células de la granulosa (Egbert, *et al.* 2018).

#### 2.2.4.3. Efecto esteroideogénico

La LH en las células de la teca, mediante la señalización dada por PKA, fosforila y estimula la transcripción de los genes de las enzimas involucradas en la esteroideogénesis (Shoham *et al.*, 1993), como la proteína StAR (Gómez-Chang, *et al.*, 2012), el complejo enzimático P450scc (Wang, *et al.*, 2018), la 3 $\beta$ HDS y el complejo

P450c17 (Kakuta, *et al.*, 2018; Borráz-León, *et al.*, 2015). Mientras que, en folículos dominantes, la LH también activa a la enzima P450 aromatasa presente en células de la granulosa (Vásquez-Cano & Olivera, 2010). Para transformar el colesterol (27 C) a esteroides biológicamente activos, como la progesterona (21 C), la testosterona (19 C) y los estrógenos (18 C) (Kraemer, *et al.*, 2017).

En las células de la teca el colesterol se obtiene por síntesis de *novoo*, por reservas de ésteres de colesterol en gotas lipídicas o mediante la captación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) o lipoproteínas de baja densidad (LDL) del colesterol circulante proveniente de la dieta (Miller & Bose, 2011), el cual es la principal fuente de colesterol. La HDL y LDL unidas al colesterol entrarán a las células por endocitosis mediada por receptores específicos de HDL o LDL. Al atravesar la membrana celular, en el espacio intracelular las HDL o LDL son transportados a los lisosomas donde el colesterol es liberado mediante la acción de la lipasa de ácido lisosomal (LAL) (Miller & Bose, 2011; Guzmán, *et al.*, 2017).

Posteriormente el colesterol libre es transportado por la enzima StAR (Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda) a la membrana mitocondrial interna (Miller, 2008). En este organelo se localiza el citocromo P450scc (17  $\alpha$  hidrolasa y "20,22" desmolasa), cuya acción es la escisión de la cadena lateral del colesterol (Side-Chain Cleavage), transformándolo en pregnenolona (Miller & Auchus, 2011). El metabolismo de la pregnenolona en el ovario puede ocurrir por dos vías: la vía  $\Delta 4$  y la vía  $\Delta 5$ , en esta última la pregnenolona es transformada por el complejo P450c17 (Enzimas 17 $\alpha$ -hidroxilasa y 17,20-liasa) y la enzima  $\Delta 5$  esteroidea, en dehidroepiandrosterona, la cual mediante la acción de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), será transformada a androstenediona. La androstenediona formada se convierte en estrona por acción de la aromatasa y posteriormente a estradiol por acción de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Por la vía  $\Delta 4$  ocurre la transformación de pregnenolona a progesterona por la acción de 3 $\beta$ -HSD y la  $\Delta 4$ -5 isomerasa. La progesterona es transformada a androstenediona mediante la acción del complejo P450c17 y posteriormente a testosterona, que mediante la acción de la aromatasa

dará lugar a estradiol. Una vez sintetizados estos esteroides, son secretados por difusión simple debido a su bajo peso molecular y liposolubilidad. (Jamnongjit & Hammes, 2006; Strauss III, et al. 2014; Ventura-Arizmendi & Hernández-Valencia, 2019).

#### 2.2.4.3.1. Progesterona

La progesterona es el primer esteroide sexual formado a partir del colesterol, cuya estructura es de 21 carbonos. Debido a su naturaleza química es una molécula hidrofóbica de bajo peso molecular (Guzmán, *et al.*, 2017) (Figura 2).

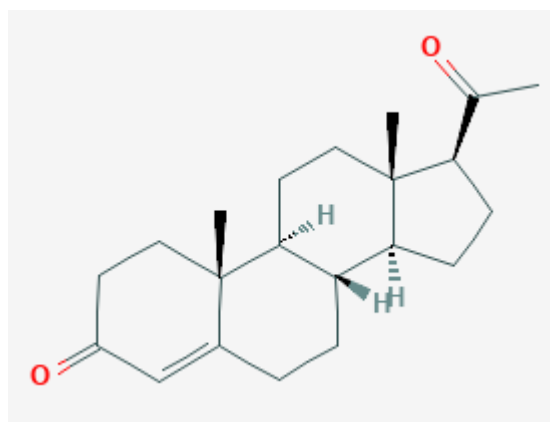


Figura 2. Estructura de una molécula de progesterona.  
(National Center for Biotechnology Information, 2021).

##### 2.2.4.3.1.1. Mecanismo de acción

La progesterona actúa a través de sus receptores de progesterona intracelulares (PR: PR-A y PR-B), los cuales derivan de un mismo gen (Conneely & Lydon, 2000), la isoforma A (94 kDa) tiene mayor relevancia en la fisiología de las estructuras anatómicas femeninas, mientras que la isoforma B (116 KDa) está involucrada en la

diferenciación del tejido mamario (Sitruk-Ware, 2018). Una tercera isoforma PR-C también ha sido reportada (60 KDa), sin embargo, su expresión ha sido relacionada en células de cáncer de mama. Estos receptores intracelulares están conformados por un dominio N-terminal, un dominio de unión al ADN, una región de bisagra y un dominio de unión al ligando (Diep, *et al.*, 2015). En ausencia de progesterona, estos receptores se encuentran asociados a proteínas de choque térmico (HSP), las cuales tienen como función favorecer el correcto plegamiento proteico y el ensamblaje de moléculas que favorecen la unión con progesterona. La unión de progesterona con su receptor provoca un cambio conformacional del mismo, la disociación de las HSP y, por ende, la activación del receptor, el cual puede actuar como factor de transcripción o estar relacionado con la asociación de moléculas que están involucradas en este proceso, como la ARN polimerasa II (Lange & Yee, 2008).

Progesterona también efectúa sus acciones a través de receptores de membrana acoplados a proteína G, los cuales intervienen en las acciones directas no genómicas, como la activación de la vía ERK 1/2 MAP cinasa, cuya acción está implicada en la activa fosforilación de diversos factores de transcripción (Diep, *et al.*, 2015). Aunque, las funciones en el tracto reproductivo femenino son principalmente mediadas por la señalización de receptores nucleares (Patel, *et al.*, 2015).

#### 2.2.4.3.1.2. Funciones

La progesterona participa en el comportamiento sexual femenino (Mani & Blaustein, 2012), durante el ciclo menstrual favorece el crecimiento y desarrollo de capilares, promoviendo una mejor vascularización y flujo sanguíneo (Cable & Grider, 2020), incrementa el engrosamiento de la mucosa del cuello uterino para establecer una barrera contra infecciones, aunado a la secreción de células inmunes como leucocitos (Chappell, *et al.*, 2014). Además, la progesterona favorece la implantación al estimular la síntesis de proteínas de adhesión celular, promueve la síntesis de leche uterina o histotrofo para el embrión temprano (Guzmán, *et al.*, 2017), induce los genes necesarios para la receptividad uterina, suprime las respuestas inflamatorias,



promueve la proliferación del endometrio y membranas celulares (Wu & DeMayo, 2017) y participa en el desarrollo de la glándula mamaria (Spencer, *et al.*, 2016). Además, al unirse con su receptor nuclear tipo B, disminuye la expresión de genes asociados a la contracción y por la vía de receptores de membrana, modula directamente las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y AMPc para mantener la relajación miometrial durante la gestación (Mesiano, 2007).

#### 2.2.4.3.2. Testosterona

La testosterona es el principal producto androgénico del ovario, es una hormona esteroide de la familia de los andrógenos, cuyo núcleo básico es el androstano derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno, compuesta por 19 átomos de carbono y grupos metilo en el carbono 10 y 13 y un grupo hidroxilo en el carbono 17 (Borráz-León, et al. 2015) (Figura 3).

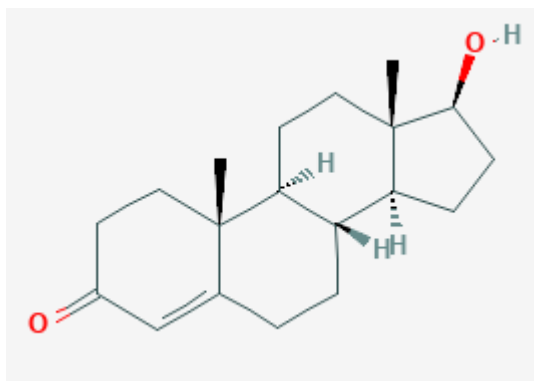


Figura 3. Estructura de una molécula de testosterona.  
(National Center for Biotechnology Information, 2021).

#### 2.2.4.3.2.1. Mecanismo de acción

La testosterona requiere de transportadores en sangre como la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), la albúmina y en menor afinidad a la globulina transportadora de corticosteroides (Jayasena, *et al.*, 2018). A la llegada a las células de la granulosa, la testosterona atraviesa libremente la membrana celular (Podlasek, *et al.* 2016), para unirse a su receptor androgénico citoplasmático (AR). Este receptor está asociado a proteínas de choque térmico que lo mantenían inactivado, en la unión de testosterona con su receptor, este último es activado y desencadena múltiples señalizaciones (Uribe, 2016) como la expresión de genes, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos-9 (GDF9), enzimas esteroidogénicas y receptores de FSH (Astapova, *et al.*, 2019).

#### 2.2.4.3.2.2. Funciones

La testosterona es biotransformada a estradiol o dihidrotestosterona. Además, participa en los efectos anabólicos de los músculos, la grasa corporal, el contenido mineral óseo, regulación de la libido y el comportamiento sexual en las hembras (Jayasena, *et al.* 2018).

En el ovocito la testosterona estimula su actividad metabólica y la maduración del mismo durante todo el desarrollo folicular (Walters, 2015). También promueve la transición de los folículos primarios a secundarios estimulando la proliferación de las células de la granulosa en las cuales se ha observado un incremento del ARNm de los receptores de andrógenos que coincide una reducción en la apoptosis (Weil, *et al.*, 1998). Asimismo, la testosterona, suprime los factores que inhiben la foliculogénesis (Vendola, *et al.*, 1999) y estimula una respuesta amplificada a FSH (Walters, *et al.*, 2010) al favorecer el incremento del ARN mensajero del receptor de FSH en folículos preovulatorios (Polyzos, *et al.*, 2018).

Sin embargo, aunque los andrógenos tienen múltiples beneficios durante el desarrollo, cuando la exposición a andrógenos es excesiva durante el periodo prenatal ocasiona

dos trastornos en relación con el ciclo estral, uno anovulatorio y el otro ovulatorio irregular con hiperandrogenismo y alteraciones morfológicas ováricas (Abruzzese, *et al.*, 2019). Mientras que en etapas postnatales una sobreproducción patológica de andrógenos por causa metabólica o endocrinológica ocasiona el Síndrome de ovario poliquístico, asociado principalmente a infertilidad (Sir, *et al.*, 2013).

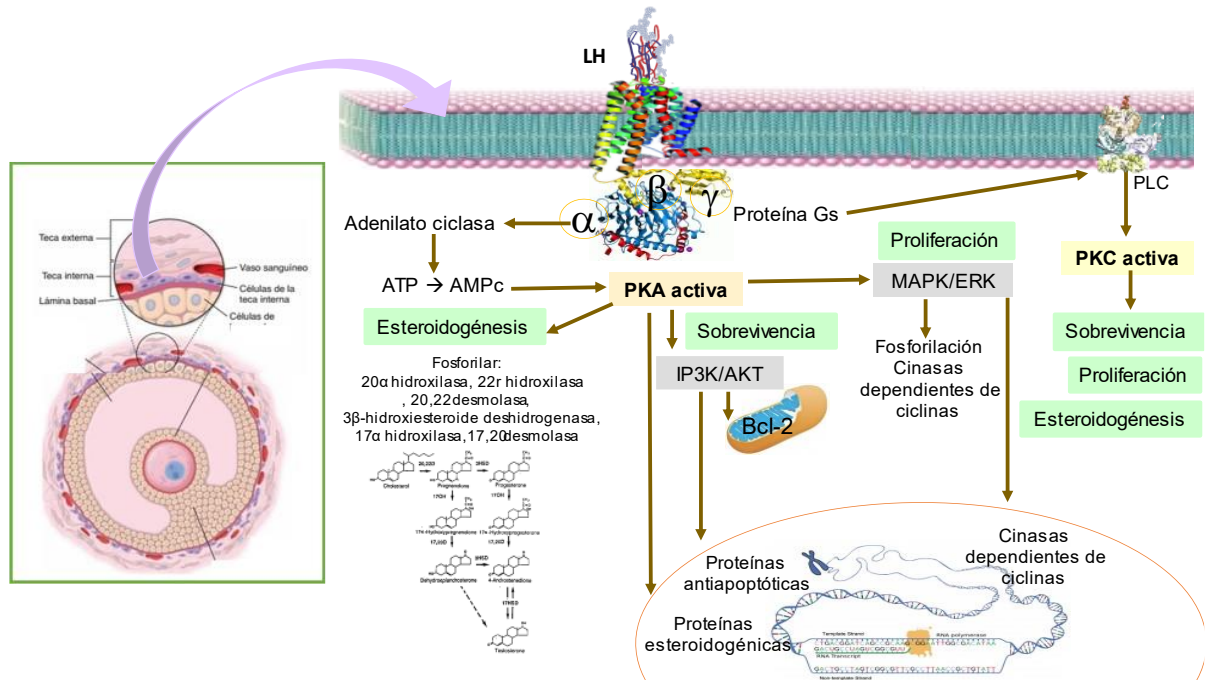


Figura 4. Mecanismo de acción de la LH (Vía clásica desencadenada por la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs y vía alternativa dada por las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ ) y principales efectos biológicos en las células de la teca\*.

## 2.2.5 Hormona folículo estimulante (FSH)

### 2.2.5.1. Funciones

#### 2.2.5.1.1. Efectos de sobrevivencia y proliferación celular

En células de la granulosa la vía PI3K/ Akt en respuesta a FSH, inhibe la expresión de forkhead (FOXO1) un factor que limita la proliferación e induce la apoptosis (Shen, *et al.*, 2014). Por la vía P13K / Akt/ FOxO3a, FSH tiene efectos antiapoptóticos al reducir la expresión de la proteína proapoptótica Bim, la cual se une con miembros de la familia Bcl-2, induciendo la liberación mitocondrial del citocromo C que a su vez activan las caspasas -9 y -3 (Wang, *et al.*, 2012). La FSH también interactúa con la proteína adaptadora APPL1 por la señalización P13K, participando en la regulación del metabolismo, la proliferación celular y la apoptosis (Dias, *et al.*, 2010). Además, FSH actúa en sinergia con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) presentando efectos anti apoptóticos en cultivo de células de la granulosa (Palmerini, *et al.*, 2016). La presencia de FSH inhibe la apoptosis neuronal inducida por isquemia al regular negativamente la expresión de Fas en la médula espinal (Chu, *et al.*, 2010). Además, la proteína CREB por estímulo de FSH participa en la fosforilación de la histona H3 a nivel nuclear, la cual favorece la actividad mitogénica celular (Casarini & Crepieux, 2019). Recientemente se ha dado a conocer que la FSH activa a la proteína SK1 y con ello induce la síntesis de la S1P y este esfingolípido media los efectos de viabilidad de las células de la granulosa en estímulo a FSH. Adicionalmente, la adición de este S1P (0.1 y 1  $\mu$ M) favorece la proliferación de las células de la granulosa (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016).

#### 2.2.5.1.2. Efectos esteroideogénico

La estimulación de FSH en células de la granulosa, favorece la transcripción y activación de enzimas esteroideogénicas como la enzima P450arom (gen CYP19) para la formación de estradiol (Dias, *et al.*, 2010). Además, la FSH también activa a la PKB/Akt, para incrementar la expresión de la enzima aromatasa, en un estudio

experimental la inhibición de PKB disminuyó la expresión del gen CYP19 (Dias, *et al.*, 2010). Por otro lado, FSH, al desencadenar vías como PI3K/AKT y MAPK/ERK, estimula la acción del IGF-1, el cual favorece la esteroidogénesis folicular y en sinergia con FSH, estimulando la producción de AKT la cual amplifica el estímulo de FSH en la producción de esteroides (Zhou, *et al.*, 2013).

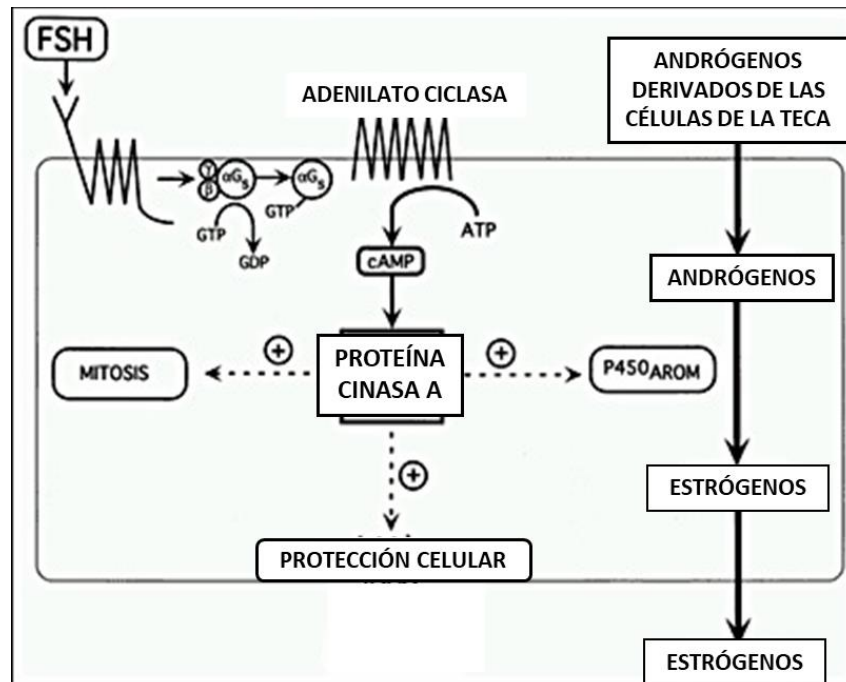


Figura 5. Mecanismo de acción de la FSH (Vía clásica) y principales efectos biológicos en las células de la granulosa (Modificado de Erickson, 1993).

Con lo anterior mencionado, podemos destacar que tanto la LH como la FSH estimulan la secreción de hormonas en sus células diana y participan como factor de crecimiento para dichas células, mediante la señalización dada a través de un receptor acoplado a proteína Gs. Por otro lado, existe evidencia reciente de un esfingolípido denominado esfingosina 1-Fosfato que ha sido implicado en funciones de proliferación, sobrevivencia y esteroidogénesis en algunos tipos celulares, como dichas gonadotropinas en las gónadas.

## 2.5. Esfingolípidos

Los esfingolípidos son moléculas anfipáticas, formados por un ácido graso de 2-28 carbonos en unión amida y una base larga esfingoidea (esfingosina 4-E-2-amino-1,3-dihidroxi-octadeceno) (Sterin-Speziale, 2007). La membrana celular está compuesta por glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. Durante muchas décadas la membrana celular fue considerada una mezcla de lípidos y proteínas con función estructural, sin embargo, este conocimiento cambió tras la investigación de las balsas lipídicas y su participación en la transducción de señales (Munro, 2003), aunado a la descripción de los esfingolípidos como moléculas bioactivas (Kleuser, 2018). La ceramida y esfingosina están implicados en procesos fisiológicos como la muerte celular incluyendo la apoptosis, autofagia, detención de crecimiento, entre otras. Mientras que la esfingosina 1-fosfato (S1P) está involucrada en la regulación de diversos procesos como la proliferación, diferenciación (Kitatani, *et al.*, 2008), crecimiento, adhesión celular, metabolismo, supervivencia, migración celular, angiogénesis, esteroidogénesis (Guo, *et al.*, 2014), mecanismos de respuesta al estrés, inflamación, entre otros (Gebai, *et al.*, 2018).

### 2.3.1. Esfingosina 1 Fosfato (S1P)

#### 2.3.1.1. Estructura

La S1P es un esfingolípidos pleiotrópico también conocido como sphing-4-enine-1-phosphate, D-eritro-esfingosina-1-fosfato o C18-esfingosina 1-fosfato, está conformada por una base esfingoidea unida a un grupo fosfato en posición 1 (Agudo, 2010), tiene un peso molecular de 379,5 g/mol (National Center for Biotechnology Information, 2020) y está presente en concentraciones nanomolares en la circulación sanguínea con una vida media aproximada de 15 min (Pitson, 2011).

### 2.3.1.2. Síntesis

La ceramida es considerada el esfingolípido central en la síntesis de esfingolípidos. La ceramida está compuesta por una base de esfingosina y un ácido graso que varía en longitud de 14 a 26 carbonos (Ponnusamy, *et al.*, 2010). Este esfingolípido es sintetizado por dos vías, síntesis de *novo* o por descomposición de un esfingolípido más complejo, la esfingomielina. La síntesis de *novo* es a partir de serina y palmitato, los cuales por acción de la serina palmitoiltransferasa se unen para generar 3-ceto-dihidrosfingosina, la cual se convierte secuencialmente en dihidrosfingosina por acción de la 3-ceto-dihidrosfingosina reductasa. Posteriormente por la acción de dihidroceramida sintasa se forma dihidroceramida y en ceramida por la dihidroceramida desaturasa (Obinata & Hla, 2012). La dihidroceramida desaturasa inserta el doble enlace 4,5-trans en la esfingosina (Michel, *et al.*, 1997) formando así ceramida. La otra vía de síntesis de ceramida es a través de la descomposición de esfingomielina que es el esfingolípido presente en mayor proporción en la membrana celular (Cooper, 2000). La esfingomielina es endocitada al lisosoma y mediante la acción de las esfingomielinasas en respuesta a estímulos estresantes (Clarke, *et al.*, 2006) forma ceramida. Posteriormente la ceramida por la acción de la ceramidasa ácida puede desacilarse para formar esfingosina (Hait & Maiti, 2017).

La esfingosina es un aminoalcohol con cadena alquílica insaturada de 18 carbonos y es la columna vertebral de todos los esfingolípidos (Bartke & Hannun, 2009). Tiene una carga positiva ionizable que le permite abandonar el lisosoma y dirigirse hacia el retículo endoplásmico donde puede reciclarse (Lewis, *et al.*, 2018) o ser fosforilada en su 1-OH por la esfingosina cinasa 1 y 2 (SK1 y Sk2) para formar S1P. La SK1 se encuentra principalmente en el citosol mientras que SK2 en el núcleo, retículo endoplásmico y membranas intracelulares (Spiegel & Milstien, 2007), además, SK1 y SK2 presentan una homología estructural en cinco dominios, pero difieren en el dominio amino terminal y en la región central (Maceyka, *et al.*, 2005), por lo tanto, tienen diferentes distribuciones tisulares, propiedades cinéticas y patrones de expresión desiguales, llevando a cabo funciones celulares distintas (Guo, *et al.*, 2014).

Como ya se mencionó, la SK1 es un mediador lipídico pro-supervivencia (Zheng, *et al.*, 2015) y es activada por diversos factores de crecimiento (Shu, *et al.*, 2002) y hormonas, como FSH (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016). La activación de la PKC y la fosfolipasa D (PLD) en respuesta a factores de crecimiento y hormonas, causa la formación de ácido fosfatídico, promueve la consecuente activación de esta SK1 (Hannun & Obeid, 2018). Por otro lado, la vía de las proteínas cinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2 (ERK1/2) y la cinasa 2 dependiente de ciclina, fosforilan el residuo de serina 225 de SK1, mejorando su actividad catalítica y ocasionando su translocación del citosol a la membrana celular, donde se encuentra esfingosina para fosforilarse y dar origen a S1P (Maceyka, *et al.*, 2012; Hait, *et al.*, 2006). La permanencia de SK1 en la membrana es dependiente de las interacciones con la fosfatidilserina o el ácido fosfatídico y la acción de proteína fosfatasa 2 (PP2A) que es la encargada de la desfosforilación del residuo serina 225 de SK1 (Pitson, 2011).

Dentro de la célula, una vez sintetizada la S1P puede desfosforilarse por la acción de la fosfatasa de S1P (SPP) para producir esfingosina nuevamente o degradarse por la liasa de S1P (S1PL). La S1PL dará lugar a hexadecanal y etanolamina-1-fosfato saliendo del metabolismo de los esfingolípidos (Figura 6). La S1P que se encuentra en el espacio extracelular es degradada por la fosfohidrolasa de fosfato lipídico (LPP) presente en la membrana celular (Książek, *et al.*, 2015).



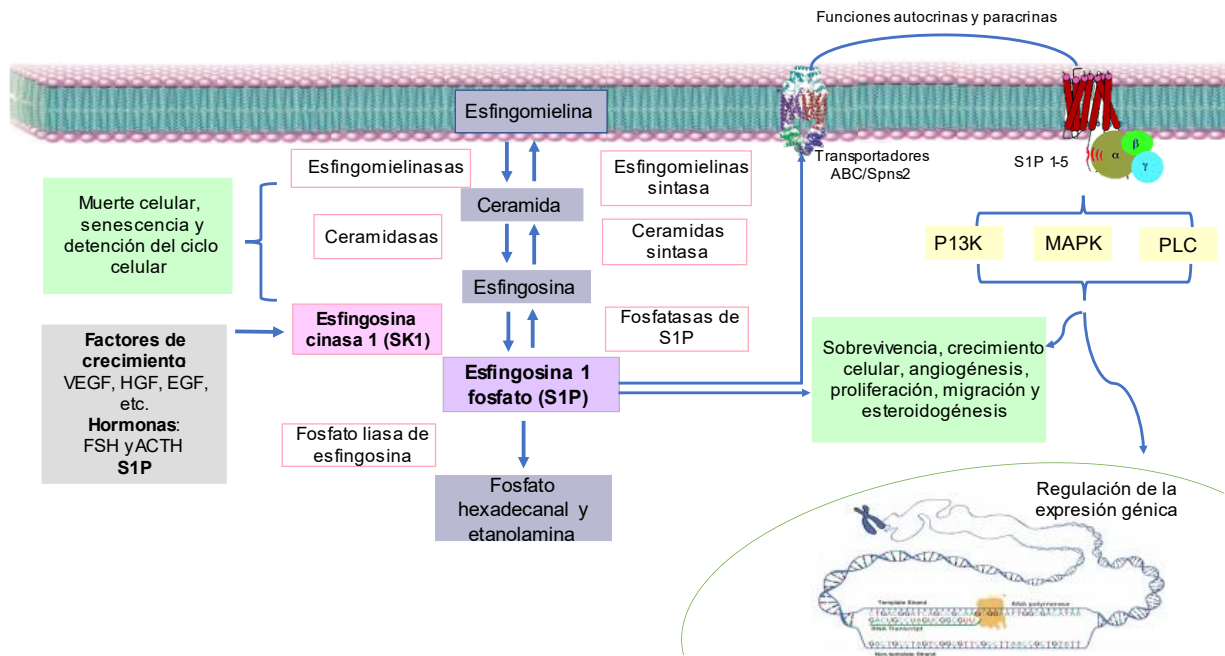


Figura 6. Metabolismo y funciones celulares de los principales esfingolípidos bioactivos.

### 2.3.1.3. Mecanismo de acción y vía de señalización

La S1P lleva a cabo sus funciones como mediador extracelular y como molécula de señalización, teniendo una vía de comunicación paracrina y autocrina (Bazúa-Valenti & García-Sainz, 2012). Como mediador extracelular la S1P atraviesa la membrana celular y sale hacia el espacio extracelular y actúa uniéndose a alguno de sus receptores de membrana acoplados a proteína G, mediante un proceso denominado “señalización de adentro hacia afuera” (Guo, *et al.*, 2014). O bien, S1P puede actuar como molécula señalizadora de manera intracelular, aunque sus funciones como mediador extracelular han sido mayormente descritas (Hla, 2003).

#### 2.3.1.3.1. Intracelular

De manera intracelular, la S1P participa como cofactor de la actividad de la ubiquitina ligasa E3 sobre el receptor 2 asociado al factor TRAF (TRAF2) requerido en la poliubiquitinación de R1P1 y como consecuencia de esto, se da la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, implicado en procesos antiapoptóticos (Álvarez, *et al.*, 2010). Adicionalmente la S1P participa en la activación de canales de calcio y en consecuencia en la liberación y movilización de calcio intracelular (Birchwood, *et al.*, 2001), de manera independiente a la vía de IP3K (Meyer zu Heringdorf, *et al.*, 2003).

La formación de S1P mediante la isoenzima SK2 en el núcleo se encuentra asociado a la regulación de la histona H3, promoviendo la inhibición de las desacetilasas HDAC1 y HDAC2. Además, la S1P participa en la codificación de la cinasa dependiente de ciclina p21 y del factor transcripcional c-fos (Hait, *et al.*, 2009). De igual manera mediante la acción de SK2, S1P se une a la prohibitina 2 presente en la mitocondria, esta unión es importante para el correcto ensamblaje y función del complejo IV respiratorio en la cadena de transporte de electrones (Strub, *et al.*, 2011). También, SK2 está asociada a respuestas inmunitarias, a través de la vía de interleucina-2 en las células T (Samy, *et al.*, 2007).

#### 2.3.1.3.2. Extracelular

La S1P es sintetizada intracelularmente y transportada hacia el exterior por transportadores ABC y el transportador homólogo 2 spinster (Spn2) (Mendelson, *et al.*, 2014). Fuera de la célula la S1P se une a transportadores como albúmina y el ApoM, sin embargo, se desconoce cómo estos transportadores entregan a la S1P en sus receptores de membrana (Blaho & Hla, 2014). La S1P se encuentra en una concentración de 0.2 a 0.9  $\mu$ M en el plasma, asociada con la albúmina y lipoproteínas (Takabe, 2008), mientras que la reserva de S1P en el torrente sanguíneo se encuentra en las plaquetas ya que estas células presentan una deficiencia de enzimas para la degradación de S1P (Spiegel & Milstien, 2011).

La S1P se une a uno de sus 5 receptores acoplados a proteína G (S1PR1-5) (Bryan & Del Poeta, 2018), la expresión de estos receptores y su interacción con las proteínas G heterodiméricas es diferente entre células y tejidos, mostrando así su efecto pleiotrópico (Ebenezer, *et al.*, 2016).

El S1PR1 se acopla a la proteína G $\alpha$ i (Hla, *et al.*, 2000) desencadenando vías como la P13K, MAP quinasa, Rho, Rac, Akt, mTOR y la movilización de calcio intracelular (Okamoto, *et al.*, 1998; Hla, *et al.*, 2000). Además, S1PR1 forma un complejo con  $\beta$ -arrestina, la cual recluta c-Src, produciendo su internalización para regular moléculas efectoras como ERK 1/2 (Pyne & Pyne, 2017). Estas vías de señalización mencionadas promueven diversos efectos biológicos como la angiogénesis, proliferación, migración, diferenciación y de supervivencia celular (Liu, *et al.*, 2019).

El S1PR2 tiene la capacidad de acoplarse a G $\alpha$ i, G $\alpha$ q y G $\alpha$ 12 / 13 (Mendelson, *et al.*, 2014) por lo que promueve diferentes vías de señalización dependiendo del tipo celular y estímulo. Se ha reportado la activación de diversas moléculas como Rho, la fosfolipasa C (PLC) y las cinasas N-terminales C-Jun (JNKs) (Yester, *et al.*, 2011). Una de las funciones más reconocida del S1PR2 es oponerse a la actividad de S1PR1 (G $\alpha$ i), al inhibir Rac y Akt (Bryan & Del Poeta, 2018), teniendo efectos como la represión de la migración celular (Green & Cyster, 2012) y la inhibición de la proliferación celular (Goparaju, *et al.*, 2005; Bryan & Del Poeta, 2018).

El S1PR3 se acopla principalmente a G $\alpha$ i, G $\alpha$ q y en menor afinidad a G $\alpha$ 12 / 13, promoviendo la activación de ERK, PLC, Rac y Rho (Yester, *et al.*, 2011) y en consecuencia estimula efectos de migración, proliferación y supervivencia celular (Shen, *et al.*, 2019).

Por último, al contrario de S1PR1-S1PR3 que presentan de manera ubicua, S1PR4 y S1PR5 presentan expresión específica para algunos tejidos. El S1PR4 se expresa en tejido linfoide, hematopoyético y de pulmón (Gräler, *et al.*, 1998), mientras que S1PR5 se encuentra expresado en células asesinas (Natural killer; Drouillard, *et al.*, 2018), células dendríticas, del sistema nervioso, endoteliales y algunos tipos de células

cancerosas (Olesch, *et al.*, 2017). El S1PR4 y S1PR5 son receptores acoplados a proteínas G $\alpha$  i y G $\alpha$  12/13, que promueven efectos como la migración (Sic, *et al.*, 2014), el crecimiento (Van Brocklyn, *et al.*, 2000) y la diferenciación celular (Schulze, *et al.*, 2011), entre otras (Olesch, *et al.*, 2017).

#### 2.3.1.4. Funciones de S1P

##### 2.3.1.4.1. S1P y la sobrevivencia celular

La S1P inhibe la apoptosis a través de la supresión de la activación de las caspasas 3, 6 y 7 y sus sustratos (Cuvillier, *et al.*, 1998), al inhibir la translocación de la proteína Smac (Second mitochondria-derived activator of caspases) o DIABLO (direct IAP-binding protein with low) de la mitocondria al citosol (Cuvillier & Levade, 2001). Además, S1P participa en la regulación de la función de Bad mediante la vía MEK / ERK/RsK1 que propicia que las proteínas Bcl-2 o Bcl-xl ejecuten efectos inhibitorios para Bax y en consecuencia la inhibición de la apoptosis (Betito & Cuvillier, 2006). Además, la S1P mejora en el potencial de desarrollo del ovocito, además de promover la proliferación y supervivencia a través de la activación de la PLD, PI3K/T en células ováricas (Guo, *et al.*, 2014). Finalmente, en células endoteliales sometidas a apoptosis mediante el tratamiento con peróxido de hidrógeno, se demostró que S1P atenúa la apoptosis al disminuir la fosforilación de p38 Map quinasa (Moriue, *et al.*, 2008).

##### 2.3.1.4.2. S1P y la esteroidogénesis

La hormona adrenocorticotropa (ACTH) estimula el metabolismo de los esfingolípidos disminuyendo la concentración de lípidos que favorecen la muerte celular y aumentando los que favorecen la protección celular como la S1P (Lucki, *et al.*, 2012). Actualmente, se conoce que S1P mediante la unión a sus receptores acoplados a la proteína G $\alpha$ i, promueve la activación de la PKC, PLD y la liberación de calcio, estimulando la secreción de cortisol en las células de la zona fasciculada (Rábano, *et al.*, 2003) y de aldosterona en las células de la zona glomerular de la corteza suprarrenal (Brizuela, *et al.*, 2006) mediante las vías P13K/PKB y MEK (Brizuela, *et*

*al.*, 2007). Además, se ha observado que S1P es un mediador en la señalización para la transcripción de CYP17 estimulada por ACTH/AMPC mediante la activación del elemento regulador de esteroides (SREP) (Ozbay, *et al.*, 2006). Finalmente, la S1P promueve al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que induce la producción de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y éste a su vez la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) (Pettus, *et al.*, 2003). Por su parte, la PGE2 induce la expresión de CYP19 en respuesta a S1P, promoviendo la síntesis de estrógenos en células de la granulosa (Lucki, & Sewer, 2008).

#### 2.3.1.4.3. S1P en el desarrollo folicular

Recientemente se ha demostrado que la S1P promueve la proliferación y la sobrevivencia celular para estimular el desarrollo folicular (Hernández-Coronado, *et al.*, 2019). Se conoce que la S1P está presente en mayor concentración en células de la granulosa y células de la teca de folículos dominantes sanos en comparación a folículos dominantes atrésicos (Hernández-Coronado, *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que la FSH y el VEGF estimulan la síntesis de S1P en células de la granulosa en cultivo a través de la activación de SK1. Este efecto de FSH y la propia S1P incrementan la proliferación de células de la granulosa (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016). Además, S1P promueve la angiogénesis folicular, incrementando la densidad de los vasos sanguíneos recién creados y estimula la proliferación de células del estroma ovárico a través de la señalización del S1PR1 (Soleimani, *et al.*, 2011). En un estudio *in vitro* el tratamiento de S1P en ovocitos sometidos a choque térmico, induce la protección celular y promueve el desarrollo a blastocistos (Roth & Hansen, 2004). En estudios de mujeres con hiperestimulación ovárica se detectó la presencia de S1P asociado con lipoproteínas de alta densidad en líquido folicular (FF-HDLs) y que está S1P era importante para el desarrollo folicular ya que promueve la proliferación y la angiogénesis del folículo (von Otte, *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha descrito el papel de S1P como agente citoprotector en la terapia contra el cáncer y la criopreservación (Hernández-Coronado, *et al.*, 2019). En mujeres

con cáncer la criopreservación ovárica les ha permitido la posibilidad de reproducirse a pesar de la insuficiencia ovárica prematura ocasionada por el tratamiento contra el cáncer. En un estudio de cultivo de ovarios de oveja post criopreservados se demostró que S1P mejora la calidad de folículos primordiales y tras dos días de cultivo estimula la proliferación de las células de la granulosa (Henry, *et al.*, 2016). Además, el uso de S1P a una concentración de 400  $\mu$ M en folículos primordiales de tejido cortical ovárico sometido a criopreservación, mostró un incremento en la síntesis de estradiol y la hormona anti-Mülleriana y una reducción de la apoptosis (Guzel, *et al.*, 2018). Otro estudio en ratones hembra demostró que la administración de S1P antes de la aplicación de busulfan, incrementa el número de folículos primordiales sanos y la concentración del ARNm de la hormona anti-Mülleriana, respecto a ratones que se les administró únicamente busulfan (Tan, *et al.*, 2014). Además, se ha reportado que S1P estimula la migración de células del cáncer epitelial de ovario, a las cuales en los bordes celulares induce estructuras similares a filopodios que favorecen la movilidad celular (Wang, *et al.*, 2008). Finalmente, S1P a través de S1PR1 y S1PR3 favorece la expresión de CCN1 y CCN2, CCN2 que participan en la expresión de COX-2 y ésta a su vez la síntesis de PGE2, implicada en numerosos procesos como la ovulación (Cheng, *et al.*, 2016). Por último, la administración de 12  $\mu$ M de S1P, mostró un incremento en la expresión del ARNm de Ccn2/CCN2 dependiente de la señalización Hippo a través de S1PR2 en folículos preantrales y tejido ovárico de ratones y humanos (Pors, *et al.*, 2020).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de folículos antrales depende principalmente de la proliferación de las células foliculares y es promovido por la acción de hormonas y factores tróficos dentro de los cuales destacan la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Por otro lado, esfingosina 1-fosfato (S1P) es un esfingolípido que favorece la proliferación, sobrevivencia celular y es sintetizado principalmente en respuesta a factores de crecimiento a través de la activación de la esfingosina cinasa 1 (SK1) principalmente. Se ha observado que la concentración de S1P está asociada con la salud folicular y que ésta promueve la proliferación de células de la granulosa y la síntesis de esteroides en células adrenales. Sabemos que la FSH estimula en células de la granulosa la síntesis de S1P a través de la activación de SK1 y que este esfingolípido está relacionado con proliferación y protección en estas células. Por lo anterior, es probable que, si la LH actúa sobre células de la teca del folículo, comparte similitudes en su estructura química con FSH y que también ejerce sus efectos a través de receptores acoplados a proteína Gs, igualmente promueva la síntesis de S1P y que este esfingolípido actúe como mediador de los efectos biológicos de LH.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

- ❖ Establecer la participación de LH en la síntesis de S1P en células de la teca de bovino y demostrar si este esfingolípido es un mediador en los efectos biológicos de la hormona.

### **4.2. Objetivos específicos**

- ❖ Determinar si la LH estimula la síntesis de S1P en células de la teca de bovino.
- ❖ Evaluar si S1P es un mediador de los efectos esteroideogénicos de LH sobre células de la teca de bovino.
- ❖ Determinar si los efectos de viabilidad de LH sobre células de la teca ocurren a través de la síntesis de S1P.

## **5. HIPÓTESIS**

- ❖ Los efectos biológicos de la hormona luteinizante (LH) sobre las células de la teca de bovino, son dependientes de la síntesis de la esfingosina-1 fosfato (S1P).



## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Diseño experimental

Se obtuvieron ovarios de vacas sacrificadas en rastro para recuperar folículos de 4-15 mm de diámetro. Los folículos fueron diseccionados para obtener sacos foliculares y mediante digestión enzimática recolectar y cultivar células de la teca para evaluar si la S1P es una molécula mediadora de los efectos biológicos de la LH en células de la teca de folículos ováricos de bovino (Figura 7).

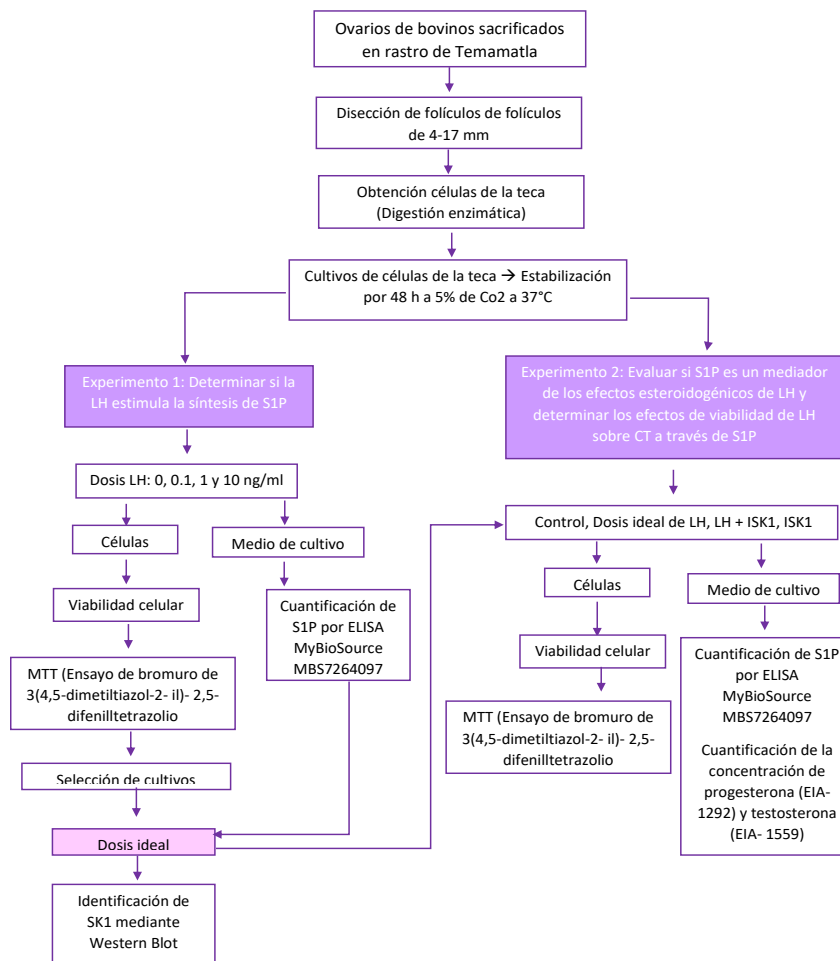


Figura 7. Diseño experimental. LH: Hormona luteinizante. S1P: Esfingosina 1-fosfato. SK1: Esfingosina Cinasa 1. ISK1: Inhibidor de la esfingosina cinasa 1.

## 6.2. Colección de folículos y obtención de sacos foliculares

Se obtuvieron ovarios de vacas sacrificadas de un rastro particular ubicado en Temamatla, Estado de México. Los ovarios fueron lavados y transportados al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco en solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% a una temperatura de 35-37°C en un lapso no mayor a 120 min. Una vez en el laboratorio, se procedió a quitar el exceso de tejido, se realizaron varios lavados con SSF al 0.9% a 37°C, un lavado con etanol al 75% y posteriormente más lavados con SSF, esto con la finalidad de quitar el exceso de sangre y contaminantes. Posteriormente los ovarios se mantuvieron a 37°C en SSF y medio de cultivo (10:1), hasta su disección.

Se disecaron folículos de 4-15 mm de diámetro, se realizó una incisión en el folículo para poder liberar el líquido folicular, el ovocito y exponer el saco en su interior para retirar las células de la granulosa a través de un ligero raspado. Posteriormente, se lavaron los sacos foliculares con medio McCoy's 5a modificado (Hepes SIGMA H6147, L-Glutamina Sigma G8540, Albúmina sérica bovina Sigma A7030, Selenito 20 ng/mL, Penicilina y estreptomicina Sigma P4333, Transferrina 10 mg/mL, Insulina 100 µg/mL, IGF-1 1ng/mL) previamente gaseado con el propósito de eliminar en su totalidad los restos de células de la granulosa y el líquido folicular.

Con ayuda de unas tijeras curvas se procedió a cortar los sacos en fragmentos más pequeños y se depositaron en medio McCoy's 5a modificado. Posteriormente los fragmentos se filtraron (filtro de Nylon de 70 µm), para obtener únicamente las trazas de los sacos foliculares y someterlos a digestión enzimática.

### **6.3. Obtención de células de la teca**

#### **6.3.1. Digestión enzimática (disgregación de sacos foliculares)**

Los fragmentos de sacos foliculares se colocaron en un buffer de digestión enzimática (100 mg de tejido/ 1 mL de digestión enzimática) el cual contenía 1.13 mg/mL de Colagenasa (Sigma C2674), 0.1 mg/mL de DNAsa (Sigma DN25) en DPBS 1x (Gibco 14200-075). Se colocó la suspensión de células en una estufa a 37°C en agitación constante durante 20 minutos. La digestión se detuvo con la adición de suero fetal bovino (Sigma F2442) 100 µl/mL de suspensión y se incubó durante 10 minutos a 37°C en agitación constante. Se filtró la suspensión (Filtros Falcón de nylon de 70 µm) para obtener únicamente las células, descartando el tejido no digerido y se procedió a centrifugar a 1,700 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 2.5 mL de DPBS 1x a cada pool para eliminar los glóbulos rojos y se centrifugaron nuevamente por 10 min a 1700 rpm. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células de la teca en un mililitro de medio gaseado y se realizó la cuantificación celular usando azul de tripán (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016).

#### **6.3.2. Número de células de la teca por azul de tripán (4%)**

El número de células de la teca fue evaluado tomando 90 µL de la suspensión celular y 10 µL de solución azul Tripán (4%). Esta mezcla fue colocada en una cámara de Neubauer doble para realizar el conteo de las 2 cámaras en 5 cuadrantes de cada una. El número de células totales fue obtenido usando la siguiente fórmula: promedio del número de células totales contadas en las 2 cámaras X 10,000 X 5 (Número de cuadrantes) X la dilución (mL) (Hernández-Coronado *et al.*, 2016), determinando así el número de células viables.

#### **6.4. Cultivo de células de la teca**

Las células se cultivaron en placas de 96 pozos con tapa (Thermo scientific, NUNC estéril, 167008) en medio de cultivo McCoy's 5a modificado (Hepes SIGMA H6147, L-Glutamina Sigma G8540, Albúmina sérica bovina Sigma A7030, Selenito 20 ng/mL, Penicilina y estreptomina Sigma P4333, Transferrina 10 mg/mL, Insulina 100 µg/mL, IGF-1 1ng/mL). Previo al sembrado de células, las placas se pre incubaron con 150 µl de medio de cultivo por pozo, durante cuatro horas. Se sembraron setenta y cinco mil células de la teca viables en 50 µL de medio y se mantuvieron en un periodo de estabilización de 48 horas en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y 90% humedad.

#### **6.5. EXPERIMENTO 1**

##### **6.5.1. Efecto de LH sobre la síntesis de S1P.**

Para evaluar el efecto de LH sobre la síntesis de S1P en células de la teca, se realizaron cinco cultivos con 6 réplicas cada uno (Figura 8) a los cuales se les trató con 0, 0.1, 1 y 10 ng/mL de LH (Sigma L5269-1VL St Louis USA). El periodo de tratamiento fue de 96 h, realizando recambio de medio de cultivo y tratamiento con la LH cada 48 horas. Se determinó la viabilidad de células de la teca por la técnica de MTT. Mientras que el medio de cultivo se almacenó a -70°C.

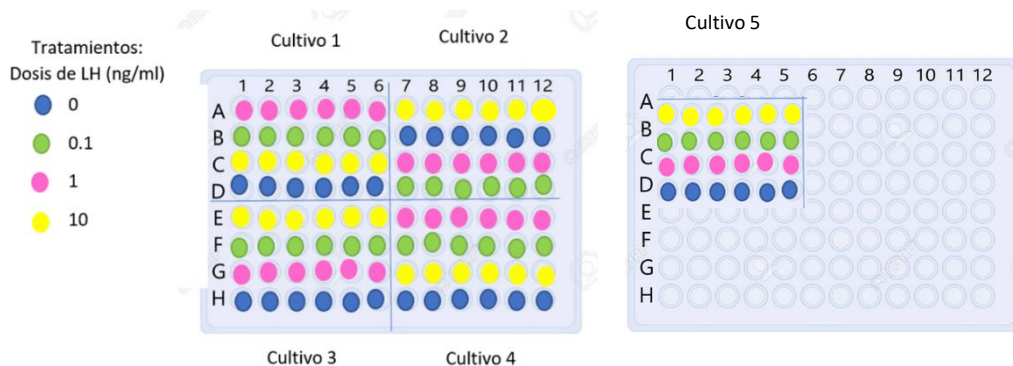


Figura 8. Cinco cultivos de células de la teca, la figura representa los tratamientos (0, 0.1, 1 y 10 ng/mL de LH) y las repeticiones de cada uno de ellos.

#### 6.5.1.1 Determinación del número de células de la teca por MTT

Para determinar el efecto de las dosis de LH en la viabilidad celular, las células de la teca de los cultivos del experimento 6.5.1, fueron sometieron al ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolio (MTT).

#### 6.5.1.2. Determinación de S1P en medio de cultivo de células de la teca

La determinación de S1P se realizó en el medio almacenado de los cultivos del experimento 6.5.1, mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), usando el estuche comercial (MyBioSource MBS7264097). Se empleó una curva estándar para su cuantificación (0, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng/mL) y las determinaciones se realizaron por duplicado.

### **6.5.1.3. Identificación de esfingosina cinasa 1 (SK1) en células de la teca mediante Western Blot.**

Se identificó la presencia de la enzima SK1 fosforilada en tres cultivos de células de la teca tratadas con 0.1 ng/mL de LH. Las células cultivadas fueron sometidas a lisis con ayuda de un buffer que contenía NaCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, glicerol al 10%, tritón X-100, cóctel inhibidor de proteasas (0,20 mM de aprotinina, 5,25 mM de leupeptina y 1,8 mM de pepstatina A) y 1 mM de ortovanadato de sodio como inhibidor de la fosfatasa y homogenizado mecánico, para extraer las proteínas. Se utilizó 45 µg de proteínas por tratamiento, las cuales fueron sometidas a electroforesis en SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa usando un buffer de transferencia (Tris-Base 0,05 M: Bio-rad 161-0719; glicina 0,04 M: Bio-rad 1610718, SDS 0,001 M: Bio-rad 161-0301 y metanol al 20%) a 120 volts durante una hora a 4°C. Tras la transferencia, las membranas fueron incubadas por 24 h a 4°C con el bloqueador de fosfoproteínas Phosphoprotein Blocker (Millipore WBAVDP001) y se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios contra Sphingosine Kinase 1 (Ser-225: phospho-specific 1:250, Bioscience SP1641-ECM) y GAPDH como control de carga (1:500 Santa Cruz Biotechnology sc-59540). Posteriormente las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween-20 0.5% y se incubaron con los anticuerpos secundarios Anti-Rabbit (1:10,000 Bio-rad 1706515) y Anti-Mouse (1:10,000 Bio-rad 1706516), para SK1 y GAPDH respectivamente, durante toda la noche a 4°C en PBS-Tween 20 (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016). Finalmente, las membranas se lavaron nuevamente en PBS-Tween 20 y las señales se detectaron con el uso de WesternSure® PREMIUM Chemiluminescent Substrate (926-95000 LI-COR), en el equipo C-DIGIT BLOT SCANNER.

## **6.6 EXPERIMENTO 2**

### **6.6.1. La síntesis de S1P en respuesta a LH es un mediador de los efectos de esta hormona en células de la teca.**

Para determinar si S1P es mediador de los efectos biológicos de LH, se utilizó un inhibidor de SK1 en 3 y 2 cultivos de células de la teca con 6 tratamientos (4 réplicas por tratamiento): Control, 0.1 ng/mL de LH (Sigma L5269-1VL St Louis USA), 5  $\mu$ M de un inhibidor de la enzima SK1 (ISK1) (SKI-178, Calbiochem; 567732), 10  $\mu$ M de ISK1, 0.1 ng/mL de LH + 5  $\mu$ M de ISK1 y 0.1 ng/mL de LH + 10  $\mu$ M de ISK1. Después de 96 horas de cultivo, se colectó el medio de cultivo de los 4 pozos correspondientes al mismo tratamiento. Tanto el medio como las células de la teca fueron almacenadas a -70°C.

#### **6.6.1.1. Determinación de viabilidad de células de la teca en respuesta a S1P como mediador de LH por MTT.**

Para determinar el efecto del inhibidor de SK1 en la viabilidad, las células de la teca cultivadas en 3 cultivos en el experimento 6.6.1, se sometieron al ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Se adicionaron 20  $\mu$ L de la solución MTT (5 mg/mL de Tetrazolio-Sigma M5655, en medio de cultivo) a las células cultivadas de cada pozo y se incubaron en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y 90% humedad durante 24 h. Pasadas las 24 h se adicionó a cada pozo 100  $\mu$ L de buffer de lisis el cual contenía H<sub>2</sub>O destilada, N-Dimetilformamida (D4551-sigma), SDS (161-0301-Biorad), ácido acético 1 N (9507-02- J. T. Baker) y ácido clorhídrico 1 N y las células de la teca se incubaron por 4 h a

temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se midió la densidad óptica del medio a 595 nm en un espectrofotómetro Smartec Plus-BIORAD (Rangel, *et al.*, 2009).

El número de células fue obtenido mediante una curva estándar (Figura 9), la cual se construyó por duplicado mediante 6 diluciones (1:2) sembrando 150,000, 75,000, 37,500, 18,750, 9,375 y 4,687 células por pozo en placas de 96 pozos con tapa (Thermo scientific, NUNC estéril, 167008). Se mantuvieron por un periodo de 144 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y 90% humedad, con recambios del 50% de medio cada 48 horas. Posterior a las 144 horas se determinó la viabilidad celular por el ensayo MTT.

Posterior a la incubación con el MTT, se lisaron las células a temperatura ambiente y finalmente se obtuvo la densidad óptica a 595 nm. A través de una ecuación de regresión se determinó la relación entre absorbancia y el número de células, con el programa 1x Assay Zap 3.0.

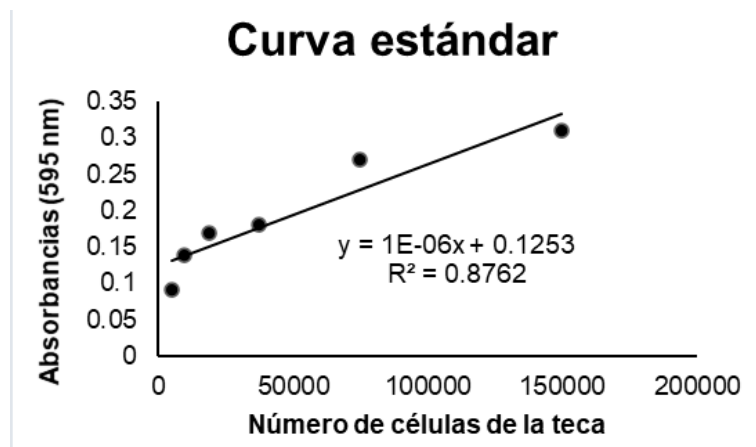


Figura 9. Curva estándar de células de la teca viables. La curva estándar muestra 6 puntos (150,000 células el valor más alto y 4,687 células en el valor más bajo) con valor de R=0.8762: Dicha curva permitió la intercepción de los datos procedentes de los diferentes tratamientos para obtener el número de células de la teca viables.



#### **6.6.1.2. Determinación de los efectos esteroideogénicos de células de la teca en respuesta a S1P como mediador de LH por ELISA.**

Para determinar la participación de S1P en la esteroideogénesis de células de la teca, se cuantificó progesterona y testosterona en el medio de cultivo recolectado y almacenado previamente de 2 cultivos del experimento 6.6.1, por la prueba de ELISA usando los estuches comerciales DRG progesterona (EIA-1292) y DRG testosterona (EIA-1559), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **6.7. Análisis estadístico**

El efecto de LH, y el inhibidor de SK1 (SK-178) sobre la producción de S1P, la concentración de hormonas esteroides y viabilidad celular, se evaluará mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando las concentraciones de LH y SK-178 como efectos fijos y las concentraciones de S1P, progesterona, testosterona y número de células como variables de respuesta. Las diferencias entre media de cada tratamiento se determinaron mediante contrastes ortogonales.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. La LH incrementa la viabilidad de células de la teca de bovino en cultivo.

Los resultados indican que la viabilidad de células de la teca en cultivo por 96 h, es mayor con la adición de 0.1 y 1 ng/mL de LH. Mientras que con el uso de una dosis mayor de LH (10 ng/mL) hubo una reducción en el número de células de la teca viables ( $P < 0.05$ ) en comparación con 0.1 y 1 ng/mL, pero similar a las células a las que no se adiciona LH (Figura 10).

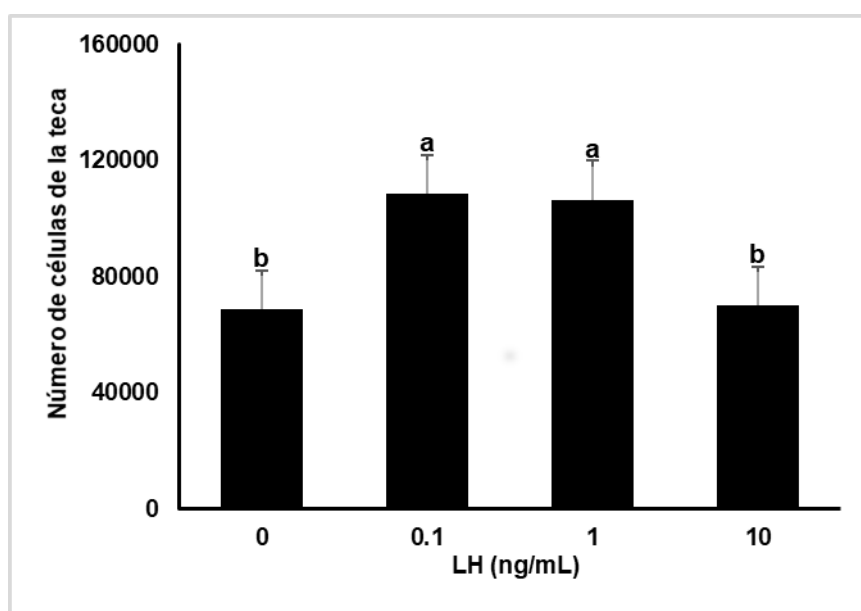


Figura 10. Efecto de diferentes dosis de la hormona luteinizante (LH) sobre el número de células de la teca viables después de 96 h de cultivo. a y b indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

## 7.2. La LH estimula la síntesis de S1P en células de la teca

La adición de 0.1 ng/mL de LH al medio de cultivo de células de la teca de bovino, incrementa la síntesis de S1P (Figura 11) en comparación con el control (0 ng/mL de LH). Sin embargo, dosis mayores a 0.1 ng/mL de LH (1 ng/mL y 10 ng/mL) no incrementan la síntesis de S1P respecto al control ( $P < 0.05$ ).

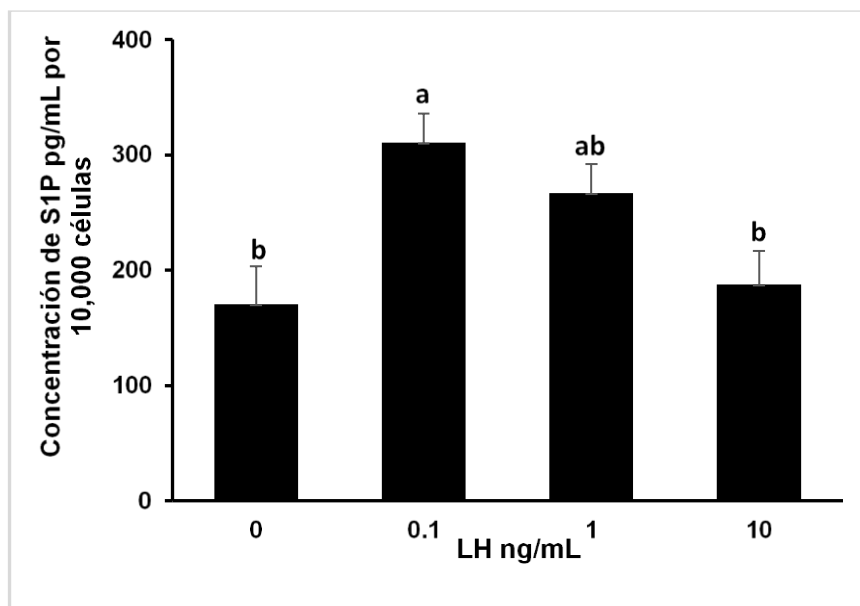


Figura 11. Concentración de S1P en el medio de cultivo de células de la teca cultivadas por 96 h, y tratadas con cuatro dosis de LH (0, 0.1, 1 y 10 ng/mL). a y b indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

### 7.3 Identificación de la enzima esfingosina cinasa 1 fosforilada (SK1p) en células de la teca de bovino.

En células de la teca tratadas con 0.1 ng/mL de LH en cultivo se identificó por primera vez la presencia de la esfingosina cinasa 1 fosforilada (SK1p; Figura 12). Sin embargo, aun cuando es probable que está sea activada por LH, se necesitan más experimentos para demostrarlo.

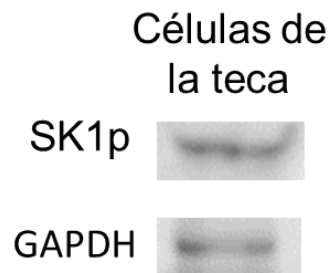


Figura 12. Presencia de esfingosina cinasa 1 fosforilada (SK1p) y GAPDH, en células de la teca de bovino tras 96 h de cultivo.

#### 7.4. La síntesis de S1P en respuesta LH es un mediador de los efectos de esta hormona en células de la teca de bovino.

Estos resultados muestran claramente que dosis bajas de LH (0.1 y 1 ng/mL) incrementan la viabilidad de las células de la teca en cultivo durante 96 h. Además, el uso de 0.1 ng/mL de LH incrementa la síntesis de S1P en estas células., razón por la cual, seleccionamos esta dosis de LH para evaluar y los efectos biológicos sobre la viabilidad celular (Figura 13) y esteroidogénesis (Figura 14 y 15) dependen del efecto de LH sobre la síntesis de S1P. Para ello, se usó un inhibidor de SK1 en presencia o ausencia de LH. Los resultados indican que el tratamiento de 0.1 ng/mL de LH estimula la viabilidad de las células de la teca en comparación con las células sin tratamiento (Figura 13). De manera interesante, la adición de dos diferentes concentraciones del inhibidor de SK1 (5 y 10  $\mu$ M) en presencia de LH disminuye la viabilidad a nivel similar a la del grupo control (Figura 13). Esto indica que S1P tiene un papel directo en la viabilidad de células de la teca, al actuar como mediador de LH en la viabilidad de células de la teca de bovino cultivadas durante 96 h.

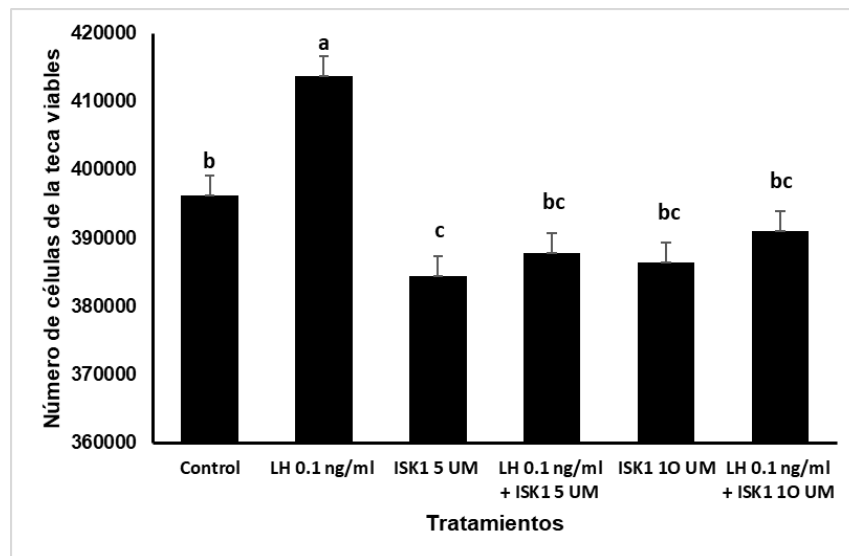


Figura 13. Efecto del inhibidor de SK1 en presencia o no de 0.1 ng/mL de LH, sobre la viabilidad de las células de la teca de bovino en cultivo por 96 h. a, b y c indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

En cuanto a los efectos esteroideogénicos de LH en células de la teca, se observó que el tratamiento con LH por sí solo tiende a incrementar la síntesis de progesterona ( $P=0.09$ ). Mientras que el uso del inhibidor de SK1 en las dos diferentes concentraciones y en presencia o ausencia de LH redujo marcadamente la síntesis de progesterona en células de la teca de bovino a las 96 h de cultivo ( $P<0.05$ ) (Figura 14).

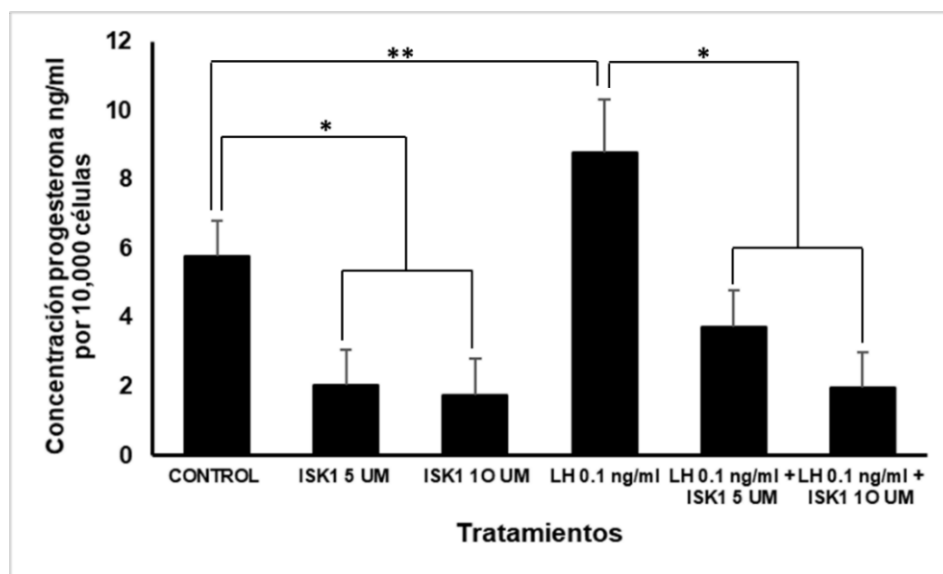


Figura 14. Efecto del inhibidor de SK1 en presencia o no de 0.1 ng/mL de LH, sobre la síntesis de progesterona de las células de la teca de bovino en cultivo de 96 h.

(\*  $P<0.05$  y \*\*  $P<0.1$ ).

En cuanto a la síntesis de testosterona, el tratamiento de LH no modificó la síntesis de este esteroide respecto al control ( $P=0.41$ ). Sin embargo, contrario a lo esperado, el uso exclusivo del inhibidor de SK1 incrementó la síntesis de testosterona respecto al control ( $P<0.05$ ). Mientras que el uso del inhibidor de SK1 más la dosis de LH, no mostró efectos sobre la síntesis de testosterona respecto al tratamiento de LH por sí solo ( $P<0.9$ ) (Figura 15).

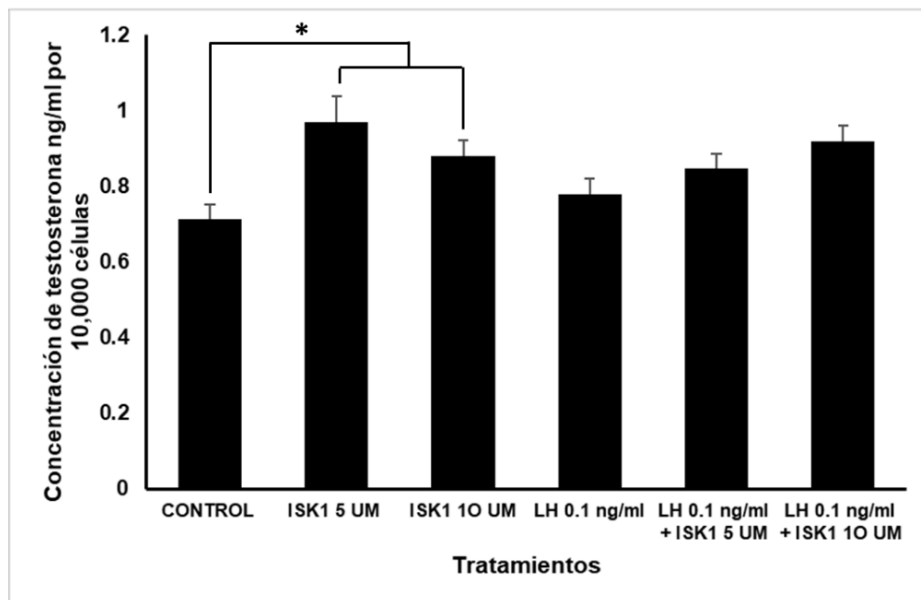


Figura 15. Efecto del inhibidor de SK1 en presencia o no de 0.1 ng/mL de LH, sobre la síntesis de testosterona de las células de la teca de bovino en cultivo de 96 h. (\*  $P<0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que la administración de LH en cultivo de células de la teca de bovino, incrementa la síntesis de S1P y promueve la viabilidad, así como la síntesis de progesterona. Por otro lado, se demostró que S1P es mediador de los efectos de LH sobre la viabilidad de las células de la teca y síntesis de progesterona, ya que la inhibición de SK1, enzima clave para la síntesis de S1P, reduce el número de células de la teca metabólicamente activas y la síntesis de progesterona.

En este trabajo demostramos que el uso de dosis bajas de LH (0.1 y 1 ng/mL) incrementan la viabilidad de las células de la teca. Estos resultados son similares a los reportados por Campbell y colaboradores en 1988, quienes señalan que la dosis de 0.1 ng/mL de LH promueve la viabilidad y proliferación de células de la teca de ovino en cultivo. Asimismo, en células de la teca de bovino la adición de 0.1 ng/mL de LH al medio de cultivo favorece la viabilidad celular (Rodríguez, *et al.*, 2003). En células lúteas de bovino ha sido reportado que el uso de 10 ng/mL de LH aumenta la viabilidad de estas células, al inducir la expresión de enzimas antioxidantes (Kawaguchi, *et al.*, 2013). Mientras que el uso de LH en cocultivo de células de la granulosa y células de teca, incrementa la expresión del IGF-1 por parte de las células de la teca. El IGF-I vía paracrina actúa en las células de la granulosa, evitando la apoptosis inducida por ceramidas (Hattori, *et al.*, 2018). En otros estudios, la LH al actuar sobre su receptor en las células de teca promueve varias vías de proliferación y sobrevivencia celular (Hillier, 2001). En células lúteas de bovino, tratadas con interferón gamma (IFNG) y con él TNF $\alpha$ , la LH (0.34 nM), reduce la apoptosis. Este efecto se llevó a cabo debido a que la LH, atenúa la expresión de FAS, BAX y CASP3 (moléculas apoptóticas), pero incrementa la expresión del ARNm de Bcl-2, así como la síntesis de progesterona (Okuda, *et al.*, 2009). En cultivo de células de la teca de bovino el uso de 100 ng/mL de LH activa la vía P13K estimulando la fosforilación de AKT (Fukuda, *et al.*, 2009), Akt puede fosforilar a Bad generando un sitio de unión para las proteínas secuestradoras de Bad que impiden su translocación del citosol a la membrana mitocondrial (García & Vecino, 2003). Además, la LH es mediador de la sobrevivencia



dependiente de IGF-1 (Franke, *et al.*, 1997). Por lo tanto, basados en estos resultados y las evidencias de la literatura, es probable que la LH en dosis de 0.1 ng/mL active las vías AMPc y IP3K/AKT para promover la viabilidad de las células de la teca, explicando nuestros resultados.

En nuestros resultados, la dosis de 0.1 y 1 ng/mL de LH, favorece la viabilidad celular, en contraste con la dosis de 10 ng/mL que disminuye la viabilidad de células de la teca de bovino. De manera similar, en cultivo de células de la teca de ovino tratadas con dosis altas de LH (100 ng/mL), reducen la viabilidad celular (Campbell, *et al.*, 1988). Adicionalmente, en células de la teca de bovino, la viabilidad disminuye con la adición de 10 ng/mL de LH tras 168 h de cultivo (Rodríguez, *et al.*, 2003). Este efecto es desencadenado probablemente porque la sobreestimulación con LH sobre la célula de la teca, ocasionan una regulación a la baja de receptores de LH vía endocitosis (Jameson & De Groot, 2010) o por degradación acelerada el ARNm del LHR (Menon, *et al.*, 2011). Por otro lado, se conoce que una dosis elevada de LH aumenta la producción de progesterona favoreciendo cambios funcionales y morfológicos en las células foliculares que causan su luteinización (Campbell, *et al.*, 1998). Además, se sabe que las células de la teca secretan factores proapoptóticos como el regulador Nodal, que promueve la apoptosis tanto de la teca como de las células de la granulosa mediante la supresión de la vía PI3K/AKT (Craig, *et al.*, 2007). Por lo tanto, es probable que, en nuestro experimento, la dosis de 10 ng/mL de LH a través de estos procesos, reduzca la viabilidad de las células de la teca de bovino en cultivo.

En este trabajo se demostró que la dosis más baja de LH (0.1 ng/mL) estimula la síntesis de S1P en células de la teca de bovino en cultivo. En células de la teca de folículos dominantes sanos de bovino (aquellos que dependen de LH para su crecimiento), la concentración de S1P es mayor que en células de la teca de folículos dominantes atrésicos (Hernández-Coronado, *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que la FSH (1ng/mL) y el VEGF (0.01 ng/mL) incrementan la síntesis de S1P en células de la granulosa de bovino en cultivo (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016). De manera similar en otros tipos celulares varios factores de crecimiento y

hormonas estimulan la síntesis de S1P. En células endoteliales de la vena umbilical humana, el uso de 100 U/mL del TNF $\alpha$  o el uso de 50 ng/mL del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) estimulan la síntesis de S1P, mediante la activación de la SKasa (Xia, *et al.*, 1998; Duan, *et al.*, 2004). Además, en células de cáncer de mama MCF-7 en cultivo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF; 100 ng/mL), favorece la activación de la SK1, incrementando la síntesis de S1P (Sarkar, *et al.*, 2005). Finalmente, se ha demostrado que estradiol (E2; 10 nM) activa a SK1 y con ello, favorece la síntesis de S1P en células de cáncer de mama humanas (Sukocheva, *et al.*, 2003). Se sabe que LH al igual que la FSH, actúan a través de un receptor acoplado a proteína Gs el cual activa a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) (Guzmán, *et al.* 2017). Además, se ha demostrado que la LH pueden activar a la fosfolipasa C y con ello promover la activación de la PKC (Menon & Menon, 2014) la cual es el principal activador de SK1 (Hannun & Obeid, 2018). Adicionalmente la LH (1 UI/mL) en células de la teca de bovino en cultivo, controla la fosforilación de ERK (Tajima, *et al.*, 2005) la cual puede fosforilar a SK1 en su residuo de serina 225, promoviendo su actividad catalítica (Maceyka, *et al.*, 2012). En este trabajo se logró identificar por primera vez la presencia de SK1p en células de la teca de bovino en cultivo. Por lo tanto, podemos sugerir que LH mediante su vía de señalización clásica (PKA) o alterna (PKC), puede promover la fosforilación de la SK1 y con ello incrementar la síntesis de S1P para llevar a cabo sus efectos biológicos. No obstante, si bien detectamos a la SK1 fosforilada en los cultivos de células de la teca, es necesario que se siga investigando para demostrar que esta enzima es fosforilada en respuesta dosis dependiente a LH.

Si bien el tratamiento a los cultivos de células de la teca con 0.1 ng/mL de LH incrementa la síntesis de S1P, el uso de 10 ng/mL de LH, disminuye la producción de este esfingolípido. De manera similar, la adición de 10 ng/mL de FSH en el medio de células de la granulosa cultivadas por 96 h, reduce la producción de S1P (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016). Además, la adición de 0.1-100 ng/mL de VEGF en células de la granulosa de bovino en cultivo de 48 h, también reducen la síntesis de S1P (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016). Por lo tanto, con base en nuestros resultados y

las evidencias previas podemos decir que una sobreestimulación de las células por factores tróficos reduce la síntesis de S1P. Los niveles de S1P son regulados mediante su síntesis, su desfosforilación y su degradación. Por lo tanto, después de que la S1P es sintetizada y ejerce sus efectos biológicos, este esfingolípido puede ser desfosforilada por la fosfatasa de S1P (SPP) para transformarse en esfingosina (D'Avanzo, 2016), o puede degradarse en el interior de la célula por la liasa de S1P (S1PL) o fuera de la célula por la fosfohidrolasa de fosfato lipídico (LPP) para dar lugar a un hexadecanal y etanolamina (Maceyka, *et al.*, 2012; Książek, *et al.*, 2015). Por lo tanto, podemos sugerir que por la vía de la desfosforilación o degradación se reduce la concentración de S1P en células de la teca de bovino estimuladas con dosis altas de LH.

De manera interesante la inhibición de SK1 ocasionó una disminución en la viabilidad de las células de la teca de bovino cultivadas por 96 h estimuladas con LH (0.1 ng/mL). Similarmente, en células de la granulosa de bovino en cultivo, la inhibición de SK1 redujo el número de células de la granulosa metabólicamente activas (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016). En células de cáncer de mama MCF-7, la inhibición de SK1, por el estímulo del EGF (100 ng/mL) también redujo la progresión de las fases S y G2/M del ciclo celular (Sarkar, *et al.*, 2005). De manera similar, la inhibición de SK1 reduce notablemente la expresión de ERK y NF- $\kappa$ B en células endoteliales de la vena umbilical humana estimuladas con TNF $\alpha$  (100 U/mL) (Xia, *et al.*, 1998). Mientras que la adición de S1P (5000 nM) al medio de cultivo de preadipocitos 3T3-L1 de ratón, estimula la viabilidad celular (46%) tras 24 h de tratamiento (Wu, *et al.*, 2020). A nivel ovárico dosis bajas de S1P (0.1 y 1  $\mu$ M) favorecen la proliferación de células de la granulosa de bovino (Hernández-Coronado, *et al.*, 2016) y, la adición de S1P (1 y 10 mM) en presencia de peróxido de hidrógeno a los cultivos de células de la granulosa luteinizadas de humano reducen la apoptosis (Nakahara, *et al.*, 2012). *In vivo* en ratones sometidos a quimioterapia, la aplicación intraovárica de S1P (2.0 mM) induce la protección de folículos primordiales (Hancke, *et al.*, 2007). Por lo tanto, basados en estas evidencias y en nuestros resultados, podemos deducir que la síntesis de S1P

estimulada por LH es necesaria para promover la proliferación o viabilidad de las células de la teca de bovino en cultivo.

La S1P es un esfingolípido que se une a sus receptores de membrana o funciona como segundo mensajero para llevar a cabo sus efectos biológicos (Bazúa-Valenti & García-Sainz, 2012). En otras evidencias, durante la regresión del cuerpo lúteo de rata, la administración intraovárica de S1P suprime la actividad de las caspasas -2, -3 y -8 vía su receptor de membrana activando a la AKT (Hernández, *et al.*, 2009). En células LAMA84-s tratadas con quimioterapia, la sobreproducción de S1P inhibe la liberación del citocromo c y Smac de la mitocondria y con ello inhibe la activación de la caspasa 3, debido a un incremento en la expresión de Bcl-xL y Mcl-1 (Bonhoure, *et al.*, 2008). En células HEK293, S1P actúa como cofactor de la ubiquitina ligasa E3 sobre el receptor 2 asociado al factor de TNF (TRAF2) y en consecuencia la poliubiquitinación de la proteína cinasa R1P1, la cual favorece la activación de NF-Kb (Álvarez, *et al.*, 2010). Asimismo, S1P promueve la inhibición de las desacetilasas HDAC1 y HDAC2, regulando la transcripción génica de la cinasa dependiente de ciclina p21 y del factor transcripcional c-fos en células MCF-7 (Hait, *et al.*, 2009). Por lo tanto, es probable que la S1P sintetizada por las células de la teca en respuesta a LH, actúa intracelularmente o vía alguno de sus receptores, para promover la proliferación y sobrevivencia de estas células.

En este estudio se evaluó la participación de S1P en la esteroidogénesis. Se demostró que la adición de 0.1ng/mL de LH tiende a incrementar la síntesis de progesterona en células de la teca. En otros estudios, la estimulación de células de la teca de ovino con LH de 1 a 10 ng/mL, incrementa la concentración de progesterona tras 144 h de cultivo (Campbell, *et al.*, 1988). Asimismo, la producción de progesterona en células de la teca de rata se incrementa al ser tratadas con 50 ng/mL de LH (Li, *et al.*, 2000). Finalmente, en células de la teca de bovino, la síntesis de progesterona también se incrementa en respuesta a dosis de 1 y 10 ng/mL de LH a las 168 h de cultivo (Rodríguez, *et al.*, 2003). Basados en estas evidencias parece que la síntesis de progesterona se incrementa con relación al tiempo de incubación y a la concentración de LH adicionada

al medio de cultivo (Tajima, *et al.*, 2007). Por lo tanto, los resultados que nosotros obtuvimos de la tendencia de LH a incrementar la concentración de progesterona pueden ser explicados porque se usó una dosis de 0.1 ng/mL de LH durante 96 h de cultivo.

Se conoce que LH a través de la vía de señalización dada por un receptor acoplado a proteína Gs, favorece la expresión de enzimas esteroideogénicas como la proteína StAR, el complejo P450<sub>scc</sub> y la enzima 3 $\beta$ HSD para promover la síntesis de progesterona en células de la teca (Hugues, 2012). También se sabe que la LH puede apagar la transcripción de los genes del complejo P450<sub>c17</sub> y la P450<sub>arom</sub>, favoreciendo la diferenciación de las células foliculares cuando se luteinizan (Chaffin, *et al.*, 2000). Por lo tanto, es probable que aumentando el número de cultivos podamos confirmar que el estímulo de LH (0.1 ng/mL) favorece la síntesis de progesterona en células de la teca de bovino en cultivo.

La inhibición de SK1 y por lo tanto la reducción de la síntesis de S1P, disminuyó la concentración de progesterona en el medio de cultivo en presencia o ausencia de LH. Estos resultados sugieren que la síntesis de S1P en respuesta a la LH, así como la S1P sintetizada basalmente por las células de la teca es indispensable para la síntesis de progesterona. La S1P ha mostrado regular la esteroideogénesis en varios tipos celulares y en condiciones fisiológicas y patológicas como se sustentó arriba. A nivel de la glándula adrenal, la administración exógena de S1P estimula las vías PI3K/PKB y MERK/ERK promoviendo la síntesis de aldosterona en células glomerulares de bovino (Brizuela, *et al.*, 2007). Asimismo, S1P estimula la síntesis de cortisol en células fasciculares de bovino, mediante la activación de PKC y la PLD (Rábano, *et al.*, 2003). Además, en células de la granulosa S1P media la síntesis de PGE<sub>2</sub>, que a su vez induce la expresión de CYP19 y con ello la producción de estrógenos (Lucki, & Sewer, 2008). Mientras que en cáncer de mama la S1P induce la expresión del receptor hepático homólogo 1 (LRH-1) para promover la expresión de CYP19 y, por ende, la síntesis de estrógenos desmedida característica de este tipo de cáncer (Lucki & Sewer, 2010).

El mecanismo por el cual la S1P regula la esteroidogénesis ha sido explicado principalmente en células adrenales, pero no en células foliculares. En células adrenocorticales humanas la S1P activa la escisión de la proteína de unión del SREBP y este a su vez promueve la expresión de StAR y CYP17 (Ozbay, *et al.*, 2006). Asimismo, la adición de 1  $\mu$ M de S1P en medio de cultivo de células adrenocorticales, promueve la disponibilidad de colesterol y su metabolismo al favorecer la expresión del ARNm de los receptores de las lipoproteínas de baja (LDLR) y alta densidad (SR-BI), de la proteína translocadora (TSPO) y de la proteína StAR, (Lucki, *et al.*, 2012). De esa manera es probable que la síntesis basal de S1P o la estimulada por LH en células de la teca de bovino promueve la activación de las enzimas esteroidogénicas involucradas en la síntesis de progesterona, sin embargo, se requieren más estudios para confirmarlo.

El uso de 0.1 ng/mL de LH, no presentó efectos en la síntesis de testosterona, respecto a células no tratadas. Este resultado difiere con lo reportado por otros, en células de la teca de ovino donde se usó de 0.1 ng/mL de LH para estimular la producción de testosterona tras 48 h de cultivo (Campbell, *et al.*, 1988). En células de la teca de bovino la adición de 0.1 ng/mL de LH también incrementa la producción de testosterona tras 168 h de cultivo (Rodríguez, *et al.*, 2003). Finalmente, se ha reportado que la adición de 100 ng/mL de LH en cultivo de células de la teca de bovino, estimula la producción de andrógenos vía P13K/AKT (Fakuda, *et al.*, 2009). Las diferencias entre nuestros resultados y las evidencias de otros autores pueden estar asociadas a la dosis de LH usada y al tiempo de cultivo de nuestro estudio.

En el presente trabajo propusimos que S1P participa como mediador de LH en la síntesis de testosterona en células de la teca de bovino. Sin embargo, no encontramos efecto de LH sobre la síntesis de testosterona. Además, el uso exclusivo del inhibidor de SK1 incrementó la síntesis de testosterona en comparación con el grupo control. Este resultado sugiere que, bajo nuestras condiciones experimentales, la S1P puede estar bloqueando la transcripción del complejo enzimático P450c17 para incrementar la síntesis de progesterona, evitando su transformación a testosterona. Sin embargo,

no hay evidencias que sustenten esta hipótesis, por lo que es necesario continuar con esta investigación.

## **9. CONCLUSIONES**

Con base en nuestros resultados podemos concluir que;

- 1) La adición de 0.1 ng/mL de LH estimula la viabilidad de las células de la teca.
- 2) La LH incrementa la síntesis de S1P en células de la teca.
- 3) Se demuestra la presencia de la SKI fosforilada en células de la teca.
- 4) La síntesis de S1P por estímulo de LH participa como un mediador de los efectos de esta gonadotropina para producir los efectos en la viabilidad y síntesis de progesterona en células de la teca de bovino cultivadas por 96 horas.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Abruzzese, G. A., Heber, M. F., Arbocco, F. C. V., Ferreira, S. R., & Motta, A. B. (2019). Fetal programming by androgen excess in rats affects ovarian fuel sensors and steroidogenesis. *Journal of developmental origins of health and disease*, 10(6), 645-658.

Aerts, J. M. J., & Bols, P. E. J. (2010). Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in domestic animals*, 45(1), 171-179.

Agudo López, A. (2011). Efecto neuroprotector de la ceramida y de la esfingosina 1-Fosfato en la muerte inducida por isquemia (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones).

Alberts, B., Johnson, A. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. USA.

Álvarez, S. E., Harikumar, K. B., Hait, N. C., Allegood, J., Strub, G. M., Kim, E. Y., ... & Milstien, S. (2010). Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature*, 465(7301), 1084-1088.

Andrade, G. M., Collado, M. D., Meirelles, F. V., Silveira, J. C. D., & Perecin, F. (2019). Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Animal Reproduction*, 16(3), 485-496.

Astapova, O., Minor, B. M., & Hammes, S. R. (2019). Physiological and pathological androgen actions in the ovary. *Endocrinology*, 160(5), 1166-1174.

Baird, D. T., & McNeilly, A. S. (1981). Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe. *J Reprod Fertil Suppl*, 30, 119-133.



Bakrania, P., Efthymiou, M., Klein, J. C., Salt, A., Bunyan, D. J., Wyatt, A., ... & Ragge, N. K. (2008). Mutations in BMP4 cause eye, brain, and digit developmental anomalies: overlap between the BMP4 and hedgehog signaling pathways. *The American Journal of Human Genetics*, 82(2), 304-319.

Bartke, N., & Hannun, Y. A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of lipid research*, 50(Supplement), S91-S96.

Bazúa-Valenti, S., & García-Sáinz, J. A. (2012). La esfingosina 1-fosfato y su receptor S1P1: reguladores de la respuesta inmune. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 55(6), 53-57.

Belli, M., & Shimasaki, S. (2018). Molecular aspects and clinical relevance of GDF9 and BMP15 in ovarian function. In *Vitamins and hormones* (Vol. 107, pp. 317-348). Academic Press.

Betito, S., & Cuvillier, O. (2006). Regulation by sphingosine 1-phosphate of Bax and Bad activities during apoptosis in a MEK-dependent manner. *Biochemical and biophysical research communications*, 340(4), 1273-1277.

Birchwood, C. J., Saba, J. D., Dickson, R. C., & Cunningham, K. W. (2001). Calcium influx and signaling in yeast stimulated by intracellular sphingosine 1-phosphate accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11712-11718.

Blaho, V. A., & Hla, T. (2014). An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *Journal of lipid research*, 55(8), 1596-1608.

Bonhoure, E., Lauret, A., Barnes, D. J., Martin, C., Malavaud, B., Kohama, T., ... & Cuvillier, O. (2008). Sphingosine kinase-1 is a downstream regulator of imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 22(5), 971-979.

Borráz-León, J. I., Herrera-Pérez, J. J., Cerda-Molina, A. L., & Martínez-Mota, L. A. (2015). Testosterona y salud mental: una revisión. *Psiquiatría Biológica*, 22(2), 44-49.

Bousfield, G. R., & Dias, J. A. (2011). Synthesis and secretion of gonadotropins including structure-function correlates. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 12(4), 289-302.

Brizuela, L., Rábano, M., Gangoiti, P., Narbona, N., Macarulla, J. M., Trueba, M., & Gómez-Muñoz, A. (2007). Sphingosine-1-phosphate stimulates aldosterone secretion through a mechanism involving the PI3K/PKB and MEK/ERK 1/2 pathways. *Journal of lipid research*, 48(10), 2264-2274.

Brizuela, L., Rábano, M., Peña, A., Gangoiti, P., Macarulla, J. M., Trueba, M., & Gómez-Muñoz, A. (2006). Sphingosine 1-phosphate: a novel stimulator of aldosterone secretion. *Journal of lipid research*, 47(6), 1238-1249.

Bryan, A. M., & Del Poeta, M. (2018). Sphingosine-1-phosphate receptors and innate immunity. *Cellular microbiology*, 20(5), e12836.

Cable, J. K., & Grider, M. H. (2020). Physiology, Progesterone. *StatPearls*.

Campbell, B. K., Baird, D. T., & Webb, R. (1998). Effects of dose of LH on androgen production and luteinization of ovine theca cells cultured in a serum-free system. *Reproduction*, 112(1), 69-77.

Caraty, A., Delaleu, B., Chesneau, D., & Fabre-Nys, C. (2002). Sequential role of E2 and GnRH for the expression of estrous behavior in ewes. *Endocrinology*, 143(1), 139-145.

Casarini, L., & Crépieux, P. (2019). Molecular mechanisms of action of FSH. *Frontiers in endocrinology*, 10, 305.

Casarini, L., Riccetti, L., De Pascali, F., Nicoli, A., Tagliavini, S., Trenti, T., ... & Simoni, M. (2016). Follicle-stimulating hormone potentiates the steroidogenic activity of chorionic gonadotropin and the anti-apoptotic activity of luteinizing hormone in human granulosa-lutein cells in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, 422, 103-114.

Chaffin, C. L., Dissen, G. A., & Stouffer, R. L. (2000). Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri-ovulatory interval in monkeys. *Molecular human reproduction*, 6(1), 11-18.

Chappell, C. A., Rohan, L. C., Moncla, B. J., Wang, L., Meyn, L. A., Bunge, K., & Hillier, S. L. (2014). The effects of reproductive hormones on the physical properties of cervicovaginal fluid. *American journal of obstetrics and gynecology*, 211(3), 226-e1.

Cheng, J. C., Chang, H. M., Liu, P. P., & Leung, P. C. (2016). Sphingosine-1-phosphate induces COX-2 expression and PGE2 production in human granulosa cells through a S1P1/3-mediated YAP signaling. *Cellular signalling*, 28(6), 643-651.

Choi, J., & Smitz, J. (2014). Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference. *Molecular and cellular endocrinology*, 383(1-2), 203-213.

Chu, C., Xu, B., & Huang, W. (2010). Studies on expression of FSH and its anti-apoptotic effects on ischemia injury in rat spinal cord. *Journal of molecular histology*, 41(2-3), 165-176.

Clarke, C. J., Snook, C. F., Tani, M., Matmati, N., Marchesini, N., & Hannun, Y. A. (2006). The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry*, 45(38), 11247-11256.

Conneely, O. M., & Lydon, J. P. (2000). Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids*, 65(10-11), 571-577.

Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Structure of the Plasma Membrane. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9898/>

Coss, D. (2018). Regulation of reproduction via tight control of gonadotropin hormone levels. *Molecular and cellular endocrinology*, 463, 116-130.

Craig, J., Orisaka, M., Wang, H., Orisaka, S., Thompson, W., Zhu, C., ... & Tsang, B. K. (2007). Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, 3628-3639.

Cui, C., Han, S., Yin, H., Luo, B., Shen, X., Yang, F., ... & Wang, Y. (2019). FOXO3 is expressed in ovarian tissues and acts as an apoptosis initiator in granulosa cells of chickens. *BioMed Research International*, 2019.

Cuvillier, O., & Levade, T. (2001). Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 98(9), 2828-2836.

Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., & Spiegel, S. (1998). Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly (ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas-and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 2910-2916.

Daum, G., Grabski, A., & Reidy, M. A. (2009). Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(10), 1439-1443.

Dias, J. A., Mahale, S. D., Nechamen, C. A., Davydenko, O., Thomas, R. M., & Ulloa-Aguirre, A. (2010). Emerging roles for the FSH receptor adapter protein APPL1 and overlap of a putative 14-3-3 $\tau$  interaction domain with a canonical G-protein interaction site. *Molecular and cellular endocrinology*, 329(1-2), 17-25.

Diep, C. H., Daniel, A. R., Mauro, L. J., Knutson, T. P., & Lange, C. A. (2015). Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J Mol Endocrinol*, 54(2), R31-53.

Drouillard, A., Mathieu, A. L., Marçais, A., Belot, A., Viel, S., Mingueneau, M., ... & Walzer, T. (2018). S1PR5 is essential for human natural killer cell migration toward

sphingosine-1 phosphate. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(6), 2265-2268.

Duan, H. F., Wu, C. T., Lu, Y., Wang, H., Liu, H. J., Zhang, Q. W., ... & Wang, L. S. (2004). Sphingosine kinase activation regulates hepatocyte growth factor induced migration of endothelial cells. *Experimental cell research*, 298(2), 593-601.

Durán-Pastén, M. L., & Fiordeliso, T. (2013). GnRH-induced Ca<sup>2+</sup> signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Frontiers in endocrinology*, 4, 127.

Ebenezer, D. L., Fu, P., & Natarajan, V. (2016). Targeting sphingosine-1-phosphate signaling in lung diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 168, 143-157.

Egbert, J. R., Yee, S. P., & Jaffe, L. A. (2018). Luteinizing hormone signaling phosphorylates and activates the cyclic GMP phosphodiesterase PDE5 in mouse ovarian follicles, contributing an additional component to the hormonally induced decrease in cyclic GMP that reinitiates meiosis. *Developmental biology*, 435(1), 6-14.

Espinoza-Villavicencio, J. L., Ortega-Pérez, R., Palacios-Espinosa, A., Valencia-Méndez, J., & Aréchiga-Flores, C. F. (2007). Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: una revisión. *Interiencia*, 32(2), 93-99.

Evans, A. C. O. (2003). Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4), 240-246.

Evans, N. P., McNeilly, J. R., & Webb, R. (1994). Alterations in endogenous gonadotropin secretion and pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone in adult ewes, following indirect selection in prepubertal male lambs. *Biology of reproduction*, 51(5), 913-919.

Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(202), 2-2.

Fitzgerald, K. A., O'Neill, L. A., Gearing, A. J., & Callard, R. E. (2001). The cytokine factsbook and webfacts. Elsevier.

Flores-Pérez, F. I., Rosas-Velasco, C., Pardo, M. C. R., & Pérez-Martínez, M. (2005). Apoptosis and follicular atresia: an essential binomial for ovarian development. *Veterinaria México*, 36(1), 87-103.

Fortune, J. E., Rivera, G. M., & Yang, M. Y. (2004). Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal reproduction science*, 82, 109-126.

Fortune, J. E., Rivera, G. M., Evans, A. C. O., & Turzillo, A. M. (2001). Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, 65(3), 648-654.

Fukuda, S., Orisaka, M., Tajima, K., Hattori, K., & Kotsuji, F. (2009). Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. *Journal of Ovarian Research*, 2(1), 1-8.

García Sáinz, J. A. (2011). Receptores acoplados a proteínas G y su desensibilización. *Revista odontológica mexicana*, 15(4), 210-213.

García, M., & Vecino, E. (2003). Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 78(7), 351-364.

García-Rico, R. O., & Fierro, F. (2017). Role of G-protein alpha sub-units in the morphogenic processes of filamentous Ascomycota fungi. *Revista iberoamericana de micología*, 34(1), 1-9.

Gebai, A., Gorelik, A., Li, Z., Illes, K., & Nagar, B. (2018). Structural basis for the activation of acid ceramidase. *Nature communications*, 9(1), 1-11.

Gebremedhn, S., Dessie Salilew-Wondim, I. A., Sahadevan, S., Hossain, M. M., Hoelker, M., Rings, F., ... & Tesfaye, D. (2015). MicroRNA expression profile in bovine

granulosa cells of preovulatory dominant and subordinate follicles during the late follicular phase of the estrous cycle. *PLoS one*, 10(5).

Ginther, O. J., Beg, M. A., Bergfelt, D. R., Donadeu, F. X., & Kot, K. (2001). Follicle selection in monovular species. *Biology of reproduction*, 65(3), 638-647.

Girard, A., Dufort, I., Douville, G., & Sirard, M. A. (2015). Global gene expression in granulosa cells of growing, plateau and atretic dominant follicles in cattle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1-15.

Gómez-Chang, E., Larrea, F., & Martínez-Montes, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1), 24-36.

Goparaju, S. K., Jolly, P. S., Watterson, K. R., Bektas, M., Alvarez, S., Sarkar, S., ... & Spiegel, S. (2005). The S1P2 receptor negatively regulates platelet-derived growth factor-induced motility and proliferation. *Molecular and cellular biology*, 25(10), 4237-4249.

Gräler, M. H., Bernhardt, G., & Lipp, M. (1998). EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics*, 53(2), 164-169.

Green, J. A., & Cyster, J. G. (2012). S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation. *Immunological reviews*, 247(1), 36-51.

Guo, L., Ou, X., Li, H., & Han, Z. (2014). Roles of sphingosine-1-phosphate in reproduction. *Reproductive Sciences*, 21(5), 550-554.

Guzel, Y., Bildik, G., Dilege, E., & Oktem, O. (2018). Sphingosine-1-phosphate reduces atresia of primordial follicles occurring during slow-freezing and thawing of human ovarian cortical strips. *Molecular reproduction and development*, 85(11), 858-864.

Guzmán, A., Rosales-Torres, A. M., Hernández-Coronado, C. 2017. Hormonas Que Regulan La Reproducción: Mecanismo de Acción. Editorial Académica Española.

Hait, N. C., & Maiti, A. (2017). The role of sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate in inflammation and cancer. *Mediators of inflammation*, 2017.

Hait, N. C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G. M., Harikumar, K. B., Singh, S. K., ... & Spiegel, S. (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science*, 325(5945), 1254-1257.

Hait, N. C., Oskeritzian, C. A., Paugh, S. W., Milstien, S., & Spiegel, S. (2006). Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(12), 2016-2026.

Hancke, K., Strauch, O., Kissel, C., Göbel, H., Schäfer, W., & Denschlag, D. (2007). Sphingosine 1-phosphate protects ovaries from chemotherapy-induced damage in vivo. *Fertility and sterility*, 87(1), 172-177.

Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(3), 175.

Hattori, K., Orisaka, M., Fukuda, S., Tajima, K., Yamazaki, Y., Mizutani, T., & Yoshida, Y. (2018). Luteinizing hormone facilitates antral follicular maturation and survival via thecal paracrine signaling in cattle. *Endocrinology*, 159(6), 2337-2347.

Henry, L., Fransolet, M., Labied, S., Blacher, S., Masereel, M. C., Foidart, J. M., ... & Munaut, C. (2016). Supplementation of transport and freezing media with anti-apoptotic drugs improves ovarian cortex survival. *Journal of ovarian research*, 9(1), 4.

Hernandez, F., Peluffo, M. C., Bas, D., Stouffer, R. L., & Tesone, M. (2009). Local effects of the sphingosine 1-phosphate on prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteolysis in the pregnant rat. *Molecular reproduction and development*, 76(12), 1153-1164.



Hernández-Coronado, C. G., Guzmán, A., Castillo-Juárez, H., Zamora-Gutiérrez, D., & Rosales-Torres, A. M. (2019, November). Sphingosine-1-phosphate (S1P) in ovarian physiology and disease. In *Annales d'endocrinologie* (Vol. 80, No. 5-6, pp. 263-272).

Hernández-Coronado, C. G., Guzmán, A., Espinosa-Cervantes, R., Romano, M. C., Verde-Calvo, J. R., & Rosales-Torres, A. M. (2015). Sphingosine-1-phosphate and ceramide are associated with health and atresia of bovine ovarian antral follicles. *animal*, 9(2), 308-312.

Hernández-Coronado, C. G., Guzmán, A., Rodríguez, A., Mondragon, J. A., Romano, M. C., Gutierrez, C. G., & Rosales-Torres, A. M. (2016). Sphingosine-1-phosphate, regulated by FSH and VEGF, stimulates granulosa cell proliferation. *General and comparative endocrinology*, 236, 1-8.

Hernández-Coronado, Cyndi. 2012. "La Ceramida Como Indicador de Atresia Folicular En El Bovino." Universidad Autónoma Metropolitana".

Hillier, S. G. (2001). Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Molecular and cellular endocrinology*, 179(1-2), 39-46.

Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ (2001) Lysophospholipids: receptor revelations . *Science* 294 : 1875–1878.

Hla, T., LEE, M. J., Ancellin, N., Thangada, S., Liu, C. H., Kluk, M., ... & WU, M. T. (2000). Sphingosine-1-phosphate signaling via the EDG-1 family of G-protein-coupled receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 905(1), 16-24.

Hugues, J. N. (2012). Impact of 'LH activity'supplementation on serum progesterone levels during controlled ovarian stimulation: a systematic review. *Human reproduction*, 27(1), 232-243.

Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F., Hatzirodos, N., Bonner, W., Sabatier, L., Reinhardt, D. P., ... & Rodgers, R. J. (2013). A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PloS one*, 8(2).

Hutt, K. J., McLaughlin, E. A., & Holland, M. K. (2006). Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Molecular human reproduction*, 12(2), 61-69.

Ireland, J. J., Mihm, M., Austin, E., Diskin, M. G., & Roche, J. F. (2000). Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1648-1658.

Jameson, J. L., & De Groot, L. J. (2010). *Endocrinology-E-Book: Adult and Pediatric*. Elsevier Health Sciences.

Jamnongjit, M., & Hammes, S. R. (2006). Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell cycle*, 5(11), 1178-1183.

Janjic, M. M., Stojilkovic, S. S., & Bjelobaba, I. (2017). Intrinsic and regulated gonadotropin-releasing hormone receptor gene transcription in mammalian pituitary gonadotrophs. *Frontiers in endocrinology*, 8, 221.

Jayasena, C; Alkaabi F; Liebers, C; Handley, T; Franks, S; Dhillon W. 2018. A systematic review of randomized controlled trials investigating the efficacy and safety of testosterone therapy for female sexual dysfunction in postmenopausal women. *Clinical Endocrinology*, Volume 90 (3).

Kakuta, H., Iguchi, T., & Sato, T. (2018). The Involvement of Granulosa Cells in the Regulation by Gonadotropins of Cyp17a1 in Theca Cells. *in vivo*, 32(6), 1387-1401.

Karsch, F. J., Bowen, J. M., Caraty, A., Evans, N. P., & Moenter, S. M. (1997). Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biology of reproduction*, 56(2), 303-309.

Kawaguchi, S., Sakumoto, R., & Okuda, K. (2013). Induction of the expressions of antioxidant enzymes by luteinizing hormone in the bovine corpus luteum. *The Journal of reproduction and development*, 59(3), 219–224. <https://doi.org/10.1262/jrd.2012-186>.

Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., & Hannun, Y. A. (2008). The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cellular signalling*, 20(6), 1010-1018.

Kleuser, B. (2018). *The Enigma of Sphingolipids in Health and Disease*.

Kraemer, F. B., Shen, W. J., & Azhar, S. (2017). SNAREs and cholesterol movement for steroidogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*, 441, 17-21.

Książek, M., Chacińska, M., Chabowski, A., & Baranowski, M. (2015). Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *Journal of lipid research*, 56(7), 1271-1281.

Lange, C. A., & Yee, D. (2008). Progesterone and breast cancer. *Women's Health*, 4(2), 151-162.

Lewis, A. C., Wallington-Beddoe, C. T., Powell, J. A., & Pitson, S. M. (2018). Targeting sphingolipid metabolism as an approach for combination therapies in haematological malignancies. *Cell Death Discovery*, 4(1), 1-11.

Li, S. K., & Hearn, M. T. (2000). Isolation of thecal cells: an assessment of purity and steroidogenic potential. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 45(2), 169-181.

Liu, L., Panzitt, K., Racedo, S., Wagner, M., Platzer, W., Zaufel, A., ... & Heinemann, A. (2019). Bile acids increase steroidogenesis in cholemic mice and induce cortisol secretion in adrenocortical H295R cells via S1 PR 2, ERK and SF-1. *Liver International*, 39(11), 2112-2123.

Lizneva, D., Rahimova, A., Kim, S. M., Atabiekov, I., Javaid, S., Alamoush, B., ... & Yuen, T. (2019). FSH beyond fertility. *Frontiers in endocrinology*, 10.

Lobo, R. A. (Ed.). (2007). *Treatment of the postmenopausal woman: basic and clinical aspects*. Elsevier.

Looper, M. L., Vizcarra, J. A., Wettemann, R. P., Malayer, J. R., Braden, T. D., Geisert, R. D., & Morgan, G. L. (2003). Influence of estradiol, progesterone, and nutrition on concentrations of gonadotropins and GnRH receptors, and abundance of mRNA for GnRH receptors and gonadotropin subunits in pituitary glands of beef cows. *Journal of animal science*, 81(1), 269-278.

Lucki, N. C., & Sewer, M. B. (2008). Multiple roles for sphingolipids in steroid hormone biosynthesis. In *Lipids in Health and Disease* (pp. 387-412). Springer, Dordrecht.

Lucki, N. C., & Sewer, M. B. (2010). The interplay between bioactive sphingolipids and steroid hormones. *Steroids*, 75(6), 390-399.

Lucki, N. C., Li, D., & Sewer, M. B. (2012). Sphingosine-1-phosphate rapidly increases cortisol biosynthesis and the expression of genes involved in cholesterol uptake and transport in H295R adrenocortical cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 348(1), 165-175.

Maceyka, M., Harikumar, K. B., Milstien, S., & Spiegel, S. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in cell biology*, 22(1), 50-60.

Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N. C., Le Stunff, H., Liu, H., Toman, R., ... & Milstien, S. (2005). SK1 and SK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 37118-37129.

Mani, S. K., & Blaustein, J. D. (2012). Neural progesterin receptors and female sexual behavior. *Neuroendocrinology*, 96(2), 152-161.

McCudden, C. R., Hains, M. D., Kimple, R. J., Siderovski, D. P., & Willard, F. S. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cellular and molecular life sciences*, 62(5), 551-577.

McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, 21(2), 200-214.

Mendelson, K., Evans, T., & Hla, T. (2014). Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development*, 141(1), 5-9.

Menon, B., Franzo-Romain, M., Damanpour, S., & Menon, K. M. J. (2011). Luteinizing hormone receptor mRNA down-regulation is mediated through ERK-dependent induction of RNA binding protein. *Molecular Endocrinology*, 25(2), 282-290.

Menon, K. M. J., & Menon, B. (2014). Regulation of luteinizing hormone receptor expression by an RNA binding protein: role of ERK signaling. *The Indian journal of medical research*, 140(Suppl 1), S112.

Mesiano, S. (2007, January). Myometrial progesterone responsiveness. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 25, No. 01, pp. 005-013). Copyright© 2007 by Thieme Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.

Meyer zu Heringdorf, D., Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J. H., Tigyi, G., & Jakobs, K. H. (2003). Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca<sup>2+</sup> mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS letters*, 554(3), 443-449.

Michel, C., van Echten-Deckert, G., Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E., & Merrill, A. H. (1997). Characterization of ceramide synthesis a dihydroceramide desaturase introduces the 4, 5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22432-22437.

Mihm, M., Crowe, M. A., Knight, P. G., & Austin, E. J. (2002). Follicle wave growth in cattle. *Reproduction in Domestic animals*, 37(4), 191-200.

Miller, W. L. (2008). Steroidogenic enzymes. In *Disorders of the human Adrenal cortex* (Vol. 13, pp. 1-18). Karger Publishers.

Miller, W. L., & Bose, H. S. (2011). Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking: thematic review series: genetics of human lipid diseases. *Journal of lipid research*, 52(12), 2111-2135.

Morita, Y., Perez, G. I., Paris, F., Miranda, S. R., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., ... & Kolesnick, R. N. (2000). Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nature medicine*, 6(10), 1109-1114.

Moriue, T., Igarashi, J., Yoneda, K., Nakai, K., Kosaka, H., & Kubota, Y. (2008). Sphingosine 1-phosphate attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 368(4), 852-857.

Motta, D., Ramos, C., González, S., & Castro, R. (2011). Follicular dynamics in the reproductive life of female livestock. *Veterinaria y Zootecnia*, 5(2), 88-99.

Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive?. *Cell*, 115(4), 377-388.

Nakahara, T., Iwase, A., Nakamura, T., Kondo, M., Kobayashi, H., Takikawa, S., ... & Kikkawa, F. (2012). Sphingosine-1-phosphate inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced granulosa cell apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway. *Fertility and sterility*, 98(4), 1001-1008.

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 5994, Progesterone. Retrieved January 17, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Progesterone>.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Sphingosine 1-phosphate, CID=5283560, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sphingosine-1-phosphate> (accessed on June 14, 2020)

Noma, N., Kawashima, I., Fan, H. Y., Fujita, Y., Kawai, T., Tomoda, Y., ... & Shimada, M. (2011). LH-induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. *Molecular Endocrinology*, 25(1), 104-116.

Obinata, H., & Hla, T. (2012, January). Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 34, No. 1, pp. 73-91). Springer-Verlag.

Okamoto, H., Takuwa, N., Gonda, K., Okazaki, H., Chang, K., Yatomi, Y., ... & Takuwa, Y. (1998). EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca<sup>2+</sup> mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27104-27110.

Okuda, K., Bowolaksono, A., & Acosta, T. J. (2009). Anti-Apoptotic Roles of Luteinizing Hormone in Bovine Luteal Cells.

Olesch, C., Ringel, C., Brüne, B., & Weigert, A. (2017). Beyond immune cell migration: the emerging role of the sphingosine-1-phosphate receptor S1PR4 as a modulator of innate immune cell activation. *Mediators of inflammation*, 2017.

Ozbay, T., Rowan, A., Leon, A., Patel, P., & Sewer, M. B. (2006). Cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent sphingosine-1-phosphate biosynthesis induces human CYP17 gene transcription by activating cleavage of sterol regulatory element binding protein 1. *Endocrinology*, 147(3), 1427-1437.

Palermo, R. (2007). Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive biomedicine online*, 15(3), 326-337.

Palmerini, M. G., Nottola, S. A., Tunjung, W. A. S., Kadowaki, A., Bianchi, S., Cecconi, S., ... & Macchiarelli, G. (2016). EGF-FSH supplementation reduces apoptosis of pig granulosa cells in co-culture with cumulus-oocyte complexes. *Biochemical and biophysical research communications*, 481(1-2), 159-164.

Patel, B., Elguero, S., Thakore, S., Dahoud, W., Bedaiwy, M., & Mesiano, S. (2015). Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Human reproduction update*, 21(2), 155-173.

Pawlina, W., & Ross, M. H. (2016). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Peña, M., Góngora, A., & Estrada, J. (2007). Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1), 942-954.

Pettus, B. J., Bielawski, J., Porcelli, A. M., Reames, D. L., Johnson, K. R., Morrow, J., ... & Hannun, Y. A. (2003). The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF- $\alpha$ . *The FASEB Journal*, 17(11), 1411-1421.

Pitson, S. M. (2011). Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends in biochemical sciences*, 36(2), 97-107.

Podlasek, C. A., Mulhall, J., Davies, K., Wingard, C. J., Hannan, J. L., Bivalacqua, T. J., ... & Burnett II, A. L. (2016). Translational perspective on the role of testosterone in sexual function and dysfunction. *The journal of sexual medicine*, 13(8), 1183-1198.

Polyzos, N. P., Davis, S. R., Drakopoulos, P., Humaidan, P., De Geyter, C., Vega, A. G., ... & Tournaye, H. (2018). Testosterone for poor ovarian responders: lessons from ovarian physiology. *Reproductive Sciences*, 25(7), 980-982.

Ponnusamy, S., Meyers-Needham, M., Senkal, C. E., Saddoughi, S. A., Sentelle, D., Selvam, S. P., ... & Ogretmen, B. (2010). Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future oncology*, 6(10), 1603-1624.

Pors, S. E., Harðardóttir, L., Olesen, H. Ø., Riis, M. L., Jensen, L. B., Andersen, A. S., ... & Andersen, C. Y. (2020). Effect of sphingosine-1-phosphate on activation of dormant follicles in murine and human ovarian tissue. *Molecular Human Reproduction*, 26(5), 301-311.



Pyne, N. J., & Pyne, S. (2017). Sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling in mammalian cells. *Molecules*, 22(3), 344.

Rábano, M., Peña, A., Brizuela, L., Marino, A., Macarulla, J. M., Trueba, M., & Gómez-Muñoz, A. (2003). Sphingosine-1-phosphate stimulates cortisol secretion. *FEBS letters*, 535(1-3), 101-105.

Richards, J. S., Ren, Y. A., Candelaria, N., Adams, J. E., & Rajkovic, A. (2018). Ovarian follicular theca cell recruitment, differentiation, and impact on fertility: 2017 update. *Endocrine reviews*, 39(1), 1-20.

Rimoin, D. L., Connor, J. M., Pyeritz, R. E., & Korf, B. R. (2007). *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*. Churchill Livingstone Elsevier.

Robker, R. L., & Richards, J. S. (1998). Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Molecular Endocrinology*, 12(7), 924-940.

Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of reproduction*, 82(6), 1021-1029.

Rodríguez, Ana. 2003. "Efecto de La Leptina En La Esteroidogénesis y Multiplicación de Células de La Teca in Vitro." Universidad Nacional Autónoma de México.

Romero-Castillo, R. A., Choudhury, S. R., León-Félix, J., & Pandey, S. (2015). Characterization of the heterotrimeric G-protein family and its transmembrane regulator from capsicum (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 234, 97-109.

Rosales Torres, A. M., & Guzman Sanchez, A. (2012). Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptors during the ovarian cycle. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(1), 89-111.

Rosales-Torres, A. M., & Guzmán, A. (2011). Follicular development in domestic ruminants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(S1).

Rossi, V., Lispi, M., Longobardi, S., Mattei, M., Di Rella, F., Salustri, A., ... & Klingler, F. G. (2017). LH prevents cisplatin-induced apoptosis in oocytes and preserves female fertility in mouse. *Cell Death & Differentiation*, 24(1), 72-82.

Roth, Z., & Hansen, P. J. (2004). Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biology of reproduction*, 71(6), 2072-2078.

Samy, E. T., Meyer, C. A., Caplazi, P., Langrish, C. L., Lora, J. M., Bluethmann, H., & Peng, S. L. (2007). Cutting edge: modulation of intestinal autoimmunity and IL-2 signaling by sphingosine kinase 2 independent of sphingosine 1-phosphate. *The Journal of Immunology*, 179(9), 5644-5648.

Sarkar, S., Maceyka, M., Hait, N. C., Paugh, S. W., Sankala, H., Milstien, S., & Spiegel, S. (2005). Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS letters*, 579(24), 5313-5317.

Schulze, T., Golfier, S., Tabeling, C., Räbel, K., Gräler, M. H., Witzenrath, M., & Lipp, M. (2011). Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P4) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model. *The FASEB Journal*, 25(11), 4024-4036.

Shen, M., Liu, Z., Li, B., Teng, Y., Zhang, J., Tang, Y., ... & Liu, H. (2014). Involvement of FoxO1 in the effects of follicle-stimulating hormone on inhibition of apoptosis in mouse granulosa cells. *Cell death & disease*, 5(10), e1475-e1475.

Shen, Y., Zhao, S., Wang, S., Pan, X., Zhang, Y., Xu, J., ... & Yang, Q. (2019). S1P/S1PR3 axis promotes aerobic glycolysis by YAP/c-MYC/PGAM1 axis in osteosarcoma. *EBioMedicine*, 40, 210-223.

Shoham, Z., Jacobs, H. S., & Insler, V. (1993). Luteinizing hormone: its role, mechanism of action, and detrimental effects when hypersecreted during the follicular phase. *Fertility and sterility*, 59(6), 1153-1161.

Shu, W., Jiang, Y. Q., Lu, M. M., & Morrisey, E. E. (2002). Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung. *Development*, 129(20), 4831-4842.

Sic, H., Kraus, H., Madl, J., Flittner, K. A., Von Münchow, A. L., Pieper, K., ... & Kleuser, B. (2014). Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(2), 420-428.

Sir T., Preisler J., Magendzo A. (2013). Polycystic ovary syndrome: diagnosis and management. *Endocrinology* (24) 734-887.

Sirois, J., & Fortune, J. E. (1988). Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonograph. *Biology of reproduction*, 39(2), 308-317.

Sitruk-Ware, R. (2018). Non-clinical studies of progesterone. *Climacteric*, 21(4), 315-320.

Slot, K. A., de Boer-Brouwer, M., Houweling, M., Vaandrager, A. B., Dorrington, J. H., & Teerds, K. J. (2006). Luteinizing hormone inhibits Fas-induced apoptosis in ovarian surface epithelial cell lines. *Journal of endocrinology*, 188(2), 227-239.

Soleimani, R., Heytens, E., & Oktay, K. (2011). Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PloS one*, 6(4), e19475.

Spencer, T. E., Forde, N., & Lonergan, P. (2016). The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *Journal of dairy science*, 99(7), 5941-5950.

Sperduti, S., Limoncella, S., Lazzaretti, C., Paradiso, E., Riccetti, L., Turchi, S., ... & Longobardi, S. (2019). GnRH Antagonists Produce Differential Modulation of the

Signaling Pathways Mediated by GnRH Receptors. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5548.

Spiegel, S., & Milstien, S. (2007). Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives. *Journal of Biological Chemistry*, 282(4), 2125-2129.

Spiegel, S., & Milstien, S. (2011). The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 403-415.

Stamatiades, G. A., & Kaiser, U. B. (2018). Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: signaling and gene expression. *Molecular and cellular endocrinology*, 463, 131-141.

Sterin-Speziale, N., & Nieto, F. L. (2007). Los esfingolípidos en la muerte y proliferación celular. *Química Viva*, 6(3), 112-138.

Strauss III, J. F., Modi, B., & McAllister, J. M. (2014). Defects in Ovarian Steroid Hormone Biosynthesis. In *Cellular Endocrinology in Health and Disease* (pp. 285-309). Academic Press.

Strub, G. M., Paillard, M., Liang, J., Gomez, L., Allegood, J. C., Hait, N. C., ... & Kordula, T. (2011). Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *The FASEB Journal*, 25(2), 600-612.

Sukocheva, O. A., Wang, L., Albanese, N., Pitson, S. M., Vadas, M. A., & Xia, P. (2003). Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells. *Molecular endocrinology*, 17(10), 2002-2012.

Tajima, K., Orisaka, M., Mori, T., & Kotsuji, F. (2007). Ovarian theca cells in follicular function. *Reproductive biomedicine online*, 15(5), 591-609.

Tajima, K., Yoshii, K., Fukuda, S., Orisaka, M., Miyamoto, K., Amsterdam, A., & Kotsuji, F. (2005). Luteinizing hormone-induced extracellular-signal regulated kinase

activation differently modulates progesterone and androstenedione production in bovine theca cells. *Endocrinology*, 146(7), 2903-2910.

Takabe, K., Paugh, S. W., Milstien, S., & Spiegel, S. (2008). "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacological reviews*, 60(2), 181-195.

Tan, S. J., Lee, L. J., Tzeng, C. R., Wang, C. W., Hsu, M. I., & Chen, C. H. (2014). Targeted anti-apoptosis activity for ovarian protection against chemotherapy-induced ovarian gonadotoxicity. *Reproductive biomedicine online*, 29(5), 612-620.

Torres, A. M. R., & Sanchez, A. G. (2008). Apoptosis in follicular atresia and luteal regression. Review. *Técnica Pecuaria en México*, 46(2).

Turnham, R. E., & Scott, J. D. (2016). Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene*, 577(2), 101-108.

Ulloa-Aguirre, A., Reiter, E., & Crepieux, P. (2018). FSH receptor signaling: complexity of interactions and signal diversity. *Endocrinology*, 159(8), 3020-3035.

Umer, S., Zhao, S. J., Sammad, A., Weldegebriall Sahlu, B., Pang, Y., & Zhu, H. (2019). AMH: Could It Be Used as A Biomarker for Fertility and Superovulation in Domestic Animals?. *Genes*, 10(12), 1009.

Uribe J. 2016. Via trasera de la síntesis de testosterona (backdoor pathway). *Urología colombiana* 25(1), 25-30.

Van Brocklyn, J. R., Gräler, M. H., Bernhardt, G., Hobson, J. P., Lipp, M., & Spiegel, S. (2000). Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(8), 2624-2629.

Van Eps, N., Altenbach, C., Caro, L. N., Latorraca, N. R., Hollingsworth, S. A., Dror, R. O., ... & Hubbell, W. L. (2018). Gi-and Gs-coupled GPCRs show different

modes of G-protein binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10), 2383-2388.

Vásquez-Cano, J. F., & Olivera, M. (2010). Cellular Signaling in the Bovine Antral Follicles. *ORINOQUIA*, 14(2), 178-187.

Vendola, K., Zhou, J., Wang, J., Famuyiwa, O. A., Bievre, M., & Bondy, C. A. (1999). Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biology of Reproduction*, 61(2), 353-357.

Ventura-Arizmendi, E., & Hernández-Valencia, M. (2019). La esteroidogénesis en el síndrome de ovarios poliquísticos. *Gaceta medica de Mexico*, 155(2), 184-190.

von Otte, S., Paletta, J. R., Becker, S., König, S., Fobker, M., Greb, R. R., ... & Nofer, J. R. (2006). Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5398-5405.

Walters, K. (2015). Role of androgens in normal and pathological ovarian function. *Reproduction*; 149(4):R193–R218

Walters, K. A., Simanainen, U., & Handelsman, D. J. (2010). Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Human reproduction update*, 16(5), 543-558.

Wang, D., Zhao, Z., Caperell-Grant, A., Yang, G., Mok, S. C., Liu, J., ... & Xu, Y. (2008). S1P differentially regulates migration of human ovarian cancer and human ovarian surface epithelial cells. *Molecular cancer therapeutics*, 7(7), 1993-2002.

Wang, H., Cai, Y., Shao, Y., Zhang, X., Li, N., Zhang, H., & Liu, Z. (2018). Fish oil ameliorates high-fat diet induced male mouse reproductive dysfunction via modifying the rhythmic expression of testosterone synthesis related genes. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1325.

Wang, X. L., Wu, Y., Tan, L. B., Tian, Z., Liu, J. H., Zhu, D. S., & Zeng, S. M. (2012). Follicle-stimulating hormone regulates pro-apoptotic protein Bcl-2-interacting mediator of cell death-extra long (BimEL)-induced porcine granulosa cell apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10166-10177.

Wear, H. M., McPike, M. J., & Watanabe, K. H. (2016). From primordial germ cells to primordial follicles: a review and visual representation of early ovarian development in mice. *Journal of ovarian research*, 9(1), 36.

Webb, R. P. C. G., Garnsworthy, P. C., Gong, J. G., & Armstrong, D. G. (2004). Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, 82(suppl\_13), E63-E74.

Webb, R., Campbell, B., Garverick, H., Gong, J., Gutierrez, C., & Armstrong, D. (1999). Molecular mechanisms regulating follicular. *Journal of Reproduction and Fertility supplement*, 54, 33-48.

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-CAMBRIDGE-SUPPLEMENT-*, 71-90.

Weil, S. J., Vendola, K., Zhou, J., Adesanya, O. O., Wang, J., Okafor, J., & Bondy, C. A. (1998). Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(7), 2479-2485.

Whitlock, K., Postlethwait, J., & Ewer, J. (2019). Neuroendocrinology of reproduction: Is gonadotropin-releasing hormone (GnRH) *Frontiers in neuroendocrinology*.

Wu, S. P., & DeMayo, F. J. (2017). Progesterone receptor signaling in uterine myometrial physiology and preterm birth. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 125, pp. 171-190). Academic Press.

Wu, X., Sakharkar, M. K., Wabitsch, M., & Yang, J. (2020). Effects of Sphingosine-1-Phosphate on Cell Viability, Differentiation, and Gene Expression of Adipocytes. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9284.

Xia, P., Gamble, J. R., Rye, K. A., Wang, L., Hii, C. S., Cockerill, P., ... & Vadas, M. A. (1998). Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14196-14201.

Yang, M. Y., & Fortune, J. E. (2008). The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biology of reproduction*, 78(6), 1153-1161.

Yang, M. Y., & Fortune, J. E. (2015). Changes in the transcriptome of bovine ovarian cortex during follicle activation in vitro. *Physiological genomics*, 47(12), 600-611.

Yester, J. W., Tizazu, E., Harikumar, K. B., & Kordula, T. (2011). Extracellular and intracellular sphingosine-1-phosphate in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30(3-4), 577-597.

Young, J. M., & McNeilly, A. S. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, 140(4), 489.

Zeleznik, A. J. (2004). The physiology of follicle selection. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 1-7.

Zheng, S., Wei, S., Wang, X., Xu, Y., Xiao, Y., Liu, H., ... & Cheng, J. (2015). Sphingosine kinase 1 mediates neuroinflammation following cerebral ischemia. *Experimental neurology*, 272, 160-169.

Zhou, P., Baumgarten, S. C., Wu, Y., Bennett, J., Winston, N., Hirshfeld-Cytron, J., & Stocco, C. (2013). IGF-I signaling is essential for FSH stimulation of AKT and steroidogenic genes in granulosa cells. *Molecular endocrinology*, 27(3), 511-523.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00089

Matrícula: 2183801874

La esfingosina 1-fosfato (S1P) como mediador de los efectos biológicos de la hormona luteinizante (LH) en células de la teca de bovino.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 16:00 horas del día 8 del mes de febrero del año 2021 POR VÍA REMOTA ELETRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ  
DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS  
DRA. CYNDI GABRIELA HERNANDEZ CORONADO  
DRA. EDITH ARENAS RIOS

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

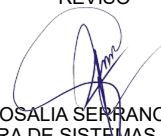
DE: ZAIRE BELEN MEDINA MOCTEZUMA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

## APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

  
ZAIRE BELEN MEDINA MOCTEZUMA  
ALUMNA

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

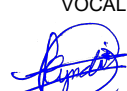
PRESIDENTE

  
DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL

  
DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO  
CASTELLANOS

VOCAL

  
DRA. CYNDI GABRIELA HERNANDEZ  
CORONADO

SECRETARIA

  
DRA. EDITH ARENAS RIOS