



Casa abierta al tiempo

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 FOLÍCULO-
ESTIMULANTE (FSH) EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE
BOVINO.**

T E S I S

Para obtener el grado de:

Maestro en Biología de la Reproducción Animal

PRESENTA:

David González Aretia

COMITÉ TUTORAL

Director:

Dra. Ana María Rosales Torres

Asesor:

Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado

Asesor:

Dra. Edith Arenas Ríos

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

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dra. Ana María Rosales Torres

Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, Departamento de producción Agrícola y animal. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

Correo: anamexico@gmail.com

ASESORES

Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado

Posdoctorado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México

Correo: cyndibash87@gmail.com

Dra. Edith Arenas Ríos

Departamento de Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Correo: editharenas2000@yahoo.com.mx

JURADO DE EXAMEN

Dra. Edith Arenas Ríos

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Correo: editharenas2000@yahoo.com.mx

Dr. Adrián Guzmán Sánchez

Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco
Correo: aguzman051181@gmail.com

Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado

Posdoctorado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad
Nacional Autónoma de México
Correo: cyndibash87@gmail.com

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Correo: mrtc@xanum.uam.mx

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioquímica de la Reproducción perteneciente al Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Este proyecto contó con el financiamiento del laboratorio antes mencionado de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrado de Excelencia del CONACYT (PNPC) Registro 003797.

Durante el trabajo realizado en el programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa recibí una beca otorgada por el CONACYT, con número de becario/CVU: 939112 durante el periodo 2018-2020.

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



PRESIDENTE

Dra. Edith Arenas Ríos



SECRETARIO

Dr. Adrián Guzmán Sánchez



VOCAL

Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado



VOCAL

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a:

A la **VIDA**.

A mi madre **Dolores González Aretia**, ella que me dio la vida y me ha dado las fuerzas y apoyo para siempre salir adelante. Por nunca dejar que me rinda a pesar de que las cosas no tengan el mejor panorama. Porque es mi mayor ejemplo de superación, perseverancia y fuerza para salir adelante, además de darme todo su amor y cariño. Sin ti nada de esto hubiera sido posible, Te amo.

Mi familia, las mejores tías que pueda tener **Lucia, Catalina, Virginia**, que nunca han dejado de confiar en mí y darme su apoyo incondicional siempre, brindándome esas ganas seguir superándome. A mi prima **Camila**, porque sé que tengo que darle el mejor ejemplo para que ella siga sus sueños y me motiva a dar lo mejor de mí. Para mi tío **Sergio** que, aunque se nos adelantó en este viaje, me enseñó a siempre afrontar la vida con una sonrisa, un beso hasta el cielo.

A mi hermano **Alan**, que siempre me ha brindado su apoyo y me ha hecho pensar que nada es imposible si te esfuerzas y a **Luz** que formo parte de todo este camino desde la niñez, gracias por todo el apoyo.

A todos y cada uno de ustedes les dedico este arduo trabajo y les agradezco por estar a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A mi **madre**.

Mi *alma máter*, la **Universidad Autónoma Metropolitana**, por ser la institución que me ha abierto sus puertas para seguir creciendo en lo personal como en lo profesional.

A la **Dra. Ana María Rosales** Torres, que me dio la oportunidad de iniciar en el ámbito de la investigación científica. Por ser un ejemplo a seguir de trabajo, esfuerzo y valores. Sobre todo, por creer en mi para formar parte de su equipo de trabajo, orientándome para lograr mis metas.

A la **Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado**, por ser parte fundamental de este trabajo y en formación académica / científica. Gracias por toda la confianza y apoyo que me has brindado y, sobre todo, gracias por todas las enseñanzas que a lo largo de estos mas de 2 años me has brindado.

A la **Dra. Edith Arenas Ríos**, por su apoyo a lo largo de la maestría, así como sus aportaciones y primordial revisión de este documento.

Al **Dr. Adrián Guzmán Sánchez**, por convertirse en ejemplo en conocimientos y forma de desenvolverse como docente. También por la ayuda en la revisión y aportes de esta tesis.

A mi amiga **Zaire**, que se ha convertido en mi mejor amiga y compañera de laboratorio. Es una persona incondicional en mi vida, acompañándome en los momentos malos y también en los buenos. Por todos esas platicas, risas, comidas y momentos dentro y fuera de la maestría, gracias por todo.

A **Jahdai** y **Lydia** por ser unos grandes amigos, confidentes y compañeros de laboratorio. Gracias por esos momentos de risas, estrés, y buenas anécdotas que me han permitido vivido a su lado.

A **Nallely**, quien compartió conmigo este camino de superación personal mutuo, de triunfos y tropiezos. Porque gracias a su apoyo incondicional y sus ánimos, lograba levantarme y seguir adelante. Gracias por tu compañía y buenos deseos siempre.

A mis amigos **José, Liliana, Noe, Michel** y **Daniel** por haber estado en mis mejores y peores momentos, darme momentos de diversión y distracción en los momentos que más lo necesitaba. Por ser mis consejeros y siempre estar a mi lado.

A mis compañeros de la maestría, con los que tuve una muy buena relación en los que compartimos alegrías y frustraciones a lo largo de nuestra preparación. Sin duda hicieron que todo este proceso fuera más fácil y ameno.

A la **Dra. María del Rosario Tarragó**, por aceptar formar parte de mi grupo de sinodales y la revisión de este trabajo. Además de su gran forma de enseñar, es una gran persona.

Al **CONACYT** por otorgarme la beca.

A todos ustedes, ¡**GRACIAS TOTALES!**

Índice General

1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	3
2.1. Desarrollo folicular.	3
2.1.1. Estructura del folículo antral.	5
2.1.2. Etapas del desarrollo en los folículos antrales.	7
2.1.2.1. Reclutamiento.	7
2.1.2.2. Selección y dominancia.	8
2.1.3. Principales moléculas que participan en el desarrollo de folículos antrales.	10
2.2. Hormona folículo estimulante.	10
2.2.1. Generalidades.	10
2.2.2. Estructura.	11
2.2.3. Síntesis.	12
2.2.4. Mecanismo de acción y señalización celular.	13
2.2.4.1. Efectos biológicos de FSH.	15
I. Proliferación.	15
II. Sobrevivencia.	17
III. Esteroidogénesis.	18
2.3. Estradiol.	20
2.3.1. Generalidades.	20
2.3.2. Mecanismo y señalización celular de E2	21
I. Sobrevivencia.	24
II. Proliferación.	25
2.4. Esfingolípidos.	26
2.4.1. Síntesis de esfingolípidos.	27
2.4.2. S1P (estructura y síntesis).	28
2.4.2.1. Mecanismo de acción y señalización celular.	31
I. Sobrevivencia.	33
II. Proliferación.	35
III. Migración.	37

IV. Esteroidogénesis.	37
V. Otros.	38
2.4.3. S1P en el desarrollo folicular.	39
3. Justificación.	43
4. Objetivo general.	44
5. Objetivos específicos.	44
6. Hipótesis	44
7. Materiales y métodos.	45
7.1. Diseño experimental.	45
7.2. Obtención de muestras biológicas (ovarios).	45
7.3. Aislamiento de CG.	45
7.4. Cultivo de CG.	47
7.5. Experimento1: La FSH estimula la síntesis de S1P en CG	48
7.5.1. Determinación de S1P por la técnica de ELISA	48
7.6. Experimento 2: Los efectos de viabilidad de FSH en CG dependen de la síntesis de S1P.	49
7.6.1. Determinación del número de CG por MTT	49
7.7. Experimento 3: Los efectos esteroidogénicos de FSH en las CG son mediados por S1P.	50
7.8. Análisis estadístico.	51
8. Resultados.	52
8.1. Experimento 1. La FSH estimula la síntesis de S1P en CG.	52
8.2. Experimento 2: La S1P actúa como mediador de los efectos de viabilidad de CG.	52

8.3. Experimento 3: Los efectos esteroideogénicos de FSH sobre las CG no son mediados por S1P.	53
9. Discusión.	54
10. Conclusión.	60
11. Bibliografía.	61

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del folículo antral ovárico.	6
Figura 2. Mecanismo de acción de la hormona folículo-estimulante (FSH).	20
Figura 3. Metabolismo de esfingolípidos. Síntesis de esfingosina 1-fostato (S1P).	28
Figura 4. Estructura de la esfingosina 1-fosfato (S1P). La S1P es formada por una cadena de esfingosina y un grupo fosfato en el carbono 1.	29
Figura 5. Síntesis y mecanismo de acción de esfingosina 1-fosfato (S1P).	39
Figura 6. Diseño experimental	45
Figura 7. Distribución de tratamientos por pozo	47
Figura 8. Distribución de tratamientos y cultivos en placa de 96 pozos.	48
Figura 9. Curva estándar de Esfingosina 1-fosfato (S1P).	49
Figura 10. Curva estándar de estradiol.	51
Figura 11. Efecto de FSH (1 ng/mL) sobre la síntesis de S1P CG de folículos de 4-7 mm de diámetro después de 48 de incubación. Se muestra el efecto de FSH sola, en combinación con un inhibidor de esfingosina cinasa 1 (SK-178-10uM) y sólo el inhibidor. a, b y c indican diferencias significativas entre tratamientos (P <0.05).	52

Figura 12. Efecto de un inhibidor de esfingosina cinasa 1 (SKI-178) sobre el número de CG de folículos de 4-7 mm de diámetro después de 48 de incubación en presencia o ausencia de 1 ng/mL de FSH. a, b y c indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

53

Figura 13. Efecto de un inhibidor de SK1 (10 μ M; SKI-178) sobre las concentraciones de estradiol (E2) en CG de folículos de 4-7 mm de diámetro después de 48 hrs de incubación en presencia y ausencia de FSH (1 ng/mL). Las literales a y b representan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

53

Abreviaturas

3 β -HSD: 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa

ABC: Transportadores de casete de unión a ATP

AC: Adenilato ciclasa

Akt: Serina-Treonina cinasa 1

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AP-1: Dominio de activación transcripcional 1

APP: Enzima de escisión de la proteína precursora amiloide

BAD: Agonista de muerte celular asociado a BCL2

Bcl-2: Células B de linfoma 2

bFGF: Factor básico de crecimiento de fibroblastos

BH3: Proteínas de dominio 3 de homología Bcl-2

Bim_{EL}: Mediador de muerte celular extra larga

BMP15: Proteína morfogénica ósea 15

Ca²⁺: Calcio

CCND2: ciclina d2

CCL5: Quimiocina ligando 5

Cdk: Cinasa dependiente de ciclina

CG: Células de la granulosa

ciAP2: Inhibidor celular de la apoptosis 2

c-myc: homólogo 3 del oncogén viral de la mielocitomatosis aviar

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc

CT: Células de la teca

CXCL-10: Proteína C-X-C motivo quimiocina 10

CYP11A1: gen P450scc

CYP19A1: gen P450arom

DAG: Diacilglicerol

E2: Estradiol

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

EPAC: Proteínas de intercambio activadas directamente por AMPc

ER: Receptor de estradiol

ERK 1 / 2: Cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2

FOXO: Caja de horquilla O

FSH: Hormona folículo estimulante

FSHR: Receptor de FSH

GALP: Péptido similar a la galanina

GDF9: Factor de diferenciación de crecimiento 9

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GnRHR: Receptor de GnRH

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

GPCR30: Receptor 1 de estrógenos acoplado a proteína G

GREL: Células epiteliales de la cresta gonadal

HDAC: Histona desacetilasa

HIF-1: Factor inducido por hipoxia-1

IGF-1: Factor de crecimiento parecido a la insulina

IGF-1R: Receptor de IGF-1

IP₃: Inositol 1,4,5 trifosfato

IRF1: Factor regulador de interferón-1

JNK: Cinasa N-terminal de Jun

JNK: Cinasas c-Jun amino terminal

Kiss-1: Kisspeptina-1

LDLR: Receptor de lipoproteína de baja densidad

LH: Hormona luteinizante

LHR: Receptor de LH

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

MEK: Cinasa ERK

MMP-9: Metaloproteinasas-matriz

mTOR: Proteína diana de rapamicina de mamíferos

NFκ-β: Factor nuclear beta

NRF-1: Factor respiratorio nuclear 1

P38 MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos p38

P4: Progesterona

P450arom: Aromatasa

P450scc: Complejo de escisión de la cadena lateral del colesterol

p70s6k: Proteína ribosómica S6 cinasa

PCAM: Molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación

PGE2: Prostaglandina E-2

PHB2: Prohibitina 2

PI3K: Fosfoinositol 3 cinasa

PINK1: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa inducida por la cinasa 1

PKA: Proteína cinasa A

PKC: Proteína cinasa C

PLC: Fosfolipasa C

POMC: Proopiomelanocortina

PPARγ: Proliferadores peroxisomales gamma

ROS: Especies reactivas de oxígeno

S1P: Esfingosina-1-fosfato

S1PR1-5: Receptor de S1P 1-5

SFF: Solución salina fisiológica

SHBG: Globulinas fijadoras de hormonas sexuales

SIRT1: Sirtuina-1

SK: Esfingosina cinasa

SK1: Esfingosina cinasa 1

SK2: Esfingosina cinasa 2

SM: Esfingomielina

Spns2: Homologo spinster 2

SR-BI: Receptor de barrido clase B tipo I

Src: Proteínas tirosina cinasa

SRF: Factor de respuesta al suero

StAR: Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

TFAM: Factor de transcripción mitocondrial A

TFBM1/TFBM2: Factores de transcripción mitocondriales b1 y b2

TRAF2: Factor 2 asociado al receptor de TNF

TSH: Tirotropina

TSPO: Proteína translocadora de 18 kDa

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

Resumen.

La hormona folículo-estimulante (FSH), es una glicoproteína que promueve el desarrollo de folículos antrales a través de la proliferación, sobrevivencia y esteroidogénesis de células de la granulosa (CG). Además, se ha demostrado que en estas células estimula la síntesis de esfingolípidos como esfingosina 1-fosfato (S1P). De manera similar a FSH, la S1P favorece la proliferación, sobrevivencia y esteroidogénesis en diversos tipos celulares. El objetivo de este trabajo fue demostrar que S1P es mediador de los efectos de viabilidad y esteroidogénesis de FSH en CG de bovino. Se cultivaron 75,000 CG de folículos entre 4-7 mm de diámetro en medio McCoy's 5A modificado (37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad) en presencia de 1ng/mL de FSH, 10µM de SKI-178 y una combinación de ambos durante 48 hrs. Se determinaron las concentraciones de S1P y estradiol en el medio de cultivo por el ensayo de ELISA. En las células se determinó mediante la técnica de MTT la viabilidad de CG en cultivo. Con la presente tesis se comprobó que FSH incrementó la síntesis de S1P ($P < 0.05$), mientras que la adición del inhibidor (SKI-178) redujo su concentración. Por otro lado, se demostró que la adición de 1 ng/mL de FSH incrementó el número de células de la granulosa viables ($P < 0.05$), en tanto que la viabilidad de estas células se redujo en combinación con SKI-178 o el inhibidor solo. Finalmente, la FSH aumentó la síntesis de estradiol en el medio de cultivo ($P < 0.05$), sin embargo, la FSH en presencia de SKI-178 y el inhibidor sólo también incrementaron su síntesis respecto al control ($P < 0.05$). En conclusión, se corrobora que FSH participa como un inductor de la síntesis de S1P en CG de bovino en cultivo a través de la activación de SK1, que este esfingolípidos es mediador de los efectos de viabilidad inducidos por FSH y que probablemente no media los efectos esteroidogénicos que ejerce FSH sobre las CG.

Palabras clave: *cultivo de células de la granulosa, S1P, FSH, Bovino.*

Abstract.

Follicle-stimulating hormone (FSH) is a glycoprotein that promotes the development of antral follicles through the proliferation, survival and steroidogenesis of granulosa cells (GC). In addition, it has been shown to stimulate the synthesis of sphingolipids such as sphingosine 1-phosphate (S1P) in these cells. Similar to FSH, S1P promotes proliferation, survival and steroidogenesis in various cell types. The objective of this work was to demonstrate that S1P mediates the viability and steroidogenesis effects of FSH in bovine GC. 75,000 GC of follicles between 4-7 mm in diameter were cultured in modified McCoy's 5A medium (37°C, 5% CO₂ and 95% humidity) in the presence of 1ng/mL FSH, 10µM SKI-178 and a combination of both for 48 hrs. S1P and estradiol concentrations in the culture medium were determined by ELISA assay. In the cells, the viability of GC in culture was determined by MTT technique. With the present thesis it was proved that FSH increased the synthesis of S1P ($P<0.05$), while the addition of the inhibitor (SKI-178) reduced its concentration. On the other hand, it was shown that the addition of 1 ng/mL FSH increased the number of viable granulosa cells ($P<0.05$), whereas the viability of these cells was reduced in combination with SKI-178 or the inhibitor alone. Finally, FSH increased estradiol synthesis in the culture medium ($P<0.05$), however, FSH in the presence of SKI-178 and inhibitor alone also increased its synthesis with respect to the control ($P<0.05$). In conclusion, it is corroborated that FSH participates as an inducer of S1P synthesis in cultured bovine GC through SK1 activation, that this sphingolipid mediates FSH-induced viability effects and that it probably does not mediate the steroidogenic effects exerted by FSH on GCs.

Key words: *granulosa cell culture, S1P, FSH, bovine.*

1. Introducción

El folículo es la estructura de mayor funcionalidad del ovario. El desarrollo de estos folículos está dividido en 2 etapas: los folículos preantrales, que es independiente de gonadotropinas, donde los folículos presentan un crecimiento lento (Magoffin, 2005) y la etapa de folículos antrales, dependiente de gonadotropinas (hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH; Andrade, et al., 2019; Rosales-Torres, et al., 2012; Wang et al., 2018), donde ocurre el crecimiento exponencial del folículo.

La FSH es una glicoproteína producida en los gonadótropos de la adenohipófisis, actúa en células de la granulosa (CG) en etapas tempranas del desarrollo folicular y hasta la selección (Aerts & Bols, 2010a). La FSH al unirse a su receptor acoplado a proteína Gs en CG, estimula la activación de la proteína cinasa A (PKA) y con ello la activación de diversas vías de señalización (Prieto & Velazquez, 2003). Sin embargo, se ha observado recientemente que el receptor de FSH tiene tendencia a la promiscuidad hacia otras proteínas G como los son Gq y Gi (Liu et al., 2015; Gorga et al., 2018). Dentro de los principales efectos que desencadena FSH en CG se encuentran la proliferación, sobrevivencia y síntesis de hormonas esteroideas (Hunzicker-Dunn et al., 2012). Además de las gonadotropinas, otras hormonas y factores de crecimiento, los esfingolípidos han emergido como moléculas señalizadoras durante el desarrollo de folículos antrales (Hernandez-Coronado et al., 2015, 2016).

La esfingosina-1-fosfato (S1P) es un esfingolípido bioactivo sintetizado a partir de esfingolípidos complejos como la ceramida y esfingosina, participa como segundo mensajero estimulando principalmente la proliferación, sobrevivencia y migración en muchos tipos celulares (Bartke & Hannun, 2009; Daum, et al., 2009; Mendelson, et al., 2014). Además, la S1P en células adrenales y ováricas estimula la expresión de ARNm de enzimas esteroideogénicas por lo que probablemente actúa como mediador en la esteroideogénesis (Maceyka, et al., 2002). La S1P tiene un efecto dual a nivel celular. Diversos estímulos tales como factores de crecimiento,

vitaminas, esteroides, hormonas, la propia S1P entre otros, al unirse con su receptor activan a la esfingosina cinasa 1 (SK1) quien se encarga de convertir esfingosina en S1P. La acción intracelular de S1P genera la activación de vías de señalización relacionadas con la proliferación, sobrevivencia y migración (Shu et al., 2002; Liu et al., 2015) . Interessantemente, la S1P puede salir de la célula a través de transportadores específicos y unirse a uno de sus 5 receptores acoplados a proteína G localizados en su célula blanco desencadenando señalizaciones río abajo (Pyne & Pyne, 2010; Dai et al., 2014).

Resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación han demostrado la participación de S1P en células foliculares. La concentración de S1P fue mayor en CG y teca de folículos dominantes sanos comparado con folículos atresicos, por lo que la síntesis de S1P está asociada a la salud folicular (Hernández-Coronado et al., 2015). En CG en cultivo se encontró que la adición de 1 ng/mL de FSH estimula la producción de S1P gracias a la activación de SK1, mientras que el uso de un inhibidor de esta enzima (SKI-178), en presencia de la FSH redujo la síntesis de S1P y con ello la proliferación de estas células (Hernandez-Coronado et al., 2016). Adicionalmente, el uso de dosis bajas de S1P (0.1 μ M) favorece la proliferación de CG en cultivo (Hernandez-Coronado et al., 2016).

Hasta el momento se conoce que FSH estimula la síntesis de S1P en CG y que este esfingolípido participa en la proliferación de estas células. Sin embargo, no se conoce si la síntesis de este esfingolípido en respuesta a FSH es esencial para mediar sus efectos biológicos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue: Demostrar que S1P es el mediador de los efectos de viabilidad y esteroidogénesis de la FSH en CG de bovino.

2. Antecedentes

2.1. Desarrollo folicular

El desarrollo folicular comienza desde la vida embrionaria de la hembra, junto con la formación del ovario, el cual se presenta primero como un engrosamiento del epitelio celómico del mesonefros (riñón fetal transitorio) aproximadamente el día 30 de la vida gestacional en bovinos, las células que componen esta estructura presentan un cambio de fenotipo a una población de células epiteliales de la cresta gonadal o células GREL (Hummitzsch, et al., 2019). Por su parte las células germinales primordiales (CGP) migran al primordio ovárico en donde el estroma del mesonefros comienza a penetrarlo por la proliferación de células GREL, dando como resultado la división del ovario en cordones ovígeros compuestos por células GREL y CGP (Leung & Adashi, 2018).

Los cordones ovígeros están separados por una lámina basal, el estroma se expande debajo de las células GREL formando una lámina basal subepitelial para posteriormente formarse un epitelio superficial maduro a partir de estas células en la superficie del primordio del ovario. Los cordones ovígeros se dividen en fragmentos más pequeños de grupos de células por la continua expansión del estroma para la formación final de los folículos. Estos están formados por un ovocito rodeado de células GREL las cuales sufren un proceso de diferenciación para convertirse finalmente en células de la granulosa (CG) rodeadas por una lámina basal que genera un folículo primordial localizados en la corteza-médula interna del ovario (Hummitzsch et al., 2019; Smith et al., 2014).

Las hembras de los mamíferos antes de su nacimiento cuentan con un gran número de ovocitos que van desde los 6,000,000 en humanos y 2,700,000 en bovinos (Clarke, 2018). Sin embargo, al nacimiento este número se reduce de manera exponencial quedando aproximadamente de 1 a 2 millones en humanos y de 68,000 a un máximo de 150,000 células germinales en bovinos, teniendo al tercer mes 75,000 y del año y medio al tercero solo quedan 75,000 ovocitos primarios (Galina & Valencia, 2008; Clarke, 2018). Cada ovocito se encuentra rodeado por un

pequeño número de células aplanadas de la granulosa conformando al folículo primordial. Este folículo se encuentra detenido en la etapa de profase del diploteno de la división meiótica al momento del nacimiento (Jaffe & Egbert, 2017).

Los folículos son considerados como la estructura de mayor funcionalidad del ovario (Magoffin, 2005) y durante su desarrollo continuo presentan dos principales fases: la primera fase es la de folículos preantrales, es independiente de gonadotropinas y dependiente de factores de crecimiento de la familia del factor transformante β dentro de los cuales se incluyen al factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF9) y la proteína morfogénica ósea 15 (BMP15), además del factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF). Estos factores son principalmente secretados por el ovocito y dentro de esta fase se incluyen a los folículos primordiales, primarios y secundarios (Aerts & Bols, 2010a; Andrade et al., 2019). Esta fase se considera una fase lenta que va desde la adquisición del antro, ocurre cuando el folículo alcanza un tamaño de 400 μm en cerdos, 120-160 μm en bovinos y 220 μm en ovejas hasta la formación de un folículo antral pequeño, caracterizado por tener una cavidad llena de líquido, lo que dictará el inicio de la segunda fase de desarrollo folicular. Cuanto más progrese este desarrollo y se conviertan en folículos antrales, mayor será su dependencia a las gonadotropinas (Vásquez-Cano & Olivera, 2010).

La segunda fase consiste en un crecimiento exponencial que se caracteriza por la proliferación y sobrevivencia de las CG (D. Wang et al., 2018). Estos folículos se desarrollan en ondas foliculares las cuales abarcan desde el reclutamiento de una cohorte de folículos antrales pequeños hasta las etapas de selección y dominancia de un folículo que dependiendo de las condiciones hormonales existentes en el ovario pueda llegar o no a la ovulación (Mihm & Bleach, 2003; Edson et al., 2009; Rodgers & Irving-Rodgers, 2010).

Es importante destacar que aunque el destino del folículo antral puede ser la ovulación este es un evento que tanto en el humano como en la mayoría de las especies ocurre en una pequeña proporción (1%), por lo que cerca del 99% de la población general folicular es perdido por un proceso degenerativo, paulatino e irreversible conocido como atresia folicular (Hannon et al., 2015).

2.1.1. Estructura del folículo antral

El folículo ovárico está compuesto por distintas capas de células de soporte que resguardan dentro a la célula germinal. En folículos antrales podemos encontrar dos poblaciones celulares similares, las CG murales y las CG del cúmulo que rodean al ovocito (Clarke, 2018). La región avascular del folículo está compuesta por CG murales, las cuales son ricas en aparato de Golgi, retículo endoplasmático rugoso y liso, así como vesículas pequeñas, mitocondrias redondas alargadas y gotas lipídicas. Estas son similares a las células del cumulo en cuanto a organización estructural se refiere y diferentes de las primeras CG aplanadas que componen al folículo primordial debido a que presentan funciones metabólicas específicas al desarrollar los mecanismos necesarios para la síntesis de hormonas esteroideas (Li & Chian, 2017).

Las CG se encuentran en la luz del folículo al rodear la región compuesta de líquido folicular que forma el antro (Paulini et al., 2014). Como ya se ha venido mencionando, el folículo alberga a la célula germinal de la hembra “el ovocito” quien se encuentra rodeado por las CG de cumulo. que forman un complejo llamado cumulo-ovocito o *cumulus oophorus* (Rangel & Hernandez, 2018). Se encuentran en la parte central de folículo ya sea junto a la pared del folículo o unido a él por un "tallo" de CG o cumulo (Rybska et al., 2018). Las células del cumulo forman un epitelio pseudoestratificado con las células de la primera, segunda y tercera capa, extendiéndose hasta la capa extracelular del ovocito, la zona pelúcida (Jaffe & Egbert, 2017).

En la región más externa del folículo, es decir más alejada de la luz folicular, se encuentran capas de células llamadas células de la teca (CT), este tipo celular se encuentra separado de las CG por una lámina basal que se compone principalmente por fibras de colágeno, elastina, reticulina y fibronectina (Paulini et al., 2014). Las CT se encuentran embebidas en el estroma interfolicular y están estrechamente asociadas con la lámina basal (Young & McNeilly, 2010). Las CT se dividen en una porción de capas celulares externa y otra interna, la capa interna son células alargadas con aproximadamente 3 a 5 capas de espesor. Las CT interna, se

encuentran conformando un tipo de sostén, el cual se caracteriza por la presencia de vasos sanguíneos. La disposición de las CT y su proximidad con los vasos sanguíneos y por ende con la disponibilidad de nutrientes provenientes de la sangre es lo que las asocia con la vascularización y por lo tanto les permite tener una gran capacidad esteroidogénica (Magoffin, 2005). En contraste la CT externa es una banda poco organizada de células que contienen fibras de tejido contráctil formadas por células mioideas que desempeñan un rol de contracción durante la ovulación (Freeman, 1994). Es una estructura importante del folículo ya que sin ella no se podrían llevar a cabo procesos fisiológicos importantes de la reproducción de la hembra como lo es el desarrollo folicular y la ovulación (Young & McNeilly, 2010).

Otro componente característico de los folículos antrales es el líquido folicular, contiene metabolitos que podrían ser críticos para el crecimiento y desarrollo del ovocito (Karaer et al., 2019). Su composición puede depender de la etapa en que se encuentre el folículo y por lo tanto de su tamaño y estructura, sin embargo, generalmente se compone por iones, proteínas, metabolitos, hormonas, factores de crecimiento, lípidos, sustratos energéticos y especies reactivas de oxígeno. Estos componentes son derivados de la extravasación de los capilares sanguíneos y productos de las células foliculares (Karaer et al., 2019).

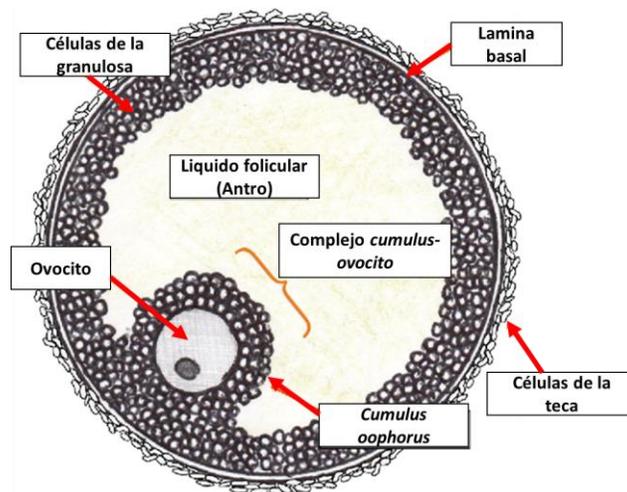


Figura 1. Estructura del folículo antral ovárico. Tomado y modificado de Hennet & Combelles (2012).

2.1.2. Etapas del desarrollo en los folículos antrales

El desarrollo folicular es considerado un proceso que implica un crecimiento continuo y una regresión de folículos antrales que en conjunto conducen a una posible ovulación (Azawi et al., 2009). En la mayoría de las especies de animales domésticos y en humanos el desarrollo folicular durante el ciclo estral y menstrual respectivamente, ocurre en un patrón de ondas u olas (González-Bulnes, et al., 2002; Filipiak, Viqueira, & Bielli, 2016). Los bovinos pueden presentar entre 2 a 3 ondas de desarrollo folicular por ciclo estral (Azawi et al., 2009; Imron, et al., 2016). La primera ola de crecimiento emerge aproximadamente en el día 1 post ovulación, mientras que la segunda ola ocurre entre el día 9-10 en ciclos estrales con dos ondas, en tanto, en ciclos de 3 ondas, en los días 8-9 emerge la segunda y la tercera, en el día 15 o 16 (Aerts & Bols, 2010b). Este desarrollo folicular se ve dividido en tres fases: reclutamiento, selección y dominancia, aunque algunos autores consideran a la selección y dominancia como un solo evento durante el desarrollo (Williams & de la Sota, 2017; Webb, et al., 2020).

2.1.2.1. Reclutamiento

El concepto de reclutamiento se refiere al ingreso de una cohorte de folículos antrales pequeños a una onda de desarrollo (Kanitz, 2003).

Cada onda folicular inicia con el reclutamiento de 5 a 10 aunque se han reportado hasta 24 folículos antrales pequeños con un diámetro de 4 a 5 mm. Para que un folículo forme parte de esta cohorte debe contar con los receptores en CG para FSH (Ginther, 2016). Para que ocurra esta etapa, el animal presenta en la circulación periférica una elevación transitoria de FSH y que aquellos folículos que respondan a esta hormona sean reclutados y esto favorezca en CG la proliferación, sobrevivencia y por lo tanto un crecimiento folicular rápido (Valdez-Morales et al., 2014). Además la FSH es capaz de estimular la síntesis de hormonas esteroides como el estradiol (E2) por medio de la activación de enzimas tales como 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (3β -HSD) para la conversión a P4, así como la enzima aromatasa (P450arom) necesaria para la transformación de los andrógenos procedentes de las CT en estrógenos (Reyes et al., 2010). La presencia de estos

complejos se presenta en mayor medida en folículos reclutados, lo que indica que la capacidad de un folículo para producir estrógenos determina su capacidad para responder a la elevación transitoria de FSH (Montaño & Ruiz Cortés, 2005; Sacchi et al., 2016). La LH también tiene participación durante el reclutamiento de los folículos antrales pequeños, estimula la sobrevivencia de las CG y la expresión del ARNm de los receptores a LH en CT para favorecer la producción de andrógenos. Los andrógenos producidos en CT son fundamentales para la síntesis de E2 en CG, por lo que durante el reclutamiento y previo a la etapa de selección, actúan como un mediador de los efectos de LH en CG (Gomez-León et al., 2020). Esta fase de desarrollo culmina cuando alguno de los folículos haya sido seleccionado y se convierta en dominante, esto sucede en bovinos cuando el folículo alcanzó un diámetro de 8 a 8.5 mm (Ginther, 2016; Victor E Gomez-León et al., 2020).

2.1.2.2. Selección y dominancia

Durante cada onda de crecimiento, los folículos reclutados se someten a un proceso de selección donde sólo un folículo será elegido para continuar con su desarrollo (H. Li & Chian, 2017).

En especies monotocas como el bovino, esta etapa del desarrollo es considerada como un mecanismo evolutivamente conservado para el control del número de crías por gestación, con la finalidad de que ocurra una posible ovulación y con ello escapar de un posible proceso de atresia (Son et al., 2011). Esta etapa se inicia aproximadamente 3 días después del reclutamiento cuando el folículo alcanza un diámetro de 8.5 mm y se elige al folículo dominante quien se desarrollará a una tasa constante en un ambiente endocrino reducido en FSH con lo cual suprimirá el crecimiento de los folículos reclutados que no fueron seleccionados (subordinados; Aerts & Bols, 2010a). El folículo produce inhibina y E2 en respuesta a FSH, inhibina es una hormona gonadal que actúa sobre las células gonadotropas de la hipófisis para inhibir la síntesis y secreción de FSH (Li et al., 2018), por otro lado el E2 al aumentar su concentración tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre FSH al mismo nivel que la inhibina (Moore et al., 2013). Esta disminución de las concentraciones de la FSH conlleva a que los folículos subordinados entren en un

proceso de atresia (Navakanitworakul et al., 2016). El folículo seleccionado como dominante posee una maquinaria molecular más completa caracterizada por la expresión de enzimas participantes en la esteroidogénesis por lo que le permite al folículo producir grandes cantidades de E2 (Andersen, et al., 2011).

También se ha observado que en CG de folículos seleccionados como dominantes existe una mayor expresión de receptores para la hormona LH lo que refiere el cambio de dependencia hormonal de las CG (Rosales-Torres et al., 2012), este cambio de dependencia es la razón por la que el folículo dominante puede continuar su crecimiento a pesar de la disminución de FSH. Así mismo, un aumento en la síntesis de E2 es necesario para la proliferación celular e inducir vía retroalimentación positiva sobre hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) un incremento en la síntesis de LH y desencadenar el pico preovulatorio para una posible ovulación (Ptaszynska, 2008; Ciesiółka et al., 2017; Rangel & Hernandez, 2018).

Finalmente, el folículo dominante, una vez que ha alcanzado su máximo crecimiento y en ausencia de un cuerpo lúteo el folículo podrá llegar a la ovulación. Sin embargo, ante la presencia de un cuerpo lúteo, el folículo dominante sufrirá atresia debido a las altas concentraciones de progesterona (P4) que impiden la producción de un pico preovulatorio de LH (Espinoza-Villavicencio, et al., 2007). La LH es capaz de desencadenar la sobrevivencia y proliferación en CT y CG aunque en esta fase se presenta con mayor lentitud (Landry & Sirard, 2018). Antes de la ovulación del folículo dominante, el crecimiento exponencial se reduce por efecto de una disminución en la división celular y por consecuencia un aumento más lento en el diámetro folicular. Esto sucede después del aumento del pico preovulatorio de LH donde inician los cambios morfológicos, endocrinos y bioquímicos asociados al proceso de luteinización (Andrade et al., 2019).

2.1.3. Principales moléculas que participan en el desarrollo de los folículos antrales

La regulación endocrina del desarrollo folicular destaca la participación de las gonadotropinas FSH y LH, sin embargo, otras hormonas y factores de crecimiento producidos localmente, contribuyen de manera significativa en la regulación de este proceso fisiológico (Rangel & Hernandez, 2018). Dentro de estas moléculas encontramos a las hormonas esteroides como el E2 y la P4, hormonas peptídicas como la inhibina y la activina, el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y más recientemente los esfingolípidos como esfingosina 1-fosfato (S1P) entre otros (Beg & Ginther, 2006; V. Gomez-León et al., 2019). En seguida se describen las moléculas más sobresalientes en el desarrollo de los folículos antrales.

2.2. Hormona folículo-estimulante (FSH)

2.2.1. Generalidades

La FSH es una proteína unida a moléculas de carbohidratos perteneciente a la familia de las glicoproteínas adenohipofisarias, que incluye a otras hormonas como LH y a la hormona estimulante de la tiroides (TSH; Wide & Eriksson, 2017). FSH comparte características similares con LH y TSH, ya que están conformadas por dos subunidades, una idéntica que comparten y otra específica y característica de cada hormona (Bargi-Souza et al., 2015). Los carbohidratos unidos por enlaces disulfuro a la FSH varían dependiendo de la edad, época del año o estado fisiológicos del animal, estos son capaces de modificar su vida media o su actividad biológica (Meher et al., 2015). FSH es una molécula hidrosoluble incapaz de pasar a través de la membrana plasmática de las células por lo que cuenta con un receptor acoplado a proteína G (GPCR) en la membrana y requiere un segundo mensajero dentro de la célula para llevar a cabo sus funciones biológicas (Rangel & Hernandez, 2018). En la hembra, es capaz de estimular eventos celulares como el desarrollo de los folículos antrales y también tiene la capacidad de controlar y regular el crecimiento de los folículos preantrales (Cocco et al., 2014). Por otra parte, en el

macho, la FSH actúa en células de Sertoli de los túbulos seminíferos del testículo, para regular procesos fisiológicos como la espermatogénesis y la proliferación (Gorga et al., 2018).

2.2.2. Estructura

La FSH, es una glicoproteína heterodimérica compuesta por dos subunidades, α y β (Sevilhano et al., 2017), cada subunidad de forma individual no es capaz de interactuar ni activar los receptores por lo que es necesaria su asociación en una estructura dimérica para exhibir y desencadenar su actividad biológica (Padmanabhan & Cardoso, 2020). La subunidad α contiene 92 aminoácidos y se considera común para otras dos glicoproteínas (LH y TSH), esta es importante para la transducción de señales, el plegamiento de proteínas y la estabilización del dímero (Smitz et al., 2015). Por su parte la subunidad β con 111 aminoácidos es específica para la hormona pues influye en la secreción, emparejamiento de enlaces disulfuro y es la responsable de provocar un respuesta biológica específica (Leão & Esteves, 2014; Bousfield et al., 2018). Después de que se forma la estructura dimérica y antes de que sea liberada a la circulación se añaden oligosacáridos a los sitios de glicosilación de cada subunidad, dos sitios se encuentran en la subunidad α y dos en la subunidad β . Por uniones covalentes se adhieren los carbohidratos como parte integral de la estructura de la hormona dentro de los cuales podemos destacar a la fructuosa, manosa, galactosa, acetilglucosamina y la N-acetilneuramidasa, así como ácido siálico (Palermo, 2007; Campo et al., 2019; Padmanabhan & Cardoso, 2020). Su vida media es relativamente larga con una duración de aproximadamente 3 a 4 horas, su metabolismo en hígado es un poco más lento (Leão & Esteves, 2014). Los cambios que sufre la FSH al adicionar estructuras de oligosacáridos a sus sitios de unión ocurren como resultado de una modificación postraducciona que es llevado a cabo por estímulos de la GnRH e inicia en el retículo endoplasmático rugoso y termina en el aparato de Golgi (Smitz et al., 2015).

2.2.3. Síntesis

La FSH es sintetizada por células especializadas llamadas gonadotropos que se localizan en la hipófisis anterior o también llamada adenohipófisis, representando un 5-6% de todas las células que la conforman (Cao et al., 2018). La síntesis de gonadotropinas hipofisiarias está controlada por el decapeptido GnRH producido en el hipotálamo por neuronas principalmente del área preóptica (Glanowska & Moenter, 2015). La síntesis de GnRH se lleva a cabo en el área preóptica por estímulo de ciertos neuropéptidos como kisspeptina-1 (Kiss-1), proopiomelanocortina (POMC) y el péptido similar a la galanina (GALP), quienes provocan su liberación de manera pulsátil sobre la eminencia media y es a través del sistema porta-hipofisiario quien perfunde sus capilares sobre la hipófisis anterior que GnRH llega a los gonadotropos (Guzmán et al., 2017).

La GnRH se une en los gonadotropos a su GPCR de tipo Gq, se caracteriza por la presencia de un extremo amino terminal, la existencia de siete dominios transmembranales unidos por asas tanto extra (1, 2 y 3) como intracelulares (1, 2 y 3) y un dominio carboxilo terminal que interactúa principalmente con una proteína G (Flanagan & Manilall, 2017; Stamatiades & Kaiser, 2018). La proteína G está compuesta de tres subunidades: α , β y γ , la subunidad α recluta a una molécula de GDP en su forma inactiva y un GTP al activarse lo que ocasiona un desacoplamiento de la subunidad α de las otras dos, esta acción desencadena la activación de diferentes vías de señalización (Guzmán et al., 2017). Se han reportado 2 tipos de receptores para GnRH (GnRHR), el tipo I predomina en mamíferos como ratas, ovejas, vacas y cerdos, mientras que el tipo II es funcional en perros, monos y cerdos (Stamatiades & Kaiser, 2018). Estos receptores son considerados de la familia Gq, por lo que una vez que se une GnRH con su receptor, la disociación de la subunidad α de la proteína G activa a la enzima membranal fosfolipasa C que hidroliza fosfoinositoles (fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato) de la membrana plasmática para la formación de IP₃ (inositol 1,4,5 trifosfato) y diacilglicerol (Ciani et al., 2020). Por un lado, la acción del IP₃ se centra sobre su receptor de canales de Ca²⁺ ubicados en el retículo endoplasmático liso para la movilización de moléculas de

Ca^{2+} . El Ca^{2+} se une a una enzima proteína cinasa C (PKC), este complejo migra a la membrana donde interactúa con el diacilglicerol para finalmente ser activada.

Además, el Ca^{2+} inicia la secreción de FSH y LH debido a que regula a las proteínas sinaptogaminas, fundamentales para el proceso de exocitosis (Zurita, 2015). Por su parte, la PKC una vez activa, se libera de la membrana y se encarga de activar factores de transcripción de FSH β como a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) y Fos/Jun para incrementar la síntesis de FSH (Bliss et al., 2010; Voliotis et al., 2018). Otro factor que influye en la síntesis y secreción es la pulsatilidad de GnRH, aunque FSH y LH se producen en la misma célula, sus concentraciones y más específicamente su secreción son diferentes durante el ciclo estral, esto porque a diferencia de la LH, las frecuencias de pulsos lentos (<1 pulso por 2-3 horas) favorecen la síntesis de FSH (Tsutsumi & Webster, 2009; Das & Kumar, 2018; Stamatiades & Kaiser, 2018).

2.2.4. Mecanismo de acción y señalización celular

La FSH al ser excitada alcanza la circulación sistémica vía endocrina y se encuentra con su receptor de membrana localizado en CG en la hembra y en células de Sertoli en el macho (Ulloa-Aguirre et al., 2018). El receptor clásico de FSH (FSHR) es un GPCR de tipo Gs, tiene una masa de 78,265 Da, pertenece a la familia de los receptores rodopsina y consta de un total de 695 aminoácidos. Está situado en el cromosoma 2 p21-p16, cuenta con 10 exones de los cuales los primeros 9 codifican para la región extracelular de la porción amino-terminal mientras que el exón 9 se encarga de los dominios transmembrana y las asas intracelulares (Tsutsumi & Webster, 2009; Anderson et al., 2019; Schubert et al., 2019). La FSH al unirse con su receptor interactúa con las asas extracelulares 1 y 3, esto genera un cambio conformacional de los dominios transmembranales 5 y 6 del receptor, con lo que se genera la disociación de la subunidad G α de las subunidades G $\beta\gamma$ que forman a la proteína G (Neganova et al., 2019; Schubert et al., 2019). Una vez que la subunidad α se disocia, esta tiene la tarea de activar a la enzima ubicada en la membrana plasmática adenilato ciclasa para estimular la síntesis intracelular de AMPc (adenosín monofosfato cíclico; Matvere et al., 2019). La formación de AMPc

activa a la enzima proteína quinasa A (PKA) compuesta por 4 subunidades, 2 subunidades catalíticas y 2 subunidades reguladoras donde tiene lugar la unión de las moléculas de AMPc para disociar las subunidades catalíticas responsables de la fosforilación de otras moléculas y por lo tanto la activación de diversas vías de señalización (Götz et al., 2016; Casarini & Crépieux, 2019).

La FSH no solo interactúa con un solo tipo de GPCR, a través de receptores no clásicos, acoplados a proteína Gi y Gq desencadena diferentes vías de señalización para llevar a cabo su función biológica (Swanson & R Beasley, 2010). El FSHR tiene tendencia a la promiscuidad con otras proteínas G debido a variantes en el estado fisiológico en el que la célula se encuentre, así como modificaciones postraduccionales, por ejemplo, se ha demostrado en cultivos de células CHO y cultivos primarios de CG que el receptor interactúa con la proteína Gi al unirse a una variante glicosilada específica de FSH cuando se encuentra en altas concentraciones, como un mecanismo de regulación de la señalización celular (Arey & López, 2011). Por otra parte, se sabe que cuando existen concentraciones suprafisiológicas, >200 ng / ml en sangre, el FSHR es capaz de cambiar la unión clásica a Gs y unirse a la proteína Gq, este cambio genera una señalización basada en la activación de la vía mediada por IP₃/PKC (Ulloa-Aguirre et al., 2018). También se ha asociado una señalización que depende de las subunidades βγ de la proteína G, las cuales son disociadas tras la unión de FSH a su receptor. Independientemente de las vías activadas por la subunidad α, las subunidades βγ son capaces de la activación de vías encaminadas a la proliferación y supervivencia en las células (Casarini & Crépieux, 2019).

Existen receptores que no son acoplados a proteína G que pueden servir como socios funcionales del FSHR. Estos son los receptores tipo tirosina cinasa del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1R) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El IGF-1R y FSHR una vez que fueron activados por sus respectivos ligandos pueden actuar de manera sinérgica en favor de la esteroidogénesis, la expresión del receptor de la hormona luteinizante (LHR) e inhibina y la proliferación celular (Zhou et al., 2013; Ulloa-Aguirre et al., 2018). Esto

se logra debido a que la señalización mediada por estos dos receptores tiene un punto de convergencia en las cascadas de señalización principalmente en la vía fosfoinositol 3 cinasa/ Serina-Treonina cinasa 1 (PI3K/Akt). Esta misma vía es utilizada por el EGFR, puede ser transactivado por vías mediadas por FSHR y con esto regular las vías de la cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2), PI3K y Akt/PKB (Rouigny et al., 2018).

2.2.4.1. Efectos biológicos de FSH

La unión de FSH a su receptor es capaz de desencadenar una serie de vías de señalización. La FSH cumple como principal función la regulación de procesos fisiológicos relacionados con la vida reproductiva de la hembra (Rangel & Hernandez, 2018). Dentro de sus principales efectos biológicos destacan la sobrevivencia, esteroidogénesis y proliferación (Hunzicker-Dunn et al., 2012). La FSH es un factor endocrino que regula además del crecimiento, la sobrevivencia de los folículos gracias a que modula la expresión de factores anti y proapoptóticos en CG (Matsuda et al., 2012; Baumgarten et al., 2017). Por otro lado, FSH en CG participa en la producción de estrógenos a partir de la síntesis de andrógenos procedentes de las CT (Guzmán et al., 2017).

I. Proliferación

La unión de FSH con su GPCR tipo Gs en CG, desencadena la síntesis de AMPc y con ello la activación de PKA. La PKA activa la vía ERK 1 / 2, estas moléculas fosforilan factores de transcripción como el factor de respuesta al suero (SRF), c-jun, CREB y homólogo 3 del oncogén viral de la mielocitomatosis aviar (c-myc) para mediar la síntesis del ARNm de cinasas dependientes de ciclinas en el ciclo celular y regular la replicación del ADN (Hunzicker-Dunn & Maizels, 2006). La PKA también puede translocar la subunidad catalítica al núcleo para promover la remodelación de la cromatina a través de la fosforilación de la histona H3 durante la mitosis celular (Casarini & Crépieux, 2019). Por otro lado, el aumento en las concentraciones de AMPc es capaz de activar a las proteínas de intercambio activadas directamente por AMPc (EPAC) y con ello la vía AKT (Ulloa-Aguirre et al., 2018). Esta vía activa a las proteínas diana de rapamicina de mamíferos (mTOR) para incrementar la

actividad de la proteína ribosómica S6 cinasa (p70s6k) que conduce a una mayor expresión del ARNm de la ciclina D2 necesaria para la transición de la etapa G1/S del ciclo celular (Manning & Toker, 2017). Lo descrito anteriormente es la vía de señalización clásica y algunas de sus variantes, pero existen señalizaciones dependientes de otras proteínas G (Casarini & Crépieux, 2019).

La FSH se puede unir a GPCR tipo Gq donde la disociación de la subunidad α activa a una fosfolipasa C y subsecuentemente a la PKC (Castilho et al., 2014). La activación de la PKC es capaz de mediar efectos proliferativos de manera similar que PKA, ya que la vía ERK 1/ 2 que activa a los factores de transcripción está regulada por PKC y además es regulada por el aumento de calcio intracelular producido por la unión del IP₃ al retículo endoplasmático (Cassier et al., 2017). Finalmente, la FSH también puede unirse a un GPCR de tipo Gi quien funciona como inhibidor de la cascada de señalización de la proteína Gs sin embargo, la disociación de Gi $\beta\gamma$ estimula una vía de señalización alterna a través de la activación de una PKC, esta es la vía PI3K/AKT, modula las funciones proliferativas a través de la proteína mTOR y de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK; Casarini & Crépieux, 2019).

En CG de ratones hembras se ha observado que la adición de 10 y 100 ng/mL de FSH, a través de las vías PKA o PKC estimula la proliferación celular disminuyendo la expresión de miR-143 un regulador negativo de la expresión de genes relacionados con el ciclo celular como las ciclinas B1, B2 y de cinasas dependientes de ciclina (cdk) 4 y 6 (L. Zhang et al., 2017). Por otro lado, Baddela et al (2020) demostraron que en dosis de 20 ng/mL de FSH en cultivos de CG de bovinos, se indujo la síntesis del factor inducido por hipoxia-1 (HIF-1) en condiciones de normoxia e hipoxia, molécula capaz de regular la expresión de genes como ciclina d2 (CCND2) y del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA).

Adicionalmente, en CG de ratas estimuladas con 100 ng/mL de FSH se observó un aumento en la síntesis de ADN, la progresión celular y número de células a través de la activación de las vías PKA y PI3K que regulan positivamente la expresión de ARNm de CCND2 (Han et al., 2013). Además, FSH estimula efectos proliferativos

en células de Sertoli de ratas en dosis de 100 ng/mL activando las vías de señalización PI3K/Akt y mTOR favoreciendo la actividad mitótica de las células (Riera et al., 2012).

II. Sobrevivencia

La FSH activa vías de señalización para favorecer la supervivencia de las CG, principalmente por la señal de AKT. La señalización clásica de FSH por PKA es capaz de inducir la activación directamente de la vía PI3K/AKT, sin embargo, también a través del aumento del AMPc, este activa a las proteínas EPAC que están relacionadas con la regulación de la fosforilación y activación de AKT (Ulloa-Aguirre et al., 2018). La activación de AKT ya sea por la PKA, EPAC u otras vías, regulan de manera negativa la función o expresión del ARNm de proteínas de dominio 3 de homología Bcl-2 (BH3) que inactivan a miembros de la familia de células B de linfoma 2 (Bcl-2) antiapoptóticos, es decir, AKT puede inhibir la activación de la proteína agonista de muerte celular asociado a BCL2 (BAD) y la expresión del ARNm a través de los factores de transcripción Caja de horquilla O (FOXO) y p53 (Manning & Cantley, 2007; Shen et al., 2016). Pero no solo la unión a la proteína Gs puede desencadenar esta señalización, puede ocurrir de manera independiente a la vía de PKA, es decir, las Gs $\beta\gamma$ activan la vía PI3K/AKT para favorecer la supervivencia celular (Shen et al., 2017; Casarini & Crépieux, 2019). La FSH a través de PKA activa a las proteínas cinasas activadas por mitógenos p38 (p38 MAPK) quien tiene la capacidad de desencadenar un mecanismo molecular de apoptosis en células esteroideogénicas junto con la cinasa N-terminal de Jun (JNK; Inagaki et al., 2009). Este efecto es contrarrestado por la acción antiapoptótica de las MAP cinasas y ERK 1 / 2. Finalmente, la sobreexpresión del ARNm del FSHR pueden inducir de manera positiva la expresión de genes apoptóticos en comparación con células que presentan niveles basales como un mecanismo de autorregulación celular (Casarini & Crépieux, 2019).

Stilley et al (2014) detectaron en células endoteliales de la vena umbilical humana que fueron cultivadas con una cantidad reducida de suero para estimular la apoptosis, que la adición de 600 ng/mL de FSH redujeron significativamente el

número de células apoptóticas al activar la ruta de señalización PI3K/Akt. En cultivos primarios de células de la granulosa de porcino, FSH (0.01 UI/mL) desencadenó las vías de señalización PI3K/Akt para reducir la acumulación nuclear de la proteína FoxO3a y con ello disminuir la expresión del mediador de muerte celular extra larga (BimEL) para prevenir la apoptosis celular (Wang et al., 2012).

Por otra parte, se ha observado también la preservación de la viabilidad de CG de porcinos en un ambiente hipóxico, estimulados con 2 UI/mL de FSH mediante la mitofagia de las células al estimular la expresión de HIF-1 α , fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa inducida por la cinasa 1 (PINK1) y la proteína parkina (C. Li et al., 2020).

III. Esteroidogénesis

La FSH tiene la capacidad de estimular la formación de estrógenos a partir de andrógenos procedentes de las CT (Zhou et al., 2013). La FSH a través de PKA estimula la activación de la proteína CREB para por un lado estimular la síntesis del ARNm de enzimas esteroidogénicas como P450scc expresada en el gen CYP11A1 y P450arom del gen CYP19A1 (Vanselow & Fürbass, 2018; Casarini & Crépieux, 2019). Por otro lado, la PKA activa directamente a las enzimas que participan en la esteroidogénesis. Este proceso implica la activación de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) que participa en la translocación del colesterol endocitado hacia la mitocondria (Hu et al., 2010). En la mitocondria, el colesterol es convertido a pregnenolona por acción del complejo enzimático P450scc (20-22 liasa y 17 α -hidroxilasa) con lo cual el colesterol pierde 6 carbonos dando lugar a una molécula de 21 carbonos que saldrá de la mitocondria para continuar con el proceso de esteroidogénesis (Gómez-Chang et al., 2012). La pregnenolona entra al retículo endoplasmático en donde es transformada en P4 por la acción de dos enzimas; 3 β -HSD y Δ 4- Δ 5 isomerasa las cuales se encargan de la eliminación de una molécula de hidrogeno en el carbono 3 y el cambio del doble enlace (Zhu et al., 2019). Para la formación de los andrógenos al ser moléculas de 19 carbonos, la P4 deberá perder 2 átomos de carbono mediante el complejo enzimático p450c17 (17 α -hidroxilasa y 17,20 liasa), sin embargo, este paso se lleva a cabo únicamente en las

CT por estímulo de LH, debido a que las CG no expresan el ARNm de la p450c17 para realizar esta conversión (J. Y. Zhou et al., 2016). Los andrógenos sintetizados por las CT difunden hacia las CG para la formación de estrógenos en una cooperación célula-célula durante la esteroidogénesis (Escamilla-Hernandez et al., 2008; Guzmán et al., 2017). En las CG, los andrógenos serán sustrato para la enzima P450arom que se encargará de aromatizar el anillo A de la estructura del androstano perdiéndose un carbono para dar lugar a una molécula con 18 átomos de carbonos, el E2 (Cui et al., 2013; Guzmán et al., 2017).

Se ha descrito el papel en la esteroidogénesis de FSH en CG de bovino a dosis de 20 ng/mL, regulando positivamente la expresión de ARNm de HIF-1 en condiciones de normoxia lo que favorece la expresión de los genes STAR, 3 β HSD y CYP19A1 implicados en el proceso de síntesis de estrógenos (Baddela et al., 2020). Asimismo, en CG de ratones Zhang et al (2017) describieron que FSH (100 ng/mL) disminuyó los niveles de expresión de miR-143 a través de la activación de PKA o PKC, llevando a un aumento tanto en la producción basal de E2, como la expresión del gen CYP19A1.

En tejidos de endometriomas ováricos y nódulos endometriósicos rectovaginales estimuladas con rhFSH (1000 UI/L), se observó una regulación positiva de la expresión del fragmento promotor II del gen CYP19A1 y un aumento en los niveles de E2 (Ponikwicka-Tyszko et al., 2016). Mientras que en estudios *in vivo* sobre ratones C57BL/6JRj que se les aplicó un antagonista de GnRH para la disminución en la producción de FSH, se mostró una reducción significativa en el ARNm de CYP19A1 y la expresión de E2 en folículos preantrales y antrales tempranos. En este estudio también se demostró que en cultivos de células ováricas de ratones estimuladas con diferentes dosis de FSH purificada (50, 200, 500 ng/mL) presento un aumento en la expresión de CYP19A1 en CG (François et al., 2017).

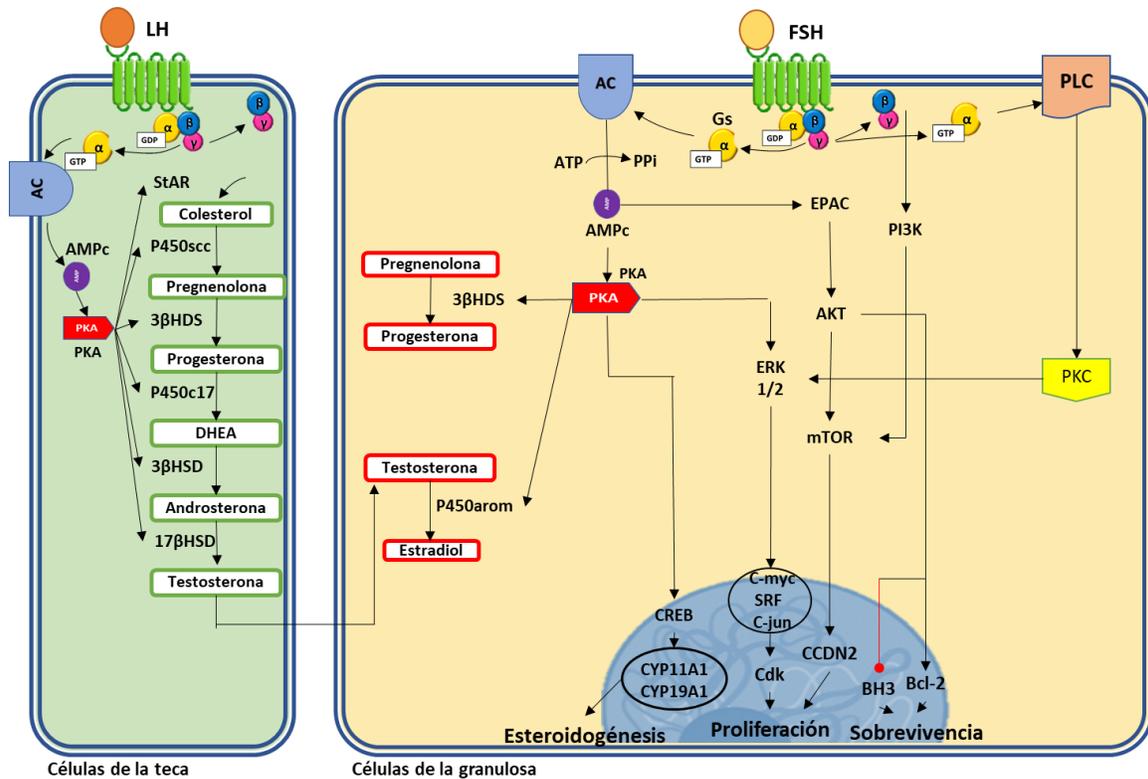


Figura 2. Mecanismo de acción de la hormona folículo-estimulante (FSH).

2.3. Estradiol

2.3.1. Generalidades

El E2 es una hormona esteroide producida por las gónadas de la hembra, específicamente en las CG de los folículos ováricos (Miller & Auchus, 2011). Los esteroides son hormonas fundamentales que cuentan con la capacidad de controlar una amplia variedad de procesos fisiológicos como procesos metabólicos, inmunes, así como características reproductivas y sexuales, entre otras (Bouguen et al., 2015). Se ha observado que prácticamente todas las células, tejidos y órganos responden a E2, este esteroide participa en el metabolismo óseo, en la modulación de la inflamación del cerebro e hígado, funciones cardiovasculares y reproductivas por lo que posee diversos sitios de acción y por ende una gran variedad de células blanco (Vasconsuelo et al., 2011).

El E2 tiene una estructura química de 18 átomos de carbono, consta de 4 anillos derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno del colesterol (A, B, C y D). Los 3 primeros anillos son ciclohexanos mientras que el anillo D ciclopentano, además cuenta con un anillo A fenólico aromatzado característico de los estrógenos. Posee 3 dobles ligaduras dentro de ese anillo, además de un grupo metilo en el carbono 13, un grupo hidroxilo en el carbono 3 y 17, este último en posición beta (Lamminmäki et al., 1997; Muruganathan et. al., 2007; Guzmán et al., 2017;).

El E2 es considerado una molécula de bajo peso molecular (272,4 daltons), esto sumado al ser hidrofóbica, le confiere un transporte celular sin gasto de energía, es decir por difusión simple a través de la membrana celular (Koç et al., 2011; Guzmán et al., 2017). El transporte del E2 por el torrente sanguíneo en su mayoría requiere de la asociación a proteínas acarreadoras, solo un porcentaje muy bajo (1 al 5%) de E2 se transporta libre en la circulación sistémica (Rosner, 2015). Las globulinas fijadoras de hormonas sexuales (SHBG) son las principales proteínas transportadoras de E2, la albúmina, aunque en menor medida puede transportar también E2 (Hammond, 2011). El E2 se une al extremo amino de la proteína a través de un hidroxilo unido al carbono 17 del anillo D, la unión con la SHBG regula de forma pasiva la acción del E2 y el acceso a las células blanco (Pascual-Figal et al., 2009; Rosner et al., 2010). El E2 es una de las hormonas hidrofóbicas que cuenta tanto con receptores intracelulares como con receptores de membrana para estimular sus efectos biológicos (Yoest et al., 2014).

2.3.2. Mecanismo de acción y señalización celular de E2

La mayoría de las funciones de E2 se desencadenan a través de sus receptores intracelulares (ER), estos son similares a algunos otros receptores como el receptor de glucocorticoides, mineralocorticoides, P4, entre otros (Groeneweg et al., 2012). Pertenecen a la superfamilia de proteínas que funcionan como factores de transcripción y también son conocidos como receptores nucleares o simplemente intracelulares dependiendo de su localización. Tienen la capacidad de modular de manera directa la transcripción y la expresión de genes específicos por lo tanto a nivel celular regulan procesos fisiológicos importantes como la proliferación y

sobrevivencia (Ortega-Domínguez et al., 2015). Por sus características fisicoquímicas, el E2 difunde la membrana de su célula blanco hasta alcanzar su receptor del cual existen dos tipos ER α y ER β de clase I (Castoria et al., 2009). El ER está formado por 6 dominios clasificados de la A a la F, partiendo del extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal, las regiones A y B comprenden el primer dominio de activación transcripcional (AP-1) y varios sitios de fosforilación que son importantes en procesos de transactivación cuando el receptor no tiene un ligando. Por su parte, la región C compuesta de 7 residuos de cisteínas distribuidos alrededor de dos iones de Zinc (dedos de Zinc) que le confieren al receptor la capacidad de unión al ADN (Ortega-Domínguez et al., 2015; Fuentes & Silveyra, 2019). La región D contiene una secuencia de localización nuclear, además, actúa como una estructura de “bisagra” entre las regiones C, E y está involucrada en los cambios conformacionales ya que aquí se une las proteínas chaperonas. Por último, la región E/F (AP-2) del lado C-terminal participa como dominio de unión específico al ligando y de interacción con otras proteínas coactivadoras o correpressoras de la transcripción, fosforilación y localización nuclear (Germain et al., 2006; Yaşar et al., 2016). Los ER que se encuentran en el citosol en su estado inactivo se encuentran unidos a proteínas de choque térmico o chaperonas, Hsp90 y Hsp56 (Cahua-Pablo et al., 2016; Tata, 2002), que al interactuar con el E2 se disocian para exponer el dominio de unión al ADN. Una peculiaridad de la acción de los receptores intracelulares es que funcionan en dímeros, es decir, dos moléculas de E2 se unirán a dos receptores para la formación de una molécula con dos secuencias similares (monómero) que ahora podrán activar factores de transcripción o bien, migrará al núcleo para reconocer con alta afinidad a los elementos de respuesta a estrógenos, secuencias palindrómicas en un promotor de un gen específico (Ortega-Domínguez et al., 2015). El complejo ER-E2 interactúa con cofactores para la regulación de expresión génica y dependiendo de cuál sea el corregulador que se una, el efecto de este puede variar (Sever & Glass, 2013).

A pesar de que el E2 cuenta con una vía clásica de respuesta genómica caracterizada por inducir cambios en la transcripción de genes en un tiempo de horas y días, existe otro receptor capaz de desencadenar respuestas de

señalización más rápidas que pueden ir desde minutos hasta segundos (Prossnitz et al., 2008). Estos efectos no genómicos están mediados por el GPCR (GPR30) de tipo Gs/Gi y han sido estudiados con más detalle en células cancerígenas por modular procesos como la movilización de calcio y la activación de cinasas (Filardo & Thomas, 2005; M. R. Meyer et al., 2011). Sin embargo, a través de estos procesos, E2 genera efectos de proliferación y supervivencia en diversos tipos celulares como células tumorales, células progenitoras hematopoyéticas, en macrófagos, así como en células del epitelio mamario (Prossnitz et al., 2007; García-Figueroa et al., 2015; Von Bischoffshausen et al., 2019). El receptor GPR30 antes considerado huérfano se acopla a la proteína Gs para estimular la vía de AMPc/PKA, para la activación de factores de transcripción involucrados en la síntesis del ARNm de moléculas implicadas en el crecimiento celular (Filardo & Thomas, 2005). Sin embargo, existe otra señalización derivada de la unión a la proteína G $\beta\gamma$ donde activan a las proteínas tirosina cinasa (Src), para desencadenar la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a través de la eliminación del factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina y la posterior activación del receptor de EGF. La activación de este receptor desencadena una serie de eventos de señalización intracelular especialmente relacionados con la activación de las vías MAPK, ERK 1/2 y PI3K/AKT (Pandey et al., 2009; Prossnitz & Maggiolini, 2009)

Por otro lado, existen evidencias que sugieren que E2 tiene una acción importante en las mitocondrias. Se han encontrado receptores a estrógenos (ER α y ER β) en varios tipos de tejidos y células en los que se incluyen al útero y el ovario, esto sugiere que los ER mitocondriales podrían regular los efectos de E2 en los diversos tejidos (Pedram et al., 2006). Sin embargo, no se sabe el mecanismo por el cual los ER son trasladados a la mitocondria, a diferencia de otras proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo estas no contienen una secuencia señal que las pueda dirigir a ellas a través de proteínas chaperonas, pero se ha sugerido una traslocación co-traducciona similar a la de algunas proteínas mitocondriales que se sintetizan en ribosomas citosólicos y se importan al orgánulo (Chacinska et al., 2009).

I. Sobrevivencia

Como se mencionó anteriormente, el E2 es capaz de unirse a GPR30. A través de la activación de PKA, fosforila al factor de transcripción CREB quien induce la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 para inhibir la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Prossnitz & Maggiolini, 2009). Por otra parte, la subunidad Gβγ tiene la capacidad de transactivar otros receptores como el EGFR, el cual una vez activado es capaz de desencadenar la vía de señalización PI3K/AKT para regular la activación y expresión del ARNm de factores de transcripción de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 y favorecer la supervivencia celular (La Colla et al., 2017). En cuanto a la acción de E2 dentro de la mitocondria, las evidencias sugieren que inhibe de manera directa las primeras etapas de la apoptosis, regula la activación de proteínas y factores proapoptóticos (Simpkins et al., 2008). Esto sucede gracias a que el complejo E2-ERα induce la expresión del factor de transcripción NRF-1 (factor respiratorio nuclear 1) a través de la interacción directa con el ADN lo que resulta en una mayor transcripción del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y los factores de transcripción b1 y b2, mitocondriales (TFBM1, TFBM2), los cuales ingresan en las mitocondrias para aumentar la expresión de genes codificados por ADN mitocondrial. Los productos proteicos de los genes regulados por NRF-1, se introducen a las mitocondrias para aumentar la expresión de genes codificados en el ADN mitocondrial, la biogénesis mitocondrial y la fosforilación oxidativa teniendo una mayor producción de ATP y especies reactivas de oxígeno (ROS; Yaşar et al., 2016).

Además, el dímero E2-ER ya en el núcleo, se une al factor de transcripción Sp1 o a un elemento homólogo al CRE quien a su vez funciona como factor de transcripción acoplándose a la región promotora de las Bcl-2 o incrementando la síntesis del ARNm de proteínas antiapoptóticas, evitando la apoptosis (Kanda & Watanabe, 2003).

En líneas celulares MCF-7 se ha visto que E2 (10 nM) indujo significativamente la expresión de factores antiapoptóticos como Bcl-2 y survivina al inhibir los niveles de miARN (miR-16, miR-143, miR-203) dependiente de la unión a su receptor ERα (Yu

et al., 2012). Además, se ha descrito que en células madre derivadas del tejido adiposo del párpado humano, E2 presenta un efecto protector contra la muerte celular inducida por H₂O₂ mejorando la supervivencia celular (J. Zhou et al., 2014). Mientras tanto en células neuronales CA1, E2 (50 µg) estimula procesos de supervivencia a través de la unión a su receptor de membrana GPCR30 y la transactivación de receptores de IGF-1, para la regulación de la señalización ERK/MAPK y mantener la actividad del factor de transcripción CREB (Lebesgue et al., 2009).

II. Proliferación

El E2 a través de su GPR30 estimula la proliferación celular mediante la activación de la PKA (Fujiwara et al., 2012). La PKA puede activar al factor de transcripción CREB para inducir la expresión de la ciclina D2 quien actúa como subunidad reguladora de los complejos de cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6, necesarias para la transición G1/S del ciclo celular (Prossnitz & Maggiolini, 2009). Además, los efectos proliferativos de E2 pueden ser mediados por la acción de un GPCR acoplado a proteína G_i, por un lado las G_iβγ inducen una activación rápida de las vías de señalización ERK 1/2 para activar factores de transcripción y así regular la expresión del ARNm de cinasas dependientes de ciclinas (Bouskine et al., 2008). Por otro lado, las G_iβγ participan en la transactivación del receptor de EGF quien modula la activación de la vía PI3K, la activación de AKT y PKC ζ atípica (S. C. Gupta et al., 2010). Por su parte, AKT regula de manera positiva a la ciclina D1 del ciclo celular, mientras que la PKC ζ orquesta la liberación nuclear del inhibidor 1B de la cinasa dependiente de ciclina (p27). Por lo anterior, la interacción entre los efectores de señalización y los reguladores del ciclo celular controlan la progresión del ciclo celular y con ello la proliferación (Castoria et al., 2010). Si bien se conoce que los ER funcionan como factores de transcripción modulando de manera directa la expresión de genes, también se ha establecido que los ER regulan la expresión de genes sin unirse directamente al ADN. Por lo anterior, el complejo E2-ER puede favorecer la expresión de la ciclina D a través de la interacción con las proteínas

cFOS y Jun con el dominio AP-1 pero principalmente del factor de transcripción Sp1 para favorecer la proliferación celular (Björnström & Sjöberg, 2005).

Se ha descrito en condrocitos de un modelo de rata para la osteoartritis que la adición de E2 (10^9 M/L) regula la proliferación celular a través del aumento en la expresión de Akt así como en el nivel de Akt fosforilada (Huang et al., 2011). Mientras que en células mesenquimales humanas E2 (10^{-9} M) ha estimulado la proliferación celular a través de la activación de HIF-1 y la expresión de VEGF mediante las rutas de señalización PKC, PI3K/Akt y MAPK (Yun et al., 2009). Además, en células de Sertoli el 17 beta-estradiol unido a su receptor de membrana, activa rápidamente la fosforilación de PI3K/Akt y de CREB aumentando la expresión de ciclina D1 (Royer et al., 2012).

2.4. Esfingolípidos

Los esfingolípidos son moléculas bioactivas que por un lado participan regulando la dinámica de las membranas biológicas, formando parte de los microdominios denominados balsas lipídicas y por el otro funcionan como segundos mensajeros en la transducción de señales (Schulze & Sandhoff, 2014). Fueron aislados en cerebro por primera vez en el año 1884 por el médico y bioquímico Thudichum, la esfingosina fue el primer esfingolípido en identificarse, nombrada así por el carácter enigmático de esta molécula que hace alusión a la criatura esfinge descrita en la mitología griega (Hannun & Obeid, 2018). Durante la primera parte del siglo XX se identificó la estructura química de la esfingosina, característica básica estructural de todos los esfingolípidos. Fue hasta mediados de la década de los 80 cuando los avances bioquímicos y moleculares del metabolismo y función de los esfingolípidos revelaron que además de funcionar como componentes de la membrana plasmática, moduladores de las interacciones célula-célula y reconocimiento celular, además de actuar como moléculas efectoras y no solo como precursores inertes, es decir son consideradas moléculas capaces de regular señalizaciones en la célula (Ogretmen & Hannun, 2004; Hannun & Obeid, 2008). Los principales esfingolípidos bioactivos incluyen a la ceramida, esfingosina, esfingosina-1-fosfato

y la ceramida-1-fosfato quienes modulan funciones como la regulación y activación procesos biológicos de forma antagónica una de otra (Bartke & Hannun, 2009). Funcionando como un reóstato, es decir, no es su concentración absoluta sino la relación de sus concentraciones lo que determina un equilibrio relativo entre estos esfingolípidos para establecer el destino de las células en respuesta a estímulos específicos (Kolesnick, 2002; Ogretmen & Hannun, 2004; Morales et al., 2007).

La esfingomielina (SM), es uno de los fosfolípidos de membrana más abundantes en las membranas celulares de tejidos animales, además es el precursor del esfingolípido más complejos como la ceramida, quien es sustrato para la síntesis de otros esfingolípidos que actúan como moléculas de señalización (Argraves et al., 2010). Mediante la acción de enzimas, la ceramida da lugar a esfingolípidos complejos, es decir que presentan funciones de moléculas de señalización como lo son la esfingosina, esfingosina-1-fosfato y ceramida-1-fosfato (Berg et al., 2008). Existen otros esfingolípidos que son componentes de membrana celular como los glicoesfingolípidos; cerebrosidos y gangliósidos presentes principalmente en tejido nervioso, actúan en la interacción célula-células y en los procesos de señalización celular (Wang et al., 2017).

2.4.1. Síntesis de esfingolípidos

La síntesis de esfingolípidos implica dos vías, la síntesis *de novo* que comprende principalmente la síntesis de ceramida, esfingomielina, glicoesfingolípidos y la *vía de reciclaje* también llamada *vía de esfingomielina* que permite la síntesis de esfingolípidos complejos como la esfingomielina, ceramida, esfingosina y S1P (Argraves et al., 2010; Sánchez & Díaz-Laviada, 2006). Se ha postulado que ceramida es el esfingolípido más simple dado que las vías que forman esfingolípidos convergen en su formación (Goñi et al., 2014). La síntesis *de novo* comienza en la cara citoplasmática del retículo endoplasmático donde se condensan la serina y el palmitato (palmitoil-CoA por la acción de la serina palmitil transferasa para producir 3-ceto-esfinganina, este a su vez es reducido a esfinganina (dihidroceraida) por la enzima 3-ceto-esfinganina reductasa en una reacción dependiente de NADH (Nitai C Hait et al., 2006). El siguiente paso es que la esfinganina sea convertida a

dihidroceramida por la enzima dihidroceramida sintasa, también llamada ceramida sintasa. Ahora, la dihidroceramida sufre un proceso de desaturación para generar ceramida. La ceramida se transloca hacia la región luminal del aparato de Golgi donde puede ser transformada en glicosfingolípidos y esfingomielina por la esfingomielina sintasa, que transfiere fosforilcolina a la ceramida, generando esfingomielina y diacilglicerol. O a través de la ruta de reciclaje, esta esfingomielina podrá ser nuevamente convertida en ceramida a través de la esfingomielina fosfodiesterasa mejor conocida como esfingomielinasa (ácida y neutra) (van Meer & Holthuis, 2000). Siguiendo la ruta de reciclaje, la síntesis de ceramida ahora podrá ser sustrato de una ceramidasa quien se encargará de hidrolizarla para liberar el ácido graso y producir esfingosina. Posteriormente por la enzima esfingosina cinasa (SK), la esfingosina es fosforilada para ser transformada en S1P (Goñi-Urcelay, 2018).

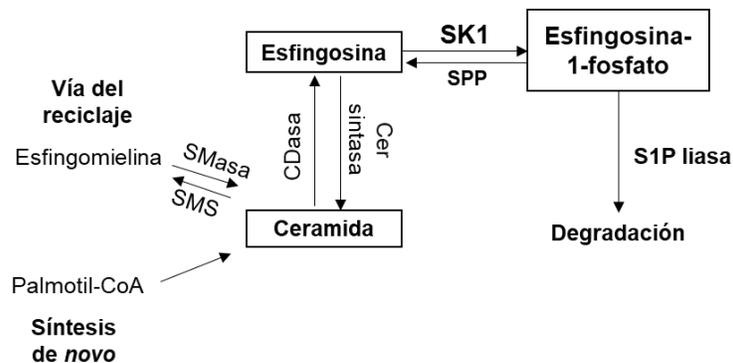


Figura 3. Metabolismo de esfingolípidos. Síntesis de esfingosina 1-fostato (S1P).

2.4.2. S1P (estructura y síntesis)

La S1P es un esfingolípidio biológicamente implicado en la regulación de procesos fisiológicos normales como crecimiento, supervivencia, migración, proliferación celular y procesos más complejos como la angiogénesis, inflamación y vasculogénesis (Obinata & Hla, 2019). Además, en procesos fisiopatológicos como el cáncer, aterosclerosis, diabetes, osteoporosis entre otros (Pyne & Pyne, 2010; Maceyka et al., 2012;). S1P se encuentra de manera constitutiva en altas concentraciones en plasma sanguíneo y suero debido a que la activación plaquetaria permite la liberación de S1P almacenada. Además, la principal fuente

de esfingolípidos está a nivel de eritrocitos y células endoteliales mientras que en la linfa, las células del endotelio de vasos linfáticos mantienen los niveles de S1P (Bazúa-Valenti & García-Sáinz, 2012). La S1P es capaz de transportarse en la circulación sistémica a través de la unión a proteína séricas, principalmente de las lipoproteínas de alta densidad y una pequeña parte por la albumina quienes facilitan sus funciones biológicas y actúan como protección ante la degradación (Ponce et al., 2013; Marín-Palma et al., 2017).

Como se mencionó anteriormente la estructura base de los esfingolípidos está dada por una base esfingoide compuesta de una cadena larga de 18 carbonos, un aminoalcohol que crea una cadena hidrocarbonada insaturada con mínimo un doble enlace, es decir presenta un grupo amino localizado en el carbono 2 y dos grupos alcohol en el carbono 1 y el carbono 3, por lo que el nombre completo de la base estructural es 2-amino-4-octadeceno-1,3-diol (Devlin, 2019). Cuando a la esfingosina se le adiciona un grupo fosfato en el carbono 1 el cual aparece esterificado con el grupo alcohol de este carbono, dejará de ser esfingosina para convertirse en S1P (Merscher & Fornoni, 2014; Devlin, 2019).

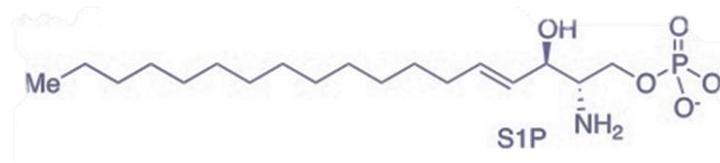


Figura 4. Estructura de la esfingosina 1-fosfato (S1P). La S1P es formada por una cadena de esfingosina y un grupo fosfato en el carbono 1. Tomado y modificado de Pimentel & Benaim, (2012).

La síntesis de S1P se lleva a cabo principalmente en el retículo endoplasmático, las mitocondrias y la membrana plasmática (Spiegel & Milstien, 2011). Como ya se mencionó, la S1P es formada mediante el catabolismo de ceramida ya sea a partir de la síntesis de *novo* o por la *vía de reciclaje* (Hagen-Euteneuer et al., 2012). Mediante la *vía de reciclaje*, la ceramida puede ser hidrolizada por ceramidasa y

producir esfingosina, finalmente, por acción de la (SK), la esfingosina será fosforilada formándose así S1P (Santacreu et al., 2019). La síntesis de S1P esta mediada por dos isoformas de SK, esfingosina cinasa 1 (SK1) y esfingosina cinasa 2 (SK2) las cuales difieren en secuencia, propiedades bioquímicas, localización subcelular y funciones (Gupta et al., 2019). Se generan a partir de dos genes distintos, SK1 y SK2 se ubican en el cromosoma 17 (17q25.2) y 19 (19q13.2) respectivamente (Argraves et al., 2010; Di Pardo & Maglione, 2018). Tanto SK1 como SK2 presentan cinco dominios conservados (C1-C5), los dominios C1-C3 son catalíticos y el dominio C2 es de unión a ATP (Pyne et al., 2016). Una de las principales distinciones entre estas dos enzimas es la variación en la especificidad de su sustrato ya que se ha descrito que SK1 presenta mayor afinidad sobre *D-eritro*-esfingosina, mientras que SK2 la tiene sobre la fitoesfingosina y dihidroesfingosina (Takabe et al., 2008; Brown, 2007). La SK1 es una enzima localizada principalmente en el citosol, es transportada tras su activación a la membrana plasmática resultando en la fosforilación de C1-OH de esfingosina para la producción de S1P (Rohrbach et al., 2017; Di Pardo & Maglione, 2018). La SK1 presenta sitios de fosforilación donde pueden actuar PKA, PKC y caseína cinasa II para su activación, las principales moléculas que destacan son los factores de crecimiento (VEGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas y EGF) citocinas, hormonas (E2, FSH y GH; Takabe et al., 2008; Yong-Seok et al., 2015; Hernández-Coronado, et al., 2019). Mientras que la SK2 se encuentra típicamente en compartimentos intracelulares que incluyen al retículo endoplasmático, las mitocondria y el núcleo (Rohrbach et al., 2017). La SK2 es activado por PKC dentro del núcleo para la formación de S1P, esto por acción de EGF y el activador de PKC, el éster de forbol. Ambos activan ERK1, que a su vez se une a SK2 y lo fosforila en Ser 351 y Thr 578, aumentando su actividad enzimática (Takabe & Spiegel, 2014). Además, otros han sugerido que la fosforilación de SK2 es catalizada por la proteína quinasa D, lo que conduce a su exportación nuclear para la señalización celular (Hait et al., 2009). La síntesis de S1P por acción de SK2 en el núcleo es capaz de facilitar la transcripción de genes, mientras que la síntesis de S1P en mitocondrias a partir de esta enzima actúa sobre las proteínas efectoras que inducen la apoptosis

celular (Hait & Maiti, 2017; Zheng et al., 2019). Ambas cinasas están expresadas de manera ubicua en todas las células eucariotas (Hait & Maiti, 2017).

La síntesis de S1P tiene lugar en el núcleo, el retículo endoplásmico, las mitocondrias y la membrana celular por la activación por fosforilación de la enzima SK1 (Takabe et al., 2008; Hernández-Coronado et al., 2019). La unión de cada molécula con sus respectivos receptores de membrana resulta en la activación de algunas cinasas como PKA o PKC capaces de la interacción con la enzima derivando en la síntesis de S1P (Zheng et al., 2019).

Finalmente, la degradación de S1P está mediada por dos vías diferentes: una es la desfosforilación reversible de la esfingosina por fosfatasas específicas de S1P y la otra es la degradación irreversible de una S1P liasa dependiente de fosfato de piridoxal a hexadecenal y fosfoetanolamina, que posteriormente se reutilizan para la biosíntesis de fosfatidiletanolamina (Spiegel & Milstien, 2003).

2.4.2.1. Mecanismo de acción y señalización celular

La S1P tiene la capacidad de realizar sus funciones mediante dos vías; la primera, llamada intracelular se refiere a que actúa como segundo mensajero, lo que significa que el esfingolípido no sale de la célula al ser sintetizado por lo tanto este no necesita la unión a un receptor para llevar a cabo su función (Dai et al., 2014). Este mecanismo de acción indica que S1P puede unirse y alterar la función de varias proteínas intracelulares para generar sus efectos (Maceyka et al., 2012). La segunda vía denominada extracelular implica que S1P es capaz de salir de la célula mediante transportadores específicos que son capaces de exportar a S1P desde el interior hacia el medio extracelular para actuar vía autocrina, paracrina o endocrina al unirse a alguno de sus cinco receptores de membrana (Rosen & Goetzl, 2005; Pyne & Pyne, 2010).

Mecanismo de acción intracelular: Debido a su carácter anfipático, S1P presenta una alta solubilidad lo que le permite estar presente tanto en las membranas celulares como en medios acuosos como el citosol y el líquido extracelular (García-Pacios et al., 2009). La S1P intracelular es capaz de unirse y actuar como cofactor

de diversas moléculas reguladoras que incluyen enzimas, canales y factores de transcripción regulando así su actividad sin necesidad de unirse a su receptor de membrana (Saba & Hla, 2004; Dai et al., 2014), de esta manera es como S1P puede actuar como un segundo mensajero intracelular capaz de regular la proliferación, sobrevivencia y migración celular (Takabe & Spiegel, 2014).

Mecanismo de acción extracelular: La S1P sintetizada puede tener un efecto dual, activar proteínas directamente en el citosol cumpliendo su función intracelular o salir de la célula para la activación de vías de señalización a través de su receptor de membrana (Nishi et al., 2014). Para que S1P desencadene sus efectos extracelulares, debe salir de la célula a través de una molécula transportadora (Riboni et al., 2020). Los transportadores de S1P se describieron por primera vez en células sanguíneas desde que se observó que la activación plaquetaria permite la salida de S1P almacenada, la liberación se logra por proteínas de transporte y no mediante exocitosis (Pappu et al., 2007; Takabe & Spiegel, 2014). Los transportadores de casete de unión a ATP (ABC) son los encargados de favorecer la salida de S1P. Cuentan con dos dominios transmembrana con seis hélices α que abarcan la membrana y que forman un canal para el transporte del sustrato a través de las membranas y dos ABC citosólicos (Takabe & Spiegel, 2014). Aunque esta familia de transportadores ha sido descrita como no selectiva, pueden exportar otros lípidos de importancia, se identificó un transportador específico identificado del homólogo spinster 2 (Spns2). El Spns2 es una proteína transmembranal descubierta inicialmente en la capa sincitial de yema de tejido extraembrionario del pez cebra en el que se demostró que tiene la capacidad de exportar S1P y dihidro-S1P de las células (Hisano et al., 2011).

La S1P cuenta con 5 receptores acoplados a proteína G denominados S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 y S1PR5 que comparten algunas similitudes estructurales y funcionales (Chun et al., 2010; Mendelson et al., 2014). Los genes que codifican para el S1PR 2,4,5 se encuentran dentro del cromosoma 19p13.2, mientras que el gen que codifica para los S1PR 1 y 3 se localiza en el 1p21 y 9q22.2 respectivamente (Adada et al., 2013). en cuanto a localización celular, se ha

observado que el S1PR1, S1PR2 y S1PR3 se expresan principalmente en miocitos, células endoteliales, leucocitos y fibroblastos, mientras que S1PR4 y S1PR5 se expresan solo en las células inmunes y el tejido nervioso, respectivamente (Rosen et al., 2009; Hernández-Coronado et al., 2019). También se han reportado diversos tipos de receptores en células foliculares de mujer, se ha encontrado la expresión del ARNm para los receptores S1PR1, S1PR2, S1PR3 y de S1PR5 en CG, sin embargo los niveles de expresión para S1PR2 y S1PR5 fue bajo en comparación a S1PR1 y S1PR3, siendo estos los que median los efectos proliferativos y de sobrevivencia (Nakahara et al., 2012). Se sabe que S1P puede unirse a diferentes clases de proteínas G como lo son; Gi, Gq y G12/13. Algunos de estos receptores se acoplan a un tipo de proteína G, mientras que otros podrán unirse a varias de ellas (Kajimoto et al., 2018). La unión de S1P a sus receptores activa vías de señalización que dependerán del tipo de proteína G a la que se acople. Las proteínas G heterotriméricas están conformadas por subunidades α , β y γ . El receptor S1PR1 se acopla a la Gai, en el caso de S1PR2 se puede acoplar a Gai, Gaq y G α 12 al igual que S1PR3, mientras que S1PR4 y S1PR5 se acoplan a Gai y G α 12 (Jiang et al., 2007; Olivera et al., 2010).

I. Sobrevivencia

Intracelular: La síntesis de S1P le permite interactuar como un cofactor que le confiere actividad de E3 ligasa al factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2) el cual se asocia y aumenta la actividad de SK1 (Xia et al., 2002; Alvarez et al., 2010). Esta acción cataliza la poliubiquitinación de la Lys63 de la proteína cinasa RIP1. Esta proteína se considera como una plataforma de señalización en la ruta del factor nuclear beta (NF κ - β) que es esencial para la sobrevivencia celular (Park et al., 2015; Pyne et al., 2016). En fibroblastos y células cancerígenas se ha observado que S1P activa la vía ERK independientemente de TNF- α e inhibe a las cinasas c-Jun amino terminal (JNK) para evitar la apoptosis celular (Maceyka et al., 2002).

Por otra parte, la SK1 favorece la sobrevivencia de las células endoteliales a través de la activación de la molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias

(PECAM-1) de PI3K / Akt y la regulación de los miembros de la familia Bcl-2, sin activar los receptores de S1P o la señalización ERK (Limaye et al., 2005).

Además, se conoce en células embrionarias humanas del riñón 293 que S1P puede directamente activar los canales de calcio en el retículo endoplásmico liso para incrementar las concentraciones de calcio en el citosol y probablemente favorecer la sobrevivencia celular (D. Meyer et al., 2003; Pulli et al., 2018). Este hecho también se ha demostrado en células del músculo liso (Pulli et al., 2018).

Bonhoure et al. (2008) demostraron que en líneas celulares de leucemia mieloide crónica humana, SK1 juega un papel importante en la regulación de procesos apoptóticos inducidos por el fármaco Imatinib al activar las vías Bcr-Abl / Ras / ERK para mediar los efectos de los miembros apoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Bim, Bcl.xL y Mcl-1). Además, SK1 participa en la sobrevivencia de células del glioma regulando negativamente la expresión de la molécula apoptótica Bim dependiente de la señalización de las vías PI3K/Akt/Foxo3 (Guan et al., 2011). Mientras tanto, en células LM2-4 se observó que SK1/S1P actúa a favor de la supervivencia celular a través de la regulación de las vías de señalización ERK, Akt y P38 MAPK (Maiti et al., 2017).

Extracelular: La S1P desempeña un papel importante en la sobrevivencia celular a través de sus receptores de membrana. En células del sistema inmune como los linfocitos, su unión con el receptor S1PR1 activa la vía PI3K, AKT/PKB favoreciendo la activación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y la proteína 1 similar a Bcl-2 (Rosen et al., 2009). En células tumorales, la interacción activa la vía ERK y suprime la acción del mediador de muerte celular que interactúa con Bcl-2 (BIM; Rutherford et al., 2013). La unión de S1P al receptor S1PR5 presente en oligodendrocitos no solo es capaz de inhibir la migración, sino que la unión del ligando a este receptor activa la vía dependiente de AKT que finaliza en la expresión de factores antiapoptóticos (Adada et al., 2013).

En las líneas celulares SH-SY5Y, la edición exógena de S1P (1 μ M) tuvo un aumento en la sobrevivencia celular al disminuir los niveles de ROS producido por ceramida, así como la expresión de ARNm de proteínas antiapoptóticas de Bcl-2

mediado por la unión de S1P a los receptores S1PR1 / 3 (Czubowicz & Strosznajder, 2014).

Por su parte, Mendoza et al (2017) demostraron en células endoteliales linfáticas que S1P a través de la unión a su receptor S1PR1 apoyaron la supervivencia de las células, además del mantenimiento de del contenido mitocondrial favoreciendo su viabilidad. Asimismo, en células de hemangiosarcoma de canino en cultivo con estímulos de 0.5 ng/mL favorece la viabilidad celular a través de su receptor S1PR1 (Rodriguez et al., 2015).

II. Proliferación

Intracelular: Se ha observado que la SK1/S1P tienen la capacidad de unirse a TRAF2 desencadenando la poliubiquitinación de la cinasa RIP1 y a través del inhibidor celular de la apoptosis 2 (cIAP2) y del factor regulador de interferón-1 (IRF1) promover la expresión de la quimiocina ligando 5 (CCL5) para la inducción de la de células inmunes (Harikumar et al., 2014; Gao et al., 2016). Por otro lado, se ha observado que S1P actúa como cofactor para activar las vías Ras, y Raf, MAPK, la cinasa ERK (MEK) y eventualmente estimular la síntesis de ADN.

En contraste, S1P producida en el núcleo por la acción de la SK2 presenta un efecto negativo en la proliferación de la célula. La S1P es un inhibidor endógeno de la histona desacetilasa (HDAC), la SK2 nuclear es un componente de HDAC que contiene complejos represores que están presentes en los promotores de genes específicos, al unirse S1P a estos promotores puede inhibir la represión de las dos variantes de HDAC (HDAC1 y HDAC2), regulando así la transcripción genética que incluye al inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p21 (Maczys et al., 2016; Yan et al., 2018). Es importante mencionar que estos efectos al parecer dependen del sitio de síntesis de S1P y del tipo celular y son mecanismos que aún no han sido bien dilucidados.

En células endoteliales la producción de S1P por la enzima SK1, estimula la proliferación y migración celular al inducir la regulación positiva de la proteasa

desacetilasa dependiente de NAD⁺, sirtuina-1 (SIRT1) a través de las vías P38 MAPK, ERK y AKT. Este efecto fue confirmado en el mismo estudio con la inhibición de SK1 y la aplicación de S1P exógena (100 μM) lo cual conservó la capacidad de regular a SIRT-1 (Z. Gao et al., 2016).

Extracelular: La unión de S1P a sus receptores de membrana son capaces de ejercer efectos proliferativos sobre células inmunes. A través de la interacción con el S1PR1 modula la proliferación celular vía subunidades βγ, ERK/Ras (Rosen & Goetzl, 2005; Kajimoto et al., 2018). Por su parte los receptores S1PR1 y S1PR3 participan en la proliferación de células endoteliales, regulan la activación de ERK/Ras estimulando la progresión del ciclo celular (Argraves et al., 2010; Y. Shen et al., 2019). En células cancerígenas el vínculo S1P-S1PR4 activa la vía de señalización ERK (Ohotski et al., 2012). Además S1PR3 es capaz de favorecer este efecto de manera indirecta como lo describe un estudio que muestra que la unión de S1P a S1PR3 aumenta la expresión de los receptores de EGF en células de adenocarcinoma de pulmón a través de la ruta Rho lo cual favorece la proliferación e invasión celular de colonias estimuladas con EGF (Hsu et al., 2012). En cuanto al S1PR2 se ha descrito que tiene efectos proliferativos por medio de la activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) el cual reprime la acción de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27 (Loh et al., 2012). Otro mecanismo por el cual puede mediar este proceso es la regulación rápida de la expresión génica. La unión de S1P a S1PR2 activa de forma inmediata y transitoria la expresión de c-jun y c-fos , así como la vía ERK / MAPK para promover la proliferación celular y la supervivencia en células HTC4 de hepatoma a través de la activación de la G i / o y subsecuentemente la vía Rho (Patmanathan et al., 2017),

En líneas celulares IEC-6 de rata cultivadas con 1 μM de S1P se vio un aumento en la función proliferativa de las células a través de la unión a su receptor S1PR2 que activa la vía de señalización ERK 1 /2 para el aumento en la expresión de c-myc y la ciclina D1 (Chen et al., 2017). Mientras, en células de musculo liso de la arteria pulmonar humana la sobreexpresión de la enzima SK1 promovió la proliferación celular, debido a la unión de S1P al receptor S1PR2 y activación de la vía ERK

(Chen et al., 2014). Ryu et al (2014) demostraron en células madre embrionarias de ratón que S1P estimulo la proliferación celular de forma dependiente de los receptores S1PR 1/3 en conjunto con la señalización con VEGF lo que provoca la activación de Flk-1 mediada por las rutas β -arrestina/c-Src.

III. Migración

Intracelular: Así como la S1P sintetizada en el citoplasma por SK1 es capaz de promover la proliferación de células inmunes a través de la poliubiquitinación mediada por cIAP2 y del factor regulador de interferón 1 (IRF-1), esta vía también se encarga de la expresión de la proteína C-X-C motivo quimiocina 10 (CXCL10) capaz de inducir la migración de células inmunes como por ejemplo de células natural killer (Harikumar et al., 2014; Wennerberg et al., 2015).

Extracelular: Se ha descrito que la unión de S1P-S1PR1 activa la vía PI3K capaz de regular la actividad de la GTPasa Rac de la familia RHO requerida para la migración de las células inmunes (Rosen & Goetzl, 2005; Mei-Hong et al., 2009). También se ha observado que la reticulación del receptor de alta afinidad para IgE en mastocitos puede favorecer la síntesis de S1P y al unirse a S1PR1 desencadena un reordenamiento del citoesqueleto y la migración (Chalfant & Spiegel, 2005). La migración puede ser estimulada por otras variantes del receptor de S1P. Se ha observado en células endoteliales, que la unión de S1P a S1PR1 y S1PR3 promueve vías de señalización que conducen a la activación de la familia GTPasa Rho, Rac1, involucradas en la migración (Medlin et al., 2010). En contraste a ese descubrimiento, se ha demostrado que S1P activa las células estrelladas pancreáticas para producir metaloproteínasa-matriz (MMP-9) a través de la unión con S1PR2 y mediante la señalización de NF- κ B estimula la migración e invasión de células cancerosas pancreáticas (Bi et al., 2014).

IV. Esteroidogénesis

Intracelular: Se ha reportado que la exportación nuclear de la enzima SK1 en células adrenales humanas para la síntesis de S1P media la expresión del factor

esteroidogénico 1 que regula la transcripción del ARNm de enzimas esteroidogénicas como de la proteína StAR o los genes CYP11A1 o CYP11B1 en respuesta a estímulos de la hormona corticotropa (ACTH; Lucki & Sewer, 2008). Además se conoce que la síntesis de S1P a través de la SK2 favorece también la expresión del ARNm del ER α en células de cáncer de mama de humano y murino (Hait et al., 2015).

Extracelular: La S1P favorece la esteroidogénesis a través de la expresión del ARNm de enzimas y proteínas. Se ha descrito que S1P aumenta la expresión del ARNm de la proteína StAR mediante la unión con su receptor S1PR1 (Lucki et al., 2012). La S1P por medio de la unión con su receptor S1PR1/ Gai estimula la expresión de StAR, la proteína translocadora de 18 kDa (TSPO), el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) y el receptor de barrido clase B tipo I (SR-BI), resultando en un rápido incremento de la biosíntesis de cortisol en células adrenocorticales H295R (Lucki et al., 2012).

Además, S1P/S1PR3 estimula la síntesis de prostaglandina E-2 (PGE 2) para activar a la enzima CYP19 (aromatasa) en CG de ratón (Lucki & Sewer, 2008; Jung-Chien et al., 2016). Asimismo en células adrenocorticales se ha identificado la función del receptor S1PR2 en la estimulación de la esteroidogénesis en respuesta a ácidos biliares, activando así la vía de señalización ERK/SF-1 (L. Liu et al., 2019). De igual forma, en células HAC15 (adrenocorticales), la acción de un agonista del S1PR1 estimuló la sobreexpresión génica de lipina-1 lo que provocó una alza en los niveles de expresión de CYP11B2 para la producción de aldosterona (Shinjini et al., 2020).

V. Otros

La S1P interactúa directamente con el receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR γ), reclutando así el coactivador PPAR γ (PGC1 β) para favorecer la expresión de genes diana PPAR γ en células endoteliales (Kurano et al., 2018). Por lo tanto, la presencia de S1P estimula la expresión del inhibidor 1 activado por plasminógeno y PGC1 β implicados en el desarrollo vascular (Parham et al., 2015). En las mitocondrias, la síntesis de S1P mediante la acción de SK2

permite la unión a la proteína de membrana mitocondrial predominantemente interna, la prohibitina 2 (PHB2), que regula el ensamblaje y la función mitocondrial (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2009). Además, S1P puede inducir la movilización de calcio independientemente de los GPCR (D. Meyer et al., 2003). Una función adicional de S1P derivada de SK2 es la estabilización de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT), la subunidad catalítica de la telomerasa, que mantiene la integridad de los telómeros y presenta un papel importante en la senescencia celular (Selvam et al., 2015). Por último, la enzima de escisión de la proteína precursora amiloide (APP) del sitio β (BACE1), que es la enzima limitante de la velocidad para la producción de péptido β -amiloide (Ab), también es un objetivo de S1P intracelular. La S1P se une específicamente a BACE1 y aumenta su actividad proteolítica en la enfermedad de Alzheimer (Takasugi et al., 2011).

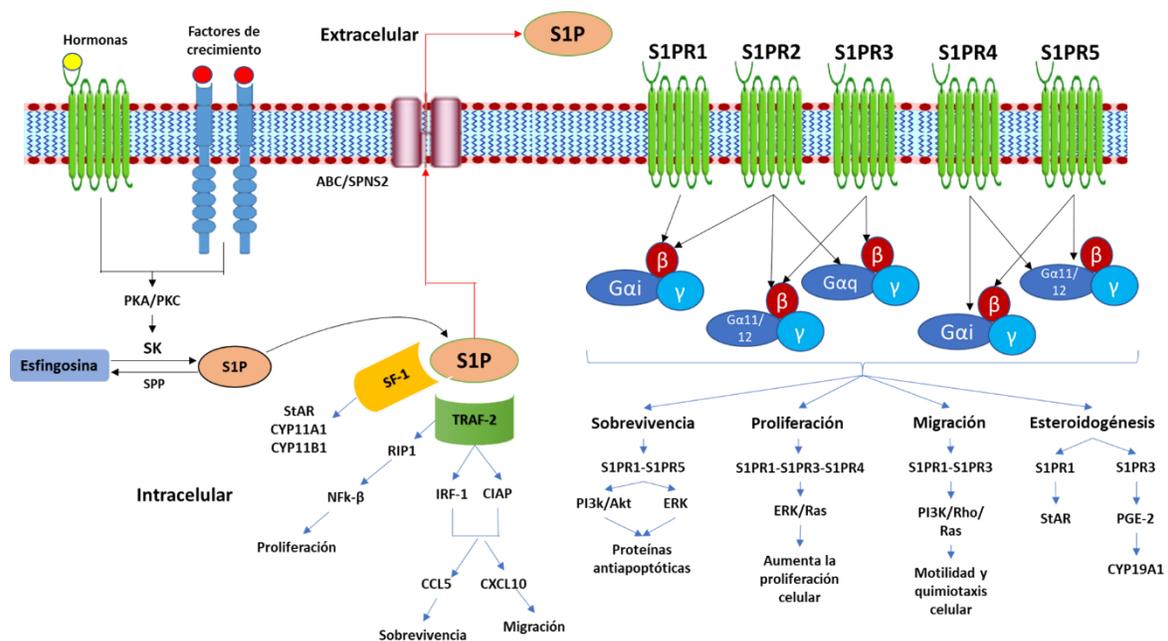


Figura 5. Síntesis y mecanismo de acción de esfingosina 1-fosfato (S1P).

2.4.3. S1P en el desarrollo folicular

El desarrollo folicular es un proceso complejo que depende de diferentes procesos biológicos como la proliferación, supervivencia y la diferenciación celular

(Hernández-Coronado et al., 2019). Roth & Hansen, (2004) observaron un efecto protector de S1P sobre ovocitos al ser sometidos a choques de calor térmico, además mostraron que S1P favorece la maduración de los ovocitos evitando los efectos proapoptóticos de la ceramida. Adicionalmente, se ha observado la capacidad protectora de S1P en células germinales y células del cumulo en ratones de edad avanzada sometidos a estímulos proapoptóticos con ceramida. En este estudio, la adición de 10 μ M de S1P disminuyó la apoptosis de las células del complejo cumulo-ovocito (Perez et al., 2005). Así mismo, una investigación en folículos ováricos primordiales de ratones a los que se le indujo la apoptosis mediante quimioterapia *in vivo*, se demostró que la adición de concentraciones altas de S1P (2 mM) presentó un efecto protector de los folículos (Hancke et al., 2007). Además, otro estudio en folículos primordiales de ratón, esta vez sometidos a condiciones de vitrificación y choque térmico mostró que la suplementación con 2 μ M S1P en la solución de vitrificación, aumentó significativamente la tasa de folículos morfológicamente intactos en comparación con los folículos control (Jee et al., 2010).

Resultados recientes demostraron que la S1P está relacionada con la salud o atresia folicular. A través de la relación hormonal E2/P4 se clasificaron folículos antrales sanos y antrales atrésicos de bovino, se observó que la relación S1P/ceramida en CT y de CG fue mayor ($P < 0.05$) en folículos antrales sanos que en antrales atrésicos, así mismo las concentraciones de S1P en folículos antrales sanos fue mayor ($P < 0.05$) respecto a los atrésicos (Hernández-Coronado et al., 2015).

Por otro lado, un estudio en humanos ha descrito que en xenotrasplantes de tejido ovárico la S1P mejora la neoangiogénesis y la supervivencia de los folículos. Se ha demostrado que la exposición del tejido ovárico con 200 μ M de S1P presenta un aumento ($P < 0.05$) de la densidad vascular lo que acelera el proceso angiogénico y se relaciona con la proliferación de células del estroma ovárico ($P < 0.05$), así como con la reducción de la necrosis e hipoxia tisular y un menor porcentaje de folículos que entraron en proceso de apoptosis (Soleimani et al., 2011). Meng et al. (2014)

reportaron que los xenoinjertos de ovario fetal humano a ratones sometidos a apoptosis por un fármaco anticancerígeno que induce daño folicular (ciclofosfamida), donde la adición de 2 mM de S1P suprimió la apoptosis de folículos, manteniéndose la población de folículos primordiales en los injertos. De manera similar, en folículos primordiales de mujeres expuestos a muerte celular por quimioterapias utilizando ciclofosfamida (Cy) o doxorubicina (D) se demostró que S1P (200 μ M) en combinación con un agente inductor (10 mg/Kg de D y 75 mg/Kg de Cy) actuaron como agentes protectores y antiapoptóticos de los folículos primordiales (Li et al., 2014). Recientemente se analizó el efecto protector de S1P contra la atresia folicular *in vitro* en muestras corticales de ovario en humanos (Guzel et al., 2018). En este estudio se realizaron evaluaciones histomorfológicas y marcadores de apoptosis como la caspasa-3, además se cuantificaron los niveles de E2 y la hormona antimulleriana. Los resultados de este estudio indicaron que S1P incrementó ($P < 0.05$) el número de folículos primarios y secundarios evitando la atresia folicular (Guzel et al., 2018).

Respecto a sus receptores, evidencias indican que S1PR1 y S1PR3, se expresan a un alto nivel en CG de mujeres en folículos de distintos estadios de desarrollo, mientras que los receptores S1PR2 y S1PR5 se expresan en menor nivel en estos mismos folículos (Nakahara et al., 2012; Jung-Chien et al., 2016).

La proliferación, sobrevivencia y esteroidogénesis de CG desempeña un papel importante durante el desarrollo folicular (Uribe-Velásquez et al., 2009). Estos efectos biológicos dependen de la participación de hormonas y factores de crecimiento, sin embargo, en la actualidad se ha estudiado la intervención de los esfingolípidos específicamente de S1P (Rosales-Torres et al., 2012; Hernández-Coronado et al., 2019).

En CG de bovino en cultivo se comprobó que la FSH (1ng/mL) a través de la activación de la SK1 estimula la síntesis de S1P, la inhibición de esta enzima redujo ($P < 0.05$) la producción de S1P y con ello el número de CG metabólicamente activas en el cultivo (Hernández-Coronado et al., 2016). Adicionalmente, se mostró que dosis bajas de S1P (0.1 μ M) favorecen ($P < 0.05$) la proporción de células en la fase

G2 y M del ciclo celular lo que se traduce en un incremento en la proliferación de CG en cultivo (Hernandez-Coronado et al., 2016).

En un estudio en el que se utilizaron cultivos primarios de CG con la adición de ciclofosfamida como promotor de la apoptosis, se observó que S1P promueve la sobrevivencia de CG a través de la activación de la vía PI3K/AKT (Li et al., 2017).

Nakahara et al (2012) investigaron el efecto protector de S1P sobre la apoptosis de CG. En cultivo de CG luteinizadas de humano se observó el efecto protector de S1P (1 y 10 mM) en presencia de peróxido de hidrógeno como inductor de apoptosis y concluyeron que S1P inhibe la apoptosis de CG en respuesta a estrés oxidativo a través de los receptores S1PR1 y S1PR3 mediante la activación de la vía PI3K/AKT.

Por lo anterior, considerando que S1P tiene un efecto dual promoviendo la proliferación, sobrevivencia y esteroidogénesis en diversos tipos celulares incluidas células foliculares, es probable que actúe como modulador de los efectos biológicos de FSH en CG.

3. Justificación

De acuerdo con los antecedentes que se presentaron, la hormona folículo-estimulante (FSH) es una hormona de gran importancia para el desarrollo de los folículos antrales, favorece la esteroidogénesis, la proliferación y sobrevivencia de las células de la granulosa (CG). Otras moléculas como esfingosina 1-fosfato (S1P), también está involucrada en el desarrollo del folículo. La S1P es una molécula que se sintetiza en CG mediante la acción de FSH y se le ha relacionado con los efectos de proliferación y sobrevivencia de las células foliculares. Estudios recientes en nuestro laboratorio indican que la concentración de S1P está relacionada con el desarrollo o la atresia de los folículos y que la adición de FSH a los cultivos de CG, activan la enzima esfingosina cinasa 1 (SK1), responsable de la transformación de esfingosina a S1P y la concentración de este esfingolípido estuvo relacionado con la proliferación de las CG. Poca información existe sobre la participación de S1P en la esteroidogénesis, sin embargo, se ha establecido que la concentración de S1P está asociada con la síntesis de esteroides en células adrenales. Hasta el momento no se conoce si la S1P es la molécula que media los efectos biológicos provocados por FSH en CG, por lo que con este trabajo nos propusimos investigar si S1P es el mediador de los efectos en la viabilidad y esteroidogénesis que produce FSH en las CG de bovino.

4. Objetivo general

Demostrar que esfingosina 1-fosfato (S1P) es el mediador de los efectos de viabilidad y esteroidogénesis de la hormona folículo-estimulante (FSH) en células de la granulosa de bovino.

5. Objetivos específicos

- Constatar si los efectos de viabilidad de FSH sobre células de la granulosa ocurren a través de la síntesis de S1P.
- Evaluar si los efectos esteroidogénicos de FSH sobre células de la granulosa de bovino son mediados por la síntesis de S1P.

6. Hipótesis

Los efectos biológicos (viabilidad celular y esteroidogénesis) de la hormona folículo-estimulante (FSH) sobre las células de la granulosa de bovino, dependen de la síntesis de esfingosina 1-fosfato (S1P).

7. Material y métodos

7.1. Diseño experimental

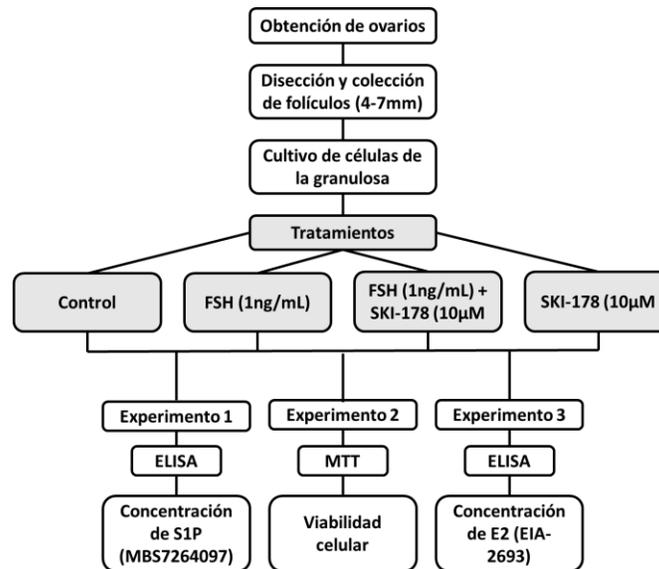


Figura 6. Diseño experimental

7.2. Obtención de muestras biológicas (ovarios)

Se realizó la obtención de ovarios de vacas Holstein sacrificadas en un rastro privado ubicado en el municipio de Temamatla, Edo. De México. Los ovarios, inmediatamente fueron colectados en solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% a 37 °C. Se les realizaron 2 lavados con la misma solución para posteriormente ser transportados al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco a 37°C en un lapso no mayor a dos horas. Al llegar al laboratorio fueron lavados 5 veces con SSF al 0.9% y uno más de 30 segundos en etanol al 75% para que finalmente se colocaran en SSF al 0.9% y medio McCoy's 5A modificado.

7.3. Aislamiento de CG

Se realizó la disección de los ovarios en búsqueda de folículos con un diámetro de entre 4 a 7 mm, se separaron del estroma ovárico y se eliminaron los folículos que estuvieran en un proceso claro de atresia. La disección se realizó en cajas Petri estériles sobre parrillas de calentamiento (37°C) en campana de flujo laminar

previamente esterilizada. Los folículos se colectaron en medio McCoy's 5A modificado con bicarbonato de sodio (in vitro-ME-043) previamente gaseado y suplementado (20 mM de HEPES (H6147-sigma), 100 IU/mL de penicilina (P4333-sigma), 0.1 mg/mL de estreptomicina, 3 mM L-glutamina (G8540-sigma), 0.1% de BSA (A7030-sigma), 10ng/mL de insulina (I3769-sigma), 1ng/mL de IGF-1 (Gropen), 100 µL de testosterona (50µg/mL), 2.5 ug/ml transferrina (T8158-sigma) y 4 ng/mL de selenito (S5261-sigma), en ausencia de suero (Hernández-Coronado et al., 2016). Los folículos fueron situados en grupos aleatoriamente en distintas cajas Petri, de manera que el producto de cada caja correspondiera a cultivos diferentes. A los folículos se les eliminó el líquido folicular, los sacos foliculares fueron expuestos en su parte interna y se les realizó un raspado suave procurando desprender la lámina basal para asegurar la separación mecánica de las CG. Las células obtenidas de cada grupo de folículos se colocaron en medio McCoy's 5A modificado y suplementado en cajas Petri y se formaron pools de CG. Cada pool de CG se transfirió a un tubo de 50 mL mediante un filtro celular de 70 µm (Cell strainer FALCON a Corning Brand, 352350) para eliminar restos de sacos foliculares y posteriormente se centrifugaron a 1700 rpm por 10 minutos para obtener el pellet de células. A las CG se les realizó un primer lavado con medio McCoy's 5A modificado y un segundo con DPBS 10x (Fosfato Dubelco con buffer salino; In Vitro-SS-05) y agua estéril (1:10) hasta tener una solución DPBS 1X. Primero se adicionó el agua, se resuspendieron las CG con pipeta por 3s y enseguida se adicionó DPBS 10X mezclando la solución homogéneamente para eliminar la interferencia de eritrocitos y se centrifugaron como se mencionó anteriormente. Finalmente, el pellet celular se resuspendió en medio McCoy's 5A modificado.

Se calculó el número de CG utilizando la tinción de azul de tripán al 4% en una relación 1:10, es decir, se tomaron 90 µL de la suspensión celular y se le agregaron 10 µL de azul de tripán. Se colocó la mezcla sobre una cámara de Neubauer, se contó el número de células no teñidas sobre 5 cuadrantes en cada una de las cámaras. Finalmente, el número de células totales viables se obtuvieron utilizando la siguiente fórmula: Promedio de ambas cámaras x 10,000 x 5 cuadrantes x dilución de la mezcla (Hernandez-Coronado et al., 2015),

7.4. Cultivo de CG

Las células provenientes de cada grupo de folículos fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Figura 8) con tapa (Thermoscientific, NUNC estéril, 167008), en medio de cultivo McCoy's 5a modificado. Previo al sembrado de las células, las placas se pre-incubaron por 3 horas en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y 90% de humedad. Posteriormente se sembraron 75,000 células viables y se dejaron estableciendo durante 24 h para finalmente realizar un re-cambio de medio de cultivo y adicionar los respectivos tratamientos a cada pozo (Figura 7) como sigue: Control, 1 ng/mL de FSH (Sigma-aldrich, F8174), 10 µM de SKI-178 (Cambiochem, 2939450) y 1 ng/mL de FSH + 10 µM de SKI-178 (Hernández-Coronado et al., 2016). Los tratamientos se distribuyeron de manera aleatoria en cada uno de los cultivos (Figura 8). Las células se incubaron con los tratamientos durante 48 h (Gutierrez et al., 1997; Hernández-Coronado et al., 2016). Se almacenaron los medios de cultivo a -70°C hasta su uso.

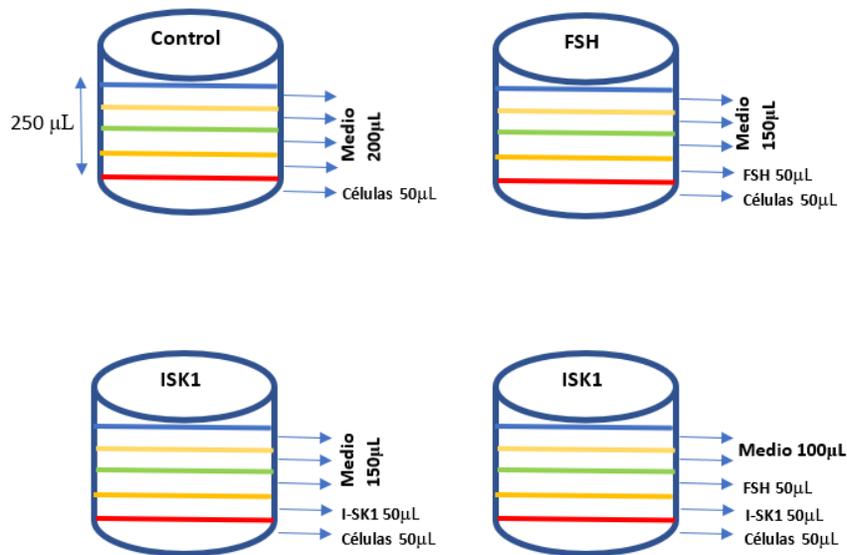


Figura 7. Distribución de tratamientos por pozo

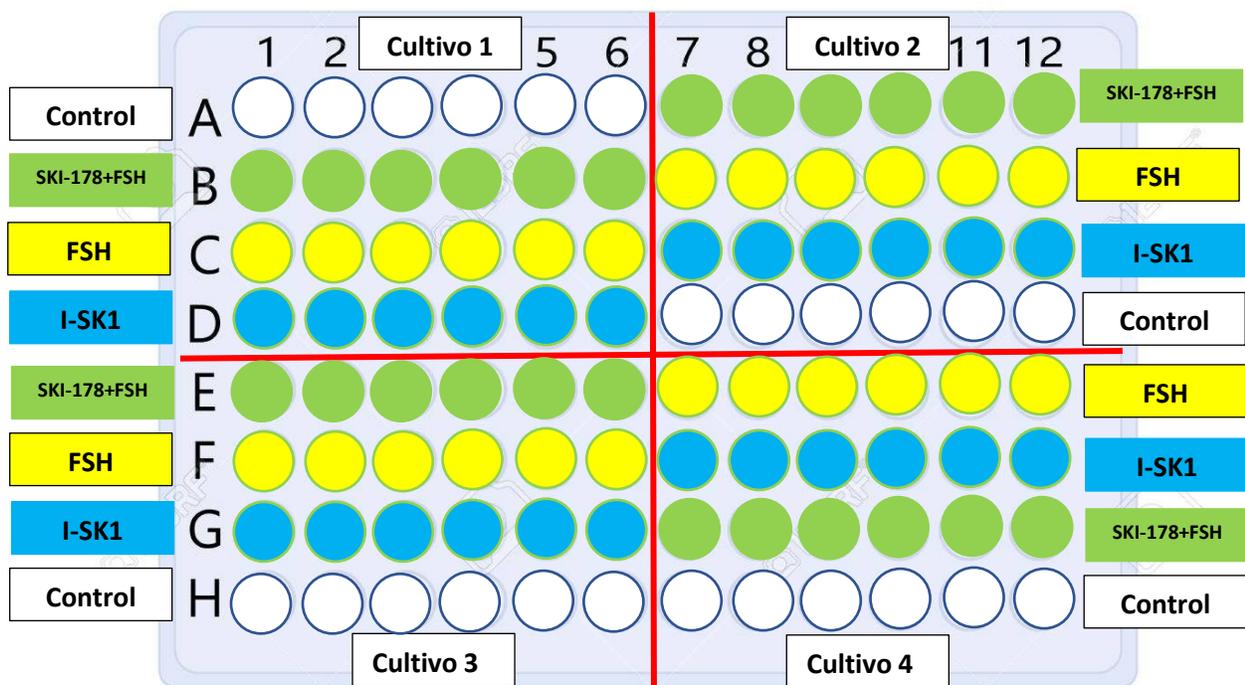


Figura 8. Distribución de tratamientos y cultivos en placa de 96 pozos

7.5. Experimento 1: La FSH estimula la síntesis de S1P en CG

Se realizaron 4 cultivos con 4 repeticiones con los tratamientos: control, 1 ng/mL de FSH, 1 ng/mL de FSH + 10 µM de SKI-178 y 10 µM de SKI-178 por 48 horas. Al finalizar el cultivo se recolectó el medio de cultivo de los pozos correspondientes a cada tratamiento y se determinaron las concentraciones de S1P mediante la técnica de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

7.5.1. Determinación de S1P por la técnica de ELISA

Las concentraciones de S1P se cuantificaron mediante la técnica de ELISA con el estuche comercial: Bovine Sphingosine 1-Phosphate ELISA Kit (S1P) Mybiosource-San Diego, CA, MBS7264097, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se construyó una curva estándar con 5 puntos de S1P con valor de $R^2=0.9264$. Se emplearon 50, 100, 250, 500 y 1000 pg/mL y se obtuvo la densidad óptica por espectrofotometría a 450nm. Dicha curva nos permitió observar niveles detectables

de S1P en medio de cultivo de CG (Figura 9). El coeficiente de variación intraensayo estuvo entre 0.223 y 5.48% para los puntos mínimos y máximos de la curva.

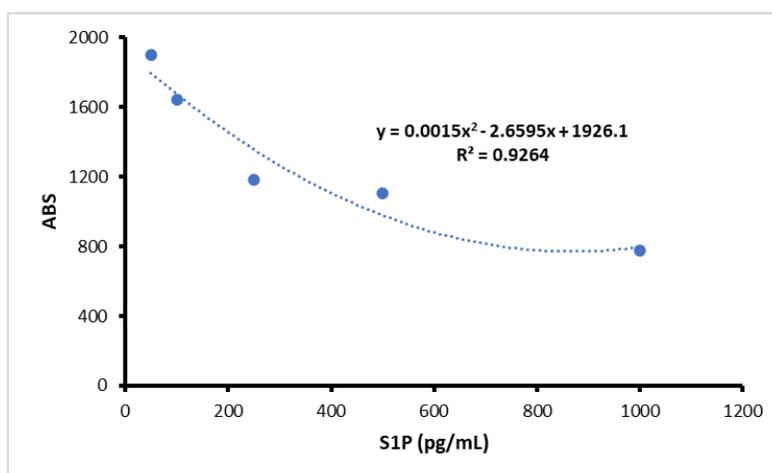


Figura 9. Curva estándar de esfingosina 1-fosfato (S1P).

7.6. Experimento 2: Los efectos de viabilidad de FSH en CG dependen de la síntesis de S1P.

Para este experimento se emplearon las células provenientes de 3 cultivos a los cuales se les determinó la concentración de E2, los tratamientos empleados fueron: (Control, 1 ng/mL de FSH, 1 ng/mL de FSH + 10 μ M de ISK-178 y 10 μ M de ISK-178). La viabilidad celular se determinó por el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT.

7.6.1. Determinación del número de CG por MTT

El ensayo de MTT se basa en la reducción metabólica de sales de tetrazolio (color amarillo) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa que a través NADH y NADPH como coenzimas, convierten el tetrazolio en un compuesto color azul/purpura, “formazan” (Rangel, et al., 2009). Al término de las 48 horas de cultivo, se retiró alrededor del 80% del medio de cultivo y se adicionaron a las células 20 μ L de la solución MTT (5 mg/mL de Tetrazolio-Sigma M5655) y se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y 90% humedad durante 4 h. Pasado el tiempo se adicionó a cada pozo 100 μ L de buffer de lisis el cual contenía 5 mL de H₂O destilada, 5 mL de N-Dimetilformamida (D4551-sigma), 2 g de SDS (161-0301-

Biorad), 500 μ L de ácido acético 1 N (9507-02- J. T. Baker) y 500 μ L de ácido clorhídrico 1 N. Después, las CG se incubaron por 4 h a temperatura ambiente en total oscuridad y se midió la densidad óptica del medio a 595 nm en un espectrofotómetro Smartec Plus-BIORAD. El número de células fue obtenido mediante una curva sembrando cantidades ascendentes (al doble) de CG por pozo (15,750-252,000 células). Se dejó estabilizar por 1 hora en incubadora y se adicionó solución MTT a cada pozo. Posterior a la incubación con el MTT, se lisaron las células a temperatura ambiente y finalmente se obtuvo la densidad óptica a 595nm. A través de una ecuación de regresión se determinó la relación entre absorbancia y el número de células con el programa Assay Zap 3.0.

7.7. Experimento 3: Los efectos esteroideogénicos de FSH en las CG son mediados por S1P.

Para la determinación de los efectos esteroideogénicos de FSH mediados por S1P se emplearon 3 cultivos de CG con 4 repeticiones para cada tratamiento (Control, 1 ng/mL de FSH, 1 ng/mL de FSH + 10 μ M de SKI-178 y 10 μ M de SKI-178). Al finalizar el cultivo se obtuvo el medio de cultivo para determinar las concentraciones de E2 por la prueba de ELISA utilizando el estuche comercial DRG estradiol (EIA-2693) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se construyó una curva estándar con 5 puntos de E2 con valor de $R^2 = 0.9887$. Se emplearon 6.25, 12.5, 25, 100 y 250, 500, 1000 y 2000 pg/mL y se obtuvo la densidad óptica por espectrofotometría a 450nm. (Figura 10). El coeficiente de variación intraensayo fue de 2.95 y 5.93% para los controles de calidad y de entre 0.73 y 1.82% para los puntos mínimos y máximos de la curva.

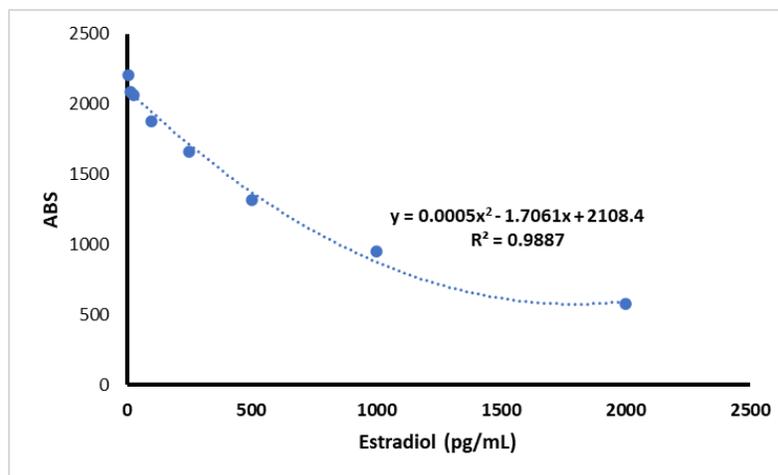


Figura 10. Curva estándar de estradiol.

7.8. Análisis estadístico

El efecto de FSH, FSH con SKI-178 (inhibidor) y SKI-178 sobre la concentración de S1P fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA). Las medias se ajustaron al número de CG mediante un modelo estadístico mixto y se utilizaron como fuentes de variación efectos fijos (tratamiento y células) y efectos aleatorios (pool de ovarios y pozos). Las diferencias entre medias del control y FSH y SKI-178 se analizaron por la prueba de Tukey.

La concentración de E2 por efecto de FSH, FSH con el SKI-178 y SKI-178 fue analizada por ANOVA seguido de la prueba t de Student. El número de CG se usó como variable para ajustar el efecto de tratamiento sobre la concentración de E2 y las diferencias del control con cada tratamiento se comprobaron mediante contrastes.

Finalmente, el efecto de FSH, FSH con el SKI-178 y SKI-178 sobre la viabilidad de CG se determinó por ANOVA seguido por la prueba de Tukey's.

8. Resultados

8.1. Experimento 1. La FSH estimula la síntesis de S1P en CG.

La adición de 1ng/mL de FSH incrementó la concentración de S1P en el medio de cultivo ($P < 0.05$), mientras que esta concentración disminuyó con la adición del inhibidor SKI-178 (10 μ M) en presencia de 1ng/mL de FSH y con el inhibidor solo ($P < 0.05$) en CG (Figura 11).

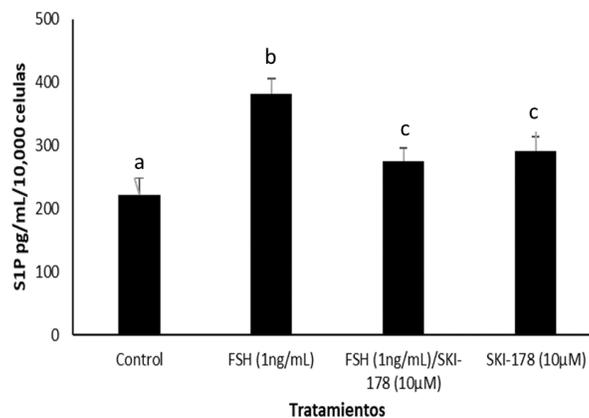


Figura 11. Efecto de FSH (1 ng/mL) sobre la síntesis de S1P CG de folículos de 4-7 mm de diámetro después de 48 de incubación. Se muestra el efecto de FSH sola, en combinación con un inhibidor de esfingosina cinasa 1 (SK-178-10 μ M) y sólo el inhibidor. a, b y c indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

8.2. Experimento 2: La S1P actúa como mediador de los efectos de viabilidad de CG.

Los resultados indicaron que con 1ng/mL de FSH en el medio de cultivo, se incrementó el número de CG viables ($P < 0.05$), no obstante, la viabilidad de las células se redujo cuando se adicionó al medio el inhibidor de SKI-178 (10 μ M), solo o en presencia de 1ng/mL de FSH ($P < 0.05$) en los cultivos a las 48 horas de incubación (Figura 12).

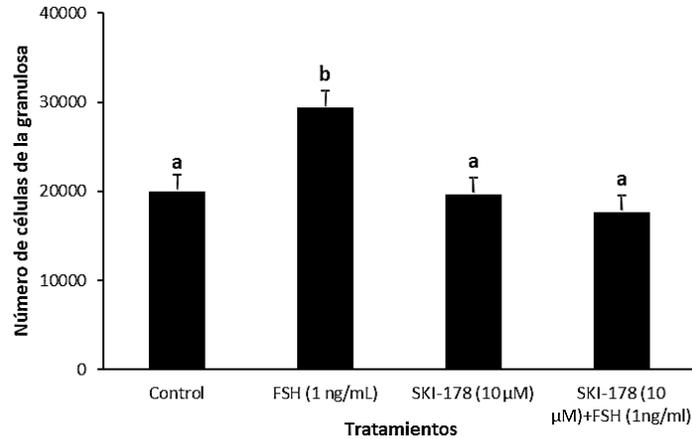


Figura 12. Efecto de un inhibidor de esfingosina cinasa 1 (SKI-178) sobre el número de CG de folículos de 4-7 mm de diámetro después de 48 de incubación en presencia o ausencia de 1 ng/mL de FSH. a y b indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

8.3. *Experimento 3: Los efectos esteroideogénicos de FSH sobre las CG no son mediados por S1P.*

Los resultados indicaron que FSH estimula la síntesis de estradiol ($P < 0.05$) en el medio de cultivo, sin embargo, la FSH en presencia de SKI-178 y el inhibidor sólo también incrementaron su síntesis comparado con el control ($P < 0.05$). Estos resultados sugieren que S1P no media los efectos esteroideogénicos de FSH en CG de bovino en cultivo.

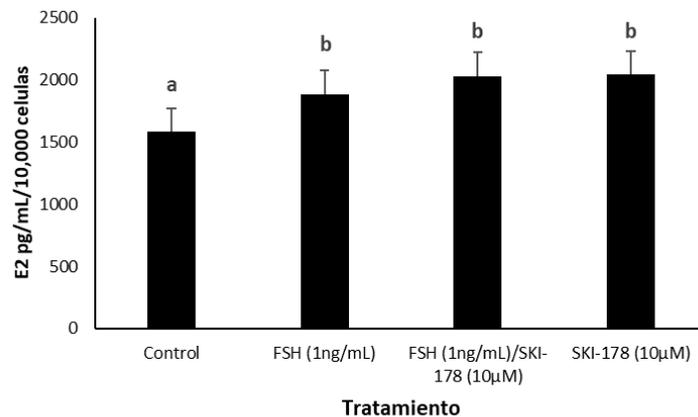


Figura 13. Efecto de un inhibidor de SK1 (10 μ M; SKI-178) sobre las concentraciones de estradiol (E2) en CG de folículos de 4-7 mm de diámetro después de 48 hrs de incubación en presencia y ausencia de FSH (1 ng/mL). Las literales a y b representan diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

9. Discusión

Los resultados de este trabajo confirman que FSH estimula la viabilidad y esteroidogénesis en CG de folículos de bovino. También indican que FSH a través de la SK1, estimula la síntesis de S1P y que este esfingolípido es el mediador de los efectos en la viabilidad, pero no en la síntesis de estradiol en los cultivos de CG de bovino.

El desarrollo folicular depende de la proliferación, diferenciación, sobrevivencia y esteroidogénesis de las células de la teca y CG (Hunzicker-Dunn et al., 2012). Las CG muestran diferentes fenotipos dentro del folículo antral dependiendo de su ubicación. Existen CG murales ubicadas cerca de la lámina basal que recubren el antro y CG del cúmulo que rodean al ovocito (Clarke, 2018; Strauss & Williams, 2019). Ambas poblaciones tienen características distintivas que están determinadas, en parte, por su proximidad al ovocito, las células de la teca y, en consecuencia, las sustancias paracrinas liberadas por el ovocito y las tecas (Paulini et al., 2014; Clarke, 2018; Strauss & Williams, 2019). Las CG murales en el folículo antral poseen una mayor actividad esteroidogénica, mientras que, las CG más cercanas a la cavidad antral tienen menor expresión de enzimas esteroidogénicas (Strauss & Williams, 2019). En contraste, las de la región media tienen mayor actividad mitótica que las CG antrales y murales (Strauss & Williams, 2019).

La FSH es considerada como la principal hormona que participa durante el reclutamiento folicular, posee receptores en CG y se considera como el principal factor trófico encargado de orquestar la diferenciación, viabilidad, sobrevivencia, proliferación y esteroidogénesis de estas células (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Uribe-Velásquez et al., 2009). La ruta clásica de FSH indica que al unirse con su receptor

acoplado a proteína Gs, la subunidad G α de la proteína G activa al adenilato ciclasa para estimular la síntesis intracelular de AMPc (Matvere et al., 2019). La formación de AMPc activa a la PKA o a través de rutas alternas FSH activa a la PKC y con ello diversas señalizaciones (Casarini & Crépieux, 2019). En CG de rata, la FSH (100ng/mL) regula la expresión del ARNm y de la proteína cinasa CCND2 a través de la vía de señalización de PKA/PI3K para promover la proliferación (Han et al., 2013). Por otro lado, la FSH (2 UI/mL) a través del factor-1 α inducible por hipoxia (HIF-1 α) evita la apoptosis de CG de porcino (Li et al., 2020). Adicionalmente, FSH (0.01 UI/mL) a través de la vía PI3K/Akt/FoxO3a reduce la expresión de la proteína apoptótica BimEL para favorecer la sobrevivencia de CG de porcino en cultivo (Wang et al., 2012). Nuestros resultados indican que la adición de 1ng/mL de FSH a los cultivos, incrementan el número de CG viables respecto al control. El MTT es un compuesto soluble de color amarillo que a través de enzimas mitocondriales dependientes de ATP como NADH y succinato deshidrogenasas convierten este compuesto en su forma insoluble y púrpura “el formazán” (Cai et al., 2015). Esto quiere decir que la producción de formazán será proporcional al número de células vivas y diversos investigadores emplean esta técnica para representar la viabilidad y proliferación celular (Cai et al., 2015). Durante el desarrollo folicular, el ATP mitocondrial es la principal fuente de energía para los procesos de proliferación y sobrevivencia de CG estimulados por FSH (Hoque et al., 2021). El ATP es producido mediante enzimas como la NAD, succinato u otros metabolitos intermediarios a través de reacciones de la cadena de transporte de electrones. La inhibición del ATP mitochondrial durante la fase G1 del ciclo celular reduce los niveles de cinasas dependientes de ciclina y arresto del ciclo celular (Hoque et al., 2019). La inyección de 40 UI/kg de FSH a ratones hembra durante el ciclo ovárico mostró valores máximos en el patrón de actividad de los complejos de transferencia de electrones I, II y IV (NADH-ubiquinona reductasa, succinato-ubiquinona reductasa y citocromo oxidasa; Navarro et al., 2005). Por otro lado, Hoque et al. (2019; 2021) mostraron que la adición de FSH (100 ng/ml) a cultivos de CG de ratones hembra incrementan la expresión del ARNm de los genes de actividad mitocondrial *Nd1-6*, *Cytb*, *Atpase 6,8* de los complejos I-V. Estas evidencias y los resultados obtenidos en este trabajo

esclarecen que la acción de FSH a través de su receptor es crucial en la actividad mitocondrial, el potencial de membrana, el contenido de ATP, expresión y síntesis de proteínas para favorecer la viabilidad de CG.

Otra importante función de FSH es promover la esteroidogénesis en CG. Diferentes dosis de FSH purificada (50, 200 y 500 ng/mL) favorecen la expresión del gen CYP19A1 en CG de ratón (François et al., 2017). Asimismo, el uso de 100 y 1000 UI/L de FSH durante 24 h en CG de mujer aumentaron significativamente los niveles de estradiol y la expresión del ARNm del fragmento del promotor II de CYP19A1 *in vitro* (Ponikwicka-Tyszko et al., 2016). Además, la inhibición de FSH, mediante un antagonista de GnRH (Ganirelix) mostró una reducción significativa en la expresión del ARNm de CYP19A1 y en la concentración de estradiol en folículos preantrales y antrales tempranos de ovarios posnatales (François et al., 2017). Los resultados de este trabajo confirman que FSH (1ng/mL) incrementa las concentraciones de estradiol en CG de bovino en cultivo, lo cual ratifica la importancia de esta gonadotropina en la esteroidogénesis de estas células.

La FSH además de promover la síntesis y activación de enzimas esteroidogénicas, actividad mitocondrial, del ciclo celular, de sobrevivencia, entre otras funciones, ha demostrado su participación en la síntesis de esfingolípidos como la S1P (Hernández-Coronado et al., 2019). La síntesis de S1P depende de la acción de SK1 y ocurre en el retículo endoplasmático, las mitocondrias, la membrana plasmática. La S1P se forma mediante el catabolismo de ceramida ya sea a partir de la síntesis de *novo* o por la vía de reciclaje (Spiegel & Milstien, 2011). La SK1 presenta sitios de fosforilación donde pueden actuar PKA, PKC y caseína cinasa II para su activación (Yong-Seok et al., 2015). Las principales moléculas encargadas de activar a la SK1 son los factores de crecimiento, citocinas, hormonas, entre otras, (Takabe & Spiegel, 2014; Hernández-Coronado et al., 2019). La S1P es una molécula bioactiva que regula la proliferación, sobrevivencia y esteroidogénesis de manera intracelular y extracelular en diversos tejidos como células endoteliales, pulmonares, ováricas entre otras (Obinata & Hla, 2019). Estudios recientes en nuestro laboratorio mostraron que las CG de folículos sanos de bovino contienen

tres veces más S1P que los folículos atrésicos (Hernandez-Coronado et al., 2015). Adicionalmente, Hernández-Coronado et al (2016) demostraron que la adición de 1ng/mL de FSH al medio de CG en cultivo incrementaron la concentración de S1P respecto a los niveles detectados en el grupo control. Además, en este estudio, se muestra que la adición de SKI-178 (inhibidor específico de SK1) disminuyó dramáticamente la producción de S1P (valores absolutos) de manera dosis dependiente en células cultivadas con 1ng/mL de FSH (Hernández-Coronado et al; 2016). La señalización de FSH es mediada por la activación de PKA y PKC con la subsecuente activación de las MAPK y de la vía PI3K/AKT en CG para modular los procesos de sobrevivencia y proliferación celular (Bernard et al., 2010). Hernández-Coronado et al (2016) demostraron que FSH está involucrada en la síntesis de S1P gracias a la activación de SK1, lo cual pudimos confirmar en esta ocasión con los resultados de este estudio, en donde con la adición de 1ng/mL de FSH produjeron la síntesis de S1P (pg/mL ajustado a 10,000 células), mientras que la adición al medio de 1ng/mL de FSH en combinación con SK-178 (10 μ M) y únicamente SKI-178 (10 μ M) redujeron las concentraciones de S1P (pg/10,000 células) a niveles similares a los del control. La inhibición de la síntesis de S1P con la adición de SKI-178, indica claramente que SK1 es fundamental en la señalización de FSH para la producción de este esfingolípido y para llevar a cabo los efectos de FSH en la viabilidad de las células de la granulosa. Sin embargo, aún no se tiene clara la señalización (PKA o PKC) que puede seguir esta hormona para provocar este efecto.

Como se ha dicho, la S1P es una molécula pleiotrópica, mediadora que actúa a través de su receptor acoplado a proteína G o bien uniéndose intracelularmente a distintas moléculas para desencadenar diversas vías de señalización (Mendelson et al., 2014). El efecto dual característico de S1P implica que una vez sintetizado ante diversos estímulos, puede actuar como cofactor para activar proteínas intracelulares involucradas en vías de señalización para proliferación, sobrevivencia y migración de las células (Dai et al., 2014). Asimismo, a través de transportadores específicos (ABC, Spns2), S1P puede migrar desde el interior celular al medio extracelular y unirse a uno de sus 5 subtipos de receptores (conocidos como

receptores EDG-gen de diferenciación endotelial: S1PR1 (EDG-1), S1PR2 (EDG-5), S1PR3 (EDG-3), S1PR4 (EDG-6) y S1PR5 (EDG-8) provocando los mismos efectos (Chun et al., 2010; Mendelson et al., 2014). La adición de 1 μ M de S1P a células de epitelio intestinal de rata en cultivo indujo una rápida activación de la vía de señalización ERK 1 / 2 y la expresión de c-myc, ciclina D1, E-Cad (Chen et al., 2017). La acción SK1/S1P (100 nM) regula a la sirtuina 1 (SIRT1), una proteasa desacetilasa dependiente de NAD⁺ que ejerce múltiples funciones celulares, para favorecer la proliferación y migración de células endoteliales (Gao et al., 2016). Por su parte, Guan et al (2011) encontraron que la regulación de la vía Akt / FOXO3a / Bim puede ser un mecanismo novedoso por el cual SK1 protege a las células de glioblastoma humano de la apoptosis. En CG de bovino en cultivo, se demostró que dosis bajas de S1P (0.1 μ M) favorecen la proporción de células en la fase G2 y M del ciclo celular lo que se traduce en un incremento en la proliferación de estas células (Hernández-Coronado et al., 2016). En este estudio, se constató por la prueba de MTT que la adición al medio de cultivo de 10 μ M del inhibidor de SK1, SKI-178 en presencia de 1ng/mL de FSH redujo el número de CG (P <0.05) a las 48 horas de incubación. Esto claramente indica el papel de S1P en la función, biogénesis mitocondrial y su relación con la viabilidad celular como otros autores lo han indicado en diversos tipos celulares (Czubowicz & Strosznajder, 2014; Czubowicz et al., 2019). La S1P incrementa la viabilidad de células de neuroblastoma SH-SY5Y por un mecanismo dependiente de S1PR1 y S1PR3 (Czubowicz & Strosznajder et al., 2014). De manera similar, en fibroblastos de ratón cultivados con un agonista selectivo de S1PR1 (Sew2871) se incrementaron los niveles de proteínas mitocondriales como el factor de transcripción A, citocromo oxidasa I, succinato deshidrogenasa y porina VDAC1 y con ello su viabilidad (Yambire et al., 2019). Adicionalmente, Agudo-López et al (2010) reportaron que, en células de neuroblastoma sometidas a privación de oxígeno y glucosa, la adición de 1 μ M de S1P incrementó la viabilidad en una manera dosis dependiente. Además, estos autores demostraron que S1P provoca la translocación de la PKC ϵ a la mitocondria para probablemente estimular sus funciones. Asimismo, se ha evaluado el efecto de S1P como segundo mensajero en la viabilidad celular. En

células intestinales de ratones jóvenes sometidas a estrés, demostraron que la SK1 se transloca del citoplasma a la mitocondria con el subsecuente incremento en la síntesis de S1P para activar la respuesta de las proteínas mitocondriales desplegadas con lo cual sugieren que favorece la acción mitocondrial y el buen funcionamiento de los tejidos (Kim & Sieburth, 2018). Adicionalmente, Tigyi (2018), demostró que S1P actúa como cofactor para la E3 ubiquitina ligasa TRAF2. La S1P interactúa con TRAF2 para regular el reclutamiento y estimulación de la cinasa I κ B para activar la transcripción del factor NF- κ B y favorecer la sobrevivencia. También, S1P favorece la viabilidad celular al unirse con alta afinidad a la prohibitina 2, una proteína altamente conservada que regula el ensamblaje y función mitocondrial (Tigyi, 2018). Nuestros resultados y las evidencias que se citan, indican que S1P actúa como mediador de los efectos de viabilidad provocados por FSH probablemente orquestando la activación y ensamblaje de los complejos proteicos mitocondriales para promover la viabilidad en las CG. Continuamos investigando si además de la viabilidad, S1P es mediador de la proliferación y sobrevivencia en las CG consecuencia de la estimulación de FSH y cuál es la señalización que sigue S1P para promover estos efectos biológicos.

Por otro lado, se ha evaluado la participación de S1P en la esteroidogénesis, principalmente en células adrenales (Prasad et al., 2017). En células adrenocorticales H295R, S1P (1 μ M) favorece la expresión de la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), la proteína translocadora de 18 kDa (TSPO), el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y el receptor eliminador de clase B tipo I (Lucki et al., 2012). Asimismo, Liu et al (2019) demostraron que S1P/S1PR2 estimulan la síntesis de cortisol en células H295R adrenocorticales a través de la vía ERK/SF-1. En contraste, nuestros resultados indican que la adición al medio de cultivo de SKI-178 (10 μ M) en presencia de 1ng/mL de FSH y del inhibidor solo, incrementaron la concentración de estradiol en el medio comparado con el control. La información que existe respecto al efecto de S1P en la esteroidogénesis de las CG es muy limitada. Un estudio en cultivo de CG luteinizadas de humano indicó que S1P (0.1 y 0.2 μ mol/L) no ejerce efecto estimulador en la síntesis de P4 después de las 24 h de exposición (Becker et al.,

2011). Por su parte, Paradiso et al., (2021) en CG luteinizadas de humano, demostró por primera vez que S1P a través de su receptor 1 y 3 induce la activación de la proteína CREB (elementos de respuesta a AMPc) encargada de regular la esteroidogénesis. Sin embargo, la adición de S1P (0.1 μ M) al medio durante 24 h de cultivo, no incrementó la síntesis de P4 en CG luteinizadas (Paradiso et al., 2019), evidencias que apoyan que S1P no presenta algún efecto sobre la esteroidogénesis. Por otro lado, se han observado algunas inconsistencias sobre los efectos de S1P con el uso de un inhibidor de SK1 (Kapitonov et al., 2009; Abuhusain et al., 2013; Neubauer et al., 2019). Por ejemplo, Abuhusain et al., (2013) evidenciaron que el uso de un inhibidor selectivo de SK1 (300 y 1000 nM), aparentemente incrementa la viabilidad de células de glioblastoma humano, además de incrementar en la expresión de S1P-fosfatasa. Estos autores concluyen que estas células fueron mantenidas en medio libre de suero y suplementado con FGFb y EGF, lo que les hace suponer que bajo estas condiciones las células preservan su genotipo (Abuhusain et al., 2013). Probablemente en nuestro caso ocurrió algo similar a lo descrito en las evidencias anteriores y por ello con la adición del inhibidor SKI-178 o con FSH más este inhibidor se tuvieron concentraciones similares de estradiol que cuando se adicionó solo FSH a los cultivos de CG.

Aunque también es probable que S1P no medie los efectos esteroidogénicos de FSH en CG de bovino en cultivo. Sin embargo, debido a que nuestros resultados reportan la concentración total de estradiol y probablemente no es suficiente para la comprensión completa de la participación de S1P en la esteroidogénesis en CG, nos encontramos investigando la expresión del ARNm de las enzimas esteroidogénicas, STAR y P450 aromatasas para poder esclarecer el papel de S1P como mediador de la esteroidogénesis de FSH en CG.

10. Conclusiones

- ◇ Corrobora que FSH participa como un inductor de la síntesis de S1P en células de la granulosa de bovino en cultivo y que esto ocurre a través de la activación de SK1.

- ◇ Se constata que S1P es un mediador de los efectos de viabilidad inducidos por FSH en células de la granulosa,
- ◇ Los resultados parciales indican que S1P, no parece mediar los efectos esteroidogénicos que ejerce FSH sobre las células de la granulosa

11. Bibliografía

- Abuhusain, H. J., Matin, A., Qiao, Q., Shen, H., Kain, N., Day, B. W., Stringer, B. W., Daniels, B., Laaksonen, M. A., & Teo, C. (2013). A metabolic shift favoring sphingosine 1-phosphate at the expense of ceramide controls glioblastoma angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(52), 37355–37364.
- Adada, M., Canals, D., Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2013). Sphingosine-1-phosphate receptor 2. *The FEBS Journal*, *280*(24), 6354–6366.
<https://doi.org/10.1111/febs.12446>
- Aerts, J. M. J., & Bols, P. E. J. (2010a). Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, *45*(1), 180–187. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01298.x>
- Aerts, J. M. J., & Bols, P. E. J. (2010b). Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *45*(1), 171–179. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x>
- Agudo-López, A., Miguel, B. G., Fernández, I., & Martínez, A. M. (2010). Involvement of mitochondria on neuroprotective effect of sphingosine-1-phosphate in cell death in an in vitro model of brain ischemia. *Neuroscience Letters*, *470*(2), 130–133.
- Alvarez, S. E., Harikumar, K. B., Hait, N. C., Allegood, J., Strub, G. M., Kim, E. Y., Maceyka, M., Jiang, H., Luo, C., & Kordula, T. (2010). Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature*, *465*(7301), 1084–1088.

- Anderson, R. C., Newton, C. L., & Millar, R. P. (2019). Small Molecule Follicle-Stimulating Hormone Receptor Agonists and Antagonists . In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, p. 757).
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00757>
- Andrade, G. M., Collado, M. del, Meirelles, F. V., Silveira, J. C. da, & Perecin, F. (2019). Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Animal Reproduction*, 16(3), 485–496.
- Arey, B. J., & López, F. J. (2011). Are circulating gonadotropin isoforms naturally occurring biased agonists? Basic and therapeutic implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 12(4), 275–288.
<https://doi.org/10.1007/s11154-011-9188-y>
- Argaves, K. M., Wilkerson, B. A., & Argaves, W. S. (2010). Sphingosine-1-phosphate signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *World Journal of Biological Chemistry*, 1(10), 291–297. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i10.291>
- Artal-Sanz, M., & Tavernarakis, N. (2009). Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(8), 394–401.
- Azawi, O. I., Ali, A. J., & Noaman, U. T. (2009). A study on the ovarian follicular dynamic in Iraqi Northern Buffaloes. *Tropical Animal Health and Production*, 41(1), 79–83. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9156-z>
- Baddela, V. S., Sharma, A., Michaelis, M., & Vanselow, J. (2020). HIF1 driven transcriptional activity regulates steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa cells. *Scientific Reports*, 10(1), 3906.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-60935-1>
- Bargi-Souza, P., Romano, R. M., Goulart-Silva, F., Brunetto, E. L., & Nunes, M. T. (2015). T3 rapidly regulates several steps of alpha subunit glycoprotein (CGA) synthesis and secretion in the pituitary of male rats: potential repercussions on TSH, FSH and LH secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 409, 73–81.
- Bartke, N., & Hannun, Y. A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl, S91-6.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R800080-JLR200>

- Baumgarten, S. C., Armouti, M., Ko, C., & Stocco, C. (2017). IGF1R Expression in Ovarian Granulosa Cells Is Essential for Steroidogenesis, Follicle Survival, and Fertility in Female Mice. *Endocrinology*, *158*(7), 2309–2318.
<https://doi.org/10.1210/en.2017-00146>
- 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.
- Becker, S., von Otte, S., Robenek, H., Diedrich, K., & Nofer, J.-R. (2011). Follicular Fluid High-Density Lipoprotein-Associated Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Promotes Human Granulosa Lutein Cell Migration via S1P Receptor Type 3 and Small G-Protein RAC11. *Biology of Reproduction*, *84*(3), 604–612.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084152>
- Beg, M. A., & Ginther, O. J. (2006). Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, *132*(3), 365–377.
<https://doi.org/10.1530/rep.1.01233>
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2008). *Bioquímica (Sexta)*. Reverté.
- Bernard, D. J., Fortin, J., Wang, Y., & Lamba, P. (2010). Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertility and Sterility*, *93*(8), 2465–2485.
- Bi, Y., Li, J., Ji, B., Kang, N., Yang, L., Simonetto, D. A., Kwon, J. H., Kamath, M., Cao, S., & Shah, V. (2014). Sphingosine-1-phosphate mediates a reciprocal signaling pathway between stellate cells and cancer cells that promotes pancreatic cancer growth. *The American Journal of Pathology*, *184*(10), 2791–2802. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.06.023>
- Björnström, L., & Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*, *19*(4), 833–842. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0486>
- Bliss, S. P., Navratil, A. M., Xie, J., & Roberson, M. S. (2010). GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *31*(3), 322–340.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.04.002>
- Bonhoure, E., Lauret, A., Barnes, D. J., Martin, C., Malavaud, B., Kohama, T., Melo, J. V., & Cuvillier, O. (2008). Sphingosine kinase-1 is a downstream regulator of imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 22(5), 971–979. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.95>
- Bouguen, G., Dubuquoy, L., Desreumaux, P., Brunner, T., & Bertin, B. (2015). Intestinal steroidogenesis. *Steroids*, 103, 64–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.022>
- Bousfield, G. R., May, J. V, Davis, J. S., Dias, J. A., & Kumar, T. R. (2018). In Vivo and In Vitro Impact of Carbohydrate Variation on Human Follicle-Stimulating Hormone Function . In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, p. 216). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00216>
- Bouskine, A., Nebout, M., Mograbi, B., Brücker-Davis, F., Roger, C., & Fenichel, P. (2008). Estrogens Promote Human Testicular Germ Cell Cancer through a Membrane-Mediated Activation of Extracellular Regulated Kinase and Protein Kinase A. *Endocrinology*, 149(2), 565–573. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1318>
- Brown, H. A. (2007). *Lipidomics and bioactive lipids: lipids and cell signaling*. Elsevier.
- Cahua-Pablo, J. Á., Flores-Alfaro, E., & Cruz, M. (2016). Receptor de estrógenos alfa en obesidad y diabetes. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social; Vol. 54, Núm. 4 (2016): Julio-Agosto*. http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista_medica/article/view/393/882
- Cai, L., Sun, A., Li, H., Tsinkgou, A., Yu, J., Ying, S., Chen, Z., & Shi, Z. (2015). Molecular mechanisms of enhancing porcine granulosa cell proliferation and function by treatment in vitro with anti-inhibin alpha subunit antibody. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 13, 26. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0022-3>
- Campo, S., Andreone, L., Ambao, V., Urrutia, M., Calandra, R. S., & Rulli, S. B. (2019). Hormonal Regulation of Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation in

- Males . In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10, p. 17).
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00017>
- Cao, C., Ding, Y., Kong, X., Feng, G., Xiang, W., Chen, L., Yang, F., Zhang, K., Chu, M., Wang, P., & Zhang, B. (2018). Reproductive role of miRNA in the hypothalamic-pituitary axis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *88*, 130–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.01.008>
- Casarini, L., & Crépieux, P. (2019). Molecular Mechanisms of Action of FSH. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 305. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00305>
- Cassier, E., Gallay, N., Bourquard, T., Claeysen, S., Bockaert, J., Crepieux, P., Poupon, A., Reiter, E., Marin, P., & Vandermoere, F. (2017). Phosphorylation of β -arrestin2 at Thr383 by MEK underlies β -arrestin-dependent activation of Erk1/2 by GPCRs. *Elife*, *6*, e23777.
- Castilho, A. C. S., Nogueira, M. F. G., Fontes, P. K., Machado, M. F., Satrapa, R. A., Razza, E. M., & Barros, C. M. (2014). Ovarian superstimulation using FSH combined with equine chorionic gonadotropin (eCG) upregulates mRNA-encoding proteins involved with LH receptor intracellular signaling in granulosa cells from Nelore cows. *Theriogenology*, *82*(9), 1199–1205.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.011>
- Castoria, G., Migliaccio, A., & Auricchio, F. (2009). Signaling-dependent nuclear export of estradiol receptor controls cell cycle progression in breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *308*(1), 26–31.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.01.006>
- Castoria, G., Migliaccio, A., Giovannelli, P., & Auricchio, F. (2010). Cell proliferation regulated by estradiol receptor: Therapeutic implications. *Steroids*, *75*(8), 524–527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.10.007>
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., & Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*, *138*(4), 628–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>
- Chalfant, C. E., & Spiegel, S. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *Journal of Cell Science*, *118*(20), 4605 LP – 4612. <https://doi.org/10.1242/jcs.02637>

- Chen, J., Tang, H., Sysol, J. R., Moreno-Vinasco, L., Shioura, K. M., Chen, T., Gorshkova, I., Wang, L., Huang, L. S., Usatyuk, P. V, Sammani, S., Zhou, G., Raj, J. U., Garcia, J. G. N., Berdyshev, E., Yuan, J. X.-J., Natarajan, V., & Machado, R. F. (2014). The Sphingosine Kinase 1/Sphingosine-1-Phosphate Pathway in Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(9), 1032–1043.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201401-0121OC>
- Chen, T., Huang, Z., Liu, R., Yang, J., Hylemon, P. B., & Zhou, H. (2017). Sphingosine-1 phosphate promotes intestinal epithelial cell proliferation via S1PR2. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 22, 596–608.
- Chun, J., Hla, T., Lynch, K. R., Spiegel, S., & Moolenaar, W. H. (2010). International union of basic and clinical pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 579–587.
- Ciani, E., Fontaine, R., Maugars, G., Nourizadeh-Lillabadi, R., Andersson, E., Bogerd, J., von Krogh, K., & Weltzien, F.-A. (2020). GnRH receptor gnhr2bba is expressed exclusively in lhb-expressing cells in Atlantic salmon male parr. *General and Comparative Endocrinology*, 285, 113293.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113293>
- Ciesiółka, S., Budna, J., Jopek, K., Bryja, A., Kranc, W., Borys, S., Jeseta, M., Chachuła, A., Ziółkowska, A., Antosik, P., Bukowska, D., Brüßow, K. P., Bruska, M., Nowicki, M., Zabel, M., & Kempisty, B. (2017). Time- and Dose-Dependent Effects of 17 Beta-Estradiol on Short-Term, Real-Time Proliferation and Gene Expression in Porcine Granulosa Cells. *BioMed Research International*, 2017, 9738640. <https://doi.org/10.1155/2017/9738640>
- Clarke, H. J. (2018). Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *WIREs Developmental Biology*, 7(1), e294.
<https://doi.org/10.1002/wdev.294>
- Cocco, C., Brancia, C., D'Amato, F., & Noli, B. (2014). Pituitary gonadotropins and autoimmunity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 385(1), 97–104.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.10.009>

- Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*, 19(3), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007>
- Czubowicz, K., Jęśko, H., Wencel, P., Lukiw, W. J., & Strosznajder, R. P. (2019). The Role of Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Molecular Neurobiology*, 56(8), 5436–5455. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1448-3>
- Czubowicz, K., & Strosznajder, R. (2014). Ceramide in the Molecular Mechanisms of Neuronal Cell Death. The Role of Sphingosine-1-Phosphate. *Molecular Neurobiology*, 50(1), 26–37. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8606-4>
- Dai, L., Xia, P., & Di, W. (2014). Sphingosine 1-phosphate: a potential molecular target for ovarian cancer therapy? *Cancer Investigation*, 32(3), 71–80. <https://doi.org/10.3109/07357907.2013.876646>
- Das, N., & Kumar, T. R. (2018). Molecular regulation of follicle-stimulating hormone synthesis, secretion and action. *Journal of Molecular Endocrinology*, 60(3), R131–R155. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0308>
- 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. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.175240>
- Devlin, T. M. (2019). *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. Reverté.
- Di Pardo, A., & Maglione, V. (2018). The S1P axis: new exciting route for treating Huntington's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(5), 468–480.
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, 30(6), 624–712.
- Escamilla-Hernandez, R., Little-Ihrig, L., Orwig, K. E., Yue, J., Chandran, U., & Zeleznik, A. J. (2008). Constitutively active protein kinase A qualitatively mimics the effects of follicle-stimulating hormone on granulosa cell differentiation. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 22(8), 1842–1852. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0103>
- 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. *Interciencia*, 32(2), 93–99.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33932204>
- Filardo, E. J., & Thomas, P. (2005). GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(8), 362–367.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.08.005>
- Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). *prepuberal en bovinos Development and follicular dynamics from fetal life until puberty in cattle Resumen Introducción*. 14–22.
- Flanagan, C. A., & Manilall, A. (2017). Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Structure and GnRH Binding. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 274.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00274>
- François, C. M., Petit, F., Giton, F., Gougeon, A., Ravel, C., Magre, S., Cohen-Tannoudji, J., & Guigon, C. J. (2017). A novel action of follicle-stimulating hormone in the ovary promotes estradiol production without inducing excessive follicular growth before puberty. *Scientific Reports*, 7(1), 46222.
<https://doi.org/10.1038/srep46222>
- Freeman, M. E. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *The Physiology of Reproduction*, 613–658.
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 116, 135–170.
<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Fujiwara, S., Terai, Y., Kawaguchi, H., Takai, M., Yoo, S., Tanaka, Y., Tanaka, T., Tsunetoh, S., Sasaki, H., Kanemura, M., Tanabe, A., Yamashita, Y., & Ohmichi, M. (2012). GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 5(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-5-35>
- Galina, H., & Valencia, J. (2008). *Reproducción de animales domésticos*. (Issue V390 GALr 3a. ed.).
- Gao, D., Rahbar, R., & Fish, E. N. (2016). CCL5 activation of CCR5 regulates cell metabolism to enhance proliferation of breast cancer cells. *Open Biology*, 6(6),

160122. <https://doi.org/10.1098/rsob.160122>
- Gao, Z., Wang, H., Xiao, F.-J., Shi, X.-F., Zhang, Y.-K., Xu, Q. Q., Zhang, X.-Y., Ha, X.-Q., & Wang, L.-S. (2016). SIRT1 mediates Sphk1/S1P-induced proliferation and migration of endothelial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *74*, 152–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.018>
- García-Figueroa, I., Candia, M. N., Pereda-Meira, C. M., & Laborí-Carda, C. M. (2015). Papel de los estrógenos y sus receptores en las enfermedades benignas y malignas prostáticas: Parte 1. *Revista Mexicana de Urología*, *75*(5), 283–291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.uromx.2015.06.007>
- García-Pacios, M., Collado, M. I., Busto, J. V, Sot, J., Alonso, A., Arrondo, J.-L. R., & Goñi, F. M. (2009). Sphingosine-1-phosphate as an amphipathic metabolite: its properties in aqueous and membrane environments. *Biophysical Journal*, *97*(5), 1398–1407.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., & Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*, *58*(4), 685–704.
- Ginther, O. J. (2016). The theory of follicle selection in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, *57*, 85–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.002>
- Glanowska, K. M., & Moenter, S. M. (2015). Differential regulation of GnRH secretion in the preoptic area (POA) and the median eminence (ME) in male mice. *Endocrinology*, *156*(1), 231–241. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1458>
- Gómez-Chang, E., Larrea, F., & Martínez-Montes, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis . In *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas* (Vol. 15, pp. 24–36). scielomx .
- Gomez-León, V., Ginther, O. J., Araujo, E. R., Guimarães, J. D., & Wiltbank, M. C. (2019). Hormonal mechanisms regulating follicular wave dynamics I: Comparison of follicle growth profiles under different physiological conditions in heifers. *Theriogenology*, *123*, 194–201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.006>

- Gomez-León, V E, Ginther, O. J., Guimarães, J. D., & Wiltbank, M. C. (2020). Hormonal mechanisms regulating follicular wave dynamics II: Progesterone decreases diameter at follicle selection regardless of whether circulating FSH or LH are decreased or elevated. *Theriogenology*, *143*, 148–156.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.003>
- Gomez-León, Victor E, Ginther, O. J., Domingues, R. R., Guimarães, J. D., & Wiltbank, M. C. (2020). Necessity for LH in selection and continued growth of the bovine dominant follicle. *Reproduction*, *159*(5), 559–569.
<https://doi.org/10.1530/REP-19-0342>
- Goñi-Urcelay, F. (2018). Esfingolípidos sencillos con actividad biológica, y sus propiedades físicas en membranas biológicas. *ANALES RANM*, *135*, 65–71.
<https://doi.org/DOI:> <http://dx.doi.org/10.32440/ar.2018.135.01.rev11>
- Goñi, F. M., Sot, J., & Alonso, A. (2014). *Biophysical properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids*. Portland Press Ltd.
- González-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., García-García, R. M., Cocero, M. J., & López-Sebastián, A. (2002). Patrones y mecanismos de control del desarrollo folicular durante la administración de protocolos superovulatorios en pequeños rumiantes (Revisión). *Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim*, *17*, 37–48.
- Gorga, A., Rindone, G., Regueira, M., Riera, M. F., Pellizzari, E. H., Cigorraga, S. B., Meroni, S. B., & Galardo, M. N. (2018). HIF involvement in the regulation of rat Sertoli cell proliferation by FSH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *502*(4), 508–514.
- Götz, F., Roske, Y., Schulz, M. S., Autenrieth, K., Bertinetti, D., Faelber, K., Zühlke, K., Kreuchwig, A., Kennedy, E. J., Krause, G., Daumke, O., Herberg, F. W., Heinemann, U., & Klussmann, E. (2016). AKAP18:PKA-R11 α structure reveals crucial anchor points for recognition of regulatory subunits of PKA. *Biochemical Journal*, *473*(13), 1881–1894.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160242>
- Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R., & Joëls, M. (2012). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology*,

350(2), 299–309.

- Guan, H., Song, L., Cai, J., Huang, Y., Wu, J., Yuan, J., Li, J., & Li, M. (2011). Sphingosine kinase 1 regulates the Akt/FOXO3a/Bim pathway and contributes to apoptosis resistance in glioma cells. *PloS One*, 6(5), e19946–e19946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019946>
- Gupta, P., Mohammad, T., Dahiya, R., Roy, S., Noman, O. M. A., Alajmi, M. F., Hussain, A., & Hassan, M. I. (2019). Evaluation of binding and inhibition mechanism of dietary phytochemicals with sphingosine kinase 1: Towards targeted anticancer therapy. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15.
- Gupta, S. C., Kim, J. H., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Reviews*, 29(3), 405–434. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9235-2>
- Gutierrez, C. G., Campbell, B. K., & Webb, R. (1997). Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction*, 56(3), 608–616.
- Guzel, Y., Bildik, G., & Oktem, O. (2018). Sphingosine-1-phosphate protects human ovarian follicles from apoptosis in vitro. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 222, 19–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.01.001>
- Guzmán, A., Rosales, A. M., & Hernandez, C. (2017). *Hormonas que regulan la reproducción* (Academica española (ed.)).
- Hagen-Euteneuer, N., Lütjohann, D., Park, H., Merrill Jr, A. H., & van Echten-Deckert, G. (2012). Sphingosine 1-phosphate (S1P) lyase deficiency increases sphingolipid formation via recycling at the expense of de novo biosynthesis in neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 9128–9136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302380>
- Hait, N., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G. M., Harikumar, K. B., Singh, S. K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., & Milstien, S. (2009). Regulation of

- histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science*, 325(5945), 1254–1257.
- Hait, N C, Avni, D., Yamada, A., Nagahashi, M., Aoyagi, T., Aoki, H., Dumur, C. I., Zelenko, Z., Gallagher, E. J., Leroith, D., Milstien, S., Takabe, K., & Spiegel, S. (2015). The phosphorylated prodrug FTY720 is a histone deacetylase inhibitor that reactivates ER α expression and enhances hormonal therapy for breast cancer. *Oncogenesis*, 4(6), e156–e156. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.16>
- Hait, Nitai C, & Maiti, A. (2017). The Role of Sphingosine-1-Phosphate and Ceramide-1-Phosphate in Inflammation and Cancer. *Mediators of Inflammation*, 2017, 4806541. <https://doi.org/10.1155/2017/4806541>
- Hait, Nitai 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.08.007>
- Hammond, G. L. (2011). Diverse Roles for Sex Hormone-Binding Globulin in Reproduction1. *Biology of Reproduction*, 85(3), 431–441. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092593>
- Han, Y., Xia, G., & Tsang, B. K. (2013). Regulation of Cyclin D2 Expression and Degradation by Follicle-Stimulating Hormone During Rat Granulosa Cell Proliferation In Vitro1. *Biology of Reproduction*, 88(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105106>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.06.020>
- Hannon, P. R., Brannick, K. E., Wang, W., Gupta, R. K., & Flaws, J. A. (2015). Di(2-ethylhexyl) phthalate inhibits antral follicle growth, induces atresia, and inhibits steroid hormone production in cultured mouse antral follicles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 284(1), 42–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.02.010>
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling:

- lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 139–150. <https://doi.org/10.1038/nrm2329>
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 175–191. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>
- Harikumar, K. B., Yester, J. W., Surace, M. J., Oyeniran, C., Price, M. M., Huang, W.-C., Hait, N. C., Allegood, J. C., Yamada, A., Kong, X., Lazear, H. M., Bhardwaj, R., Takabe, K., Diamond, M. S., Luo, C., Milstien, S., Spiegel, S., & Kordula, T. (2014). K63-linked polyubiquitination of transcription factor IRF1 is essential for IL-1-induced production of chemokines CXCL10 and CCL5. *Nature Immunology*, 15(3), 231–238. <https://doi.org/10.1038/ni.2810>
- Hernández-Coronado, C. G., Guzmán, A., Castillo-Juárez, H., Zamora-Gutiérrez, D., & Rosales-Torres, A. M. (2019). Sphingosine-1-phosphate (S1P) in ovarian physiology and disease. *Annales d'Endocrinologie*, 80(5), 263–272. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ando.2019.06.003>
- Hernandez-Coronado, C. G., Guzman, 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: An International Journal of Animal Bioscience*, 9(2), 308–312. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002341>
- Hernandez-Coronado, C. G., Guzman, A., Rodriguez, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.06.029>
- Hisano, Y., Kobayashi, N., Kawahara, A., Yamaguchi, A., & Nishi, T. (2011). The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720. *Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 1758–1766.
- Hoque, S. A. M., Kawai, T., Zhu, Z., & Shimada, M. (2019). Mitochondrial Protein Turnover Is Critical for Granulosa Cell Proliferation and Differentiation in Antral

- Follicles. *Journal of the Endocrine Society*, 3(2), 324–339.
<https://doi.org/10.1210/js.2018-00329>
- Hoque, S. A. M., Umehara, T., Kawai, T., & Shimada, M. (2021). Adverse effect of superoxide-induced mitochondrial damage in granulosa cells on follicular development in mouse ovaries. *Free Radical Biology and Medicine*, 163, 344–355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.434>
- Hsu, A., Zhang, W., Lee, J.-F., An, J., Ekambaram, P., Liu, J., Honn, K. V., Klinge, C. M., & Lee, M.-J. (2012). Sphingosine-1-phosphate receptor-3 signaling up-regulates epidermal growth factor receptor and enhances epidermal growth factor receptor-mediated carcinogenic activities in cultured lung adenocarcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 40(5), 1619–1626. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1379>
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.-J., & Azhar, S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism*, 7, 47. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-47>
- Huang, J., Xia, C., Zheng, X., Yi, T., Wang, X., Song, G., & Zhang, B. (2011). 17 β -Estradiol promotes cell proliferation in rat osteoarthritis model chondrocytes via PI3K/Akt pathway. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 16(4), 564–575. <https://doi.org/https://doi.org/10.2478/s11658-011-0023-y>
- Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F., Schwartz, J., & Rodgers, R. J. (2019). *Chapter 4 - Development of the Mammalian Ovary and Follicles* (P. C. K. Leung & E. Y. B. T.-T. O. (Third E. Adashi (eds.); pp. 71–82). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00004-2>
- Hunzicker-Dunn, M. E., Lopez-Biladeau, B., Law, N. C., Fiedler, S. E., Carr, D. W., & Maizels, E. T. (2012). PKA and GAB2 play central roles in the FSH signaling pathway to PI3K and AKT in ovarian granulosa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44), E2979–E2988.
- Hunzicker-Dunn, M., & Maizels, E. T. (2006). FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cellular Signalling*, 18(9), 1351–1359. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.02.011>

- Imron, M., Cipelang, B. E. T., Supriatna, I., & Setiadi, M. A. (2016). *Follicular dynamic and repeatability of follicular wave development in Peranakan Ongole (PO) cattle*.
- Inagaki, K., Otsuka, F., Miyoshi, T., Yamashita, M., Takahashi, M., Goto, J., Suzuki, J., & Makino, H. (2009). p38-Mitogen-Activated Protein Kinase Stimulated Steroidogenesis in Granulosa Cell-Oocyte Cocultures: Role of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4. *Endocrinology*, *150*(4), 1921–1930. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0851>
- Jaffe, L. A., & Egbert, J. R. (2017). Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle. *Annual Review of Physiology*, *79*(1), 237–260. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034102>
- Jee, B. C., Lee, J. R., Youm, H., Suh, C. S., Kim, S. H., & Moon, S. Y. (2010). Effect of sphingosine-1-phosphate supplementation on follicular integrity of vitrified–warmed mouse ovarian grafts. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *152*(2), 176–180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2010.06.019>
- Jiang, L. I., Collins, J., Davis, R., Lin, K.-M., DeCamp, D., Roach, T., Hsueh, R., Rebres, R. A., Ross, E. M., & Taussig, R. (2007). Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(14), 10576–10584.
- Jung-Chien, C., Chang, H.-M., Liu, P.-P., & Leung, P. C. K. (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. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.03.006>
- Kajimoto, T., Mohamed, N. N. I., Badawy, S. M. M., Matovelo, S. A., Hirase, M., Nakamura, S., Yoshida, D., Okada, T., Ijuin, T., & Nakamura, S. (2018). Involvement of Gβγ subunits of Gi protein coupled with S1P receptor on multivesicular endosomes in F-actin formation and cargo sorting into exosomes. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(1), 245–253.

- Kanda, N., & Watanabe, S. (2003). 17β -Estradiol Inhibits Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Keratinocytes by Promoting Bcl-2 Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, *121*(6), 1500–1509.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1523-1747.2003.12617.x>
- Kanitz, W. (2003). Follicular dynamic and ovulation in cattle - A review. *Archiv Fur Tierzucht*, *46*, 187–198. [https://doi.org/DOI: 10.5194/aab-46-187-2003](https://doi.org/DOI:10.5194/aab-46-187-2003)
- Kapitonov, D., Allegood, J. C., Mitchell, C., Hait, N. C., Almenara, J. A., Adams, J. K., Zipkin, R. E., Dent, P., Kordula, T., & Milstien, S. (2009). Targeting sphingosine kinase 1 inhibits Akt signaling, induces apoptosis, and suppresses growth of human glioblastoma cells and xenografts. *Cancer Research*, *69*(17), 6915–6923.
- Karaer, A., Tuncay, G., Mumcu, A., & Dogan, B. (2019). Metabolomics analysis of follicular fluid in women with ovarian endometriosis undergoing in vitro fertilization. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *65*(1), 39–47.
<https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1478469>
- Kim, S., & Sieburth, D. (2018). Sphingosine Kinase Activates the Mitochondrial Unfolded Protein Response and Is Targeted to Mitochondria by Stress. *Cell Reports*, *24*(11), 2932-2945.e4.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.037>
- Koç, İ., Baydemir, G., Bayram, E., Yavuz, H., & Denizli, A. (2011). Selective removal of 17β -estradiol with molecularly imprinted particle-embedded cryogel systems. *Journal of Hazardous Materials*, *192*(3), 1819–1826.
- Kolesnick, R. (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, *110*(1), 3–8.
- Kurano, M., Ikeda, H., Iso-O, N., Hara, M., Tsukamoto, K., & Yatomi, Y. (2018). Regulation of the metabolism of apolipoprotein M and sphingosine 1-phosphate by hepatic PPAR γ activity. *Biochemical Journal*, *475*(12), 2009–2024.
- La Colla, A., Vasconsuelo, A., Milanesi, L., & Pronsato, L. (2017). 17β -Estradiol Protects Skeletal Myoblasts From Apoptosis Through p53, Bcl-2, and FoxO

- Families. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(1), 104–115.
- Lamminmäki, U., Villoutreix, B. O., Jauria, P., Saviranta, P., Vihinen, M., Nilsson, L., Teleman, O., & Lövgren, T. (1997). Structural analysis of an anti-estradiol antibody. *Molecular Immunology*, 34(16), 1215–1226.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(97\)00085-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0161-5890(97)00085-0)
- Landry, D. A., & Sirard, M.-A. (2018). Follicle capacitation: A meta-analysis to investigate the transcriptome dynamics following FSH decline in bovine granulosa cells. *Biology of Reproduction*.
- Leão, R. B. F., & Esteves, S. C. (2014). Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics*, 69(1807–5932), 279–293.
[https://doi.org/http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2014\(04\)10](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2014(04)10).
- Lebesgue, D., Chevaleyre, V., Zukin, R. S., & Etgen, A. M. (2009). Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: Multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids*, 74(7), 555–561.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.01.003>
- Leung, P., & Adashi, E. (2018). *The Ovary* (Third Edit). Academic Press.
- Li, C., Zhou, J., Liu, Z., Zhou, J., Yao, W., Tao, J., Shen, M., & Liu, H. (2020). FSH prevents porcine granulosa cells from hypoxia-induced apoptosis via activating mitophagy through the HIF-1 α -PINK1-Parkin pathway. *The FASEB Journal*, 34(3), 3631–3645. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.201901808RRR>
- Li, F., Turan, V., Lierman, S., Cuvelier, C., De Sutter, P., & Oktay, K. (2014). Sphingosine-1-phosphate prevents chemotherapy-induced human primordial follicle death. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(1), 107–113.
<https://doi.org/10.1093/humrep/det391>
- Li, H., & Chian, R.-C. (2017). Follicular development and oocyte growth. In *Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes* (pp. 37–57). Springer.
- Li, S., Chen, J., Fang, X., & Xia, X. (2017). Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to inhibit chemotherapy induced human granulosa cell apoptosis. *Gynecological Endocrinology*, 33(6), 476–479.
<https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1290072>

- Li, Y., Fortin, J., Ongaro, L., Zhou, X., Boehm, U., Schneyer, A., Bernard, D. J., & Lin, H. Y. (2018). Betaglycan (TGFBR3) functions as an inhibin A, but not inhibin B, coreceptor in pituitary gonadotrope cells in mice. *Endocrinology*, *159*(12), 4077–4091.
- Limaye, V., Li, X., Hahn, C., Xia, P., Berndt, M., Vadas, M., & Gambie, J. (2005). Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood*, *105*, 3169–3177.
- Liu, L., Panzitt, K., Racedo, S., Wagner, M., Platzter, W., Zaufel, A., Theiler-Schwetz, V., Obermayer-Pietsch, B., Müller, H., Höfler, G., Heinemann, A., Zollner, G., & Fickert, P. (2019). Bile acids increase steroidogenesis in cholemic mice and induce cortisol secretion in adrenocortical H295R cells via S1PR2, ERK and SF-1. *Liver International*, *39*(11), 2112–2123.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/liv.14052>
- Liu, Z.-Q., Shen, M., Wu, W.-J., Li, B.-J., Weng, Q.-N., Li, M., & Liu, H.-L. (2015). Expression of PUMA in Follicular Granulosa Cells Regulated by FoxO1 Activation During Oxidative Stress. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, *22*(6), 696–705. <https://doi.org/10.1177/1933719114556483>
- Loh, K. C., Leong, W.-I., Carlson, M. E., Oskouian, B., Kumar, A., Fyrst, H., Zhang, M., Proia, R. L., Hoffman, E. P., & Saba, J. D. (2012). Sphingosine-1-phosphate enhances satellite cell activation in dystrophic muscles through a S1PR2/STAT3 signaling pathway. *PloS One*, *7*(5), e37218–e37218.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037218>
- 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.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.003>
- Lucki, N. C., & Sewer, M. B. (2008). Multiple roles for sphingolipids in steroid hormone biosynthesis. *Sub-Cellular Biochemistry*, *49*, 387–412.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8831-5_15

- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.003>
- Maceyka, M., Payne, S. G., Milstien, S., & Spiegel, S. (2002). Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585(2–3), 193–201.
- Maczys, M., Milstien, S., & Spiegel, S. (2016). Sphingosine-1-phosphate and estrogen signaling in breast cancer. *Advances in Biological Regulation*, 60, 160–165.
- Magoffin, D. A. (2005). Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(7), 1344–1349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.016>
- Maiti, A., Takabe, K., & Hait, N. C. (2017). Metastatic triple-negative breast cancer is dependent on SphKs/S1P signaling for growth and survival. *Cellular Signalling*, 32, 85–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.01.021>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381–405. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Marín-Palma, D., Taborda, N. A., Urcuqui-Inchima, S., & Hernandez, J. C. (2017). Inflamación y respuesta inmune innata: participación de las lipoproteínas de alta densidad. *Iatreia*, 30(4), 423–435.
- Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., & Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 44–50.
- Matvere, A., Teino, I., Varik, I., Kuuse, S., Tiido, T., Kristjuhan, A., & Maimets, T. (2019). FSH/LH-Dependent Upregulation of Ahr in Murine Granulosa Cells Is Controlled by PKA Signaling and Involves Epigenetic Regulation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 12).

<https://doi.org/10.3390/ijms20123068>

- Medlin, M. D., Staus, D. P., Dubash, A. D., Taylor, J. M., & Mack, C. P. (2010). Sphingosine 1-phosphate receptor 2 signals through leukemia-associated RhoGEF (LARG), to promote smooth muscle cell differentiation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *30*(9), 1779–1786. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.209395>
- Meher, B. R., Dixit, A., Bousfield, G. R., & Lushington, G. H. (2015). Glycosylation Effects on FSH-FSHR Interaction Dynamics: A Case Study of Different FSH Glycoforms by Molecular Dynamics Simulations. *PloS One*, *10*(9), e0137897–e0137897. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137897>
- Mei-Hong, L., Sanchez, T., Yamase, H., Hla, T., Oo, M. L., Pappalardo, A., Lynch, K. R., Lin, C.-Y., & Ferrer, F. (2009). S1P/S1P1 signaling stimulates cell migration and invasion in Wilms tumor. *Cancer Letters*, *276*(2), 171–179.
- Mendelson, K., Evans, T., & Hla, T. (2014). Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development (Cambridge, England)*, *141*(1), 5–9. <https://doi.org/10.1242/dev.094805>
- Mendoza, A., Fang, V., Chen, C., Serasinghe, M., Verma, A., Muller, J., Chaluvadi, V. S., Dustin, M. L., Hla, T., Elemento, O., Chipuk, J. E., & Schwab, S. R. (2017). Lymphatic endothelial S1P promotes mitochondrial function and survival in naive T cells. *Nature*, *546*(7656), 158–161. <https://doi.org/10.1038/nature22352>
- Meng, Y., Xu, Z., Wu, F., Chen, W., Xie, S., Liu, J., Huang, X., & Zhou, Y. (2014). Sphingosine-1-phosphate suppresses cyclophosphamide induced follicle apoptosis in human fetal ovarian xenografts in nude mice. *Fertility and Sterility*, *102*(3), 871-877.e3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.040>
- Merscher, S., & Fornoni, A. (2014). Podocyte Pathology and Nephropathy – Sphingolipids in Glomerular Diseases . In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 5, p. 127). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2014.00127>
- Meyer, D., Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J. H., Tigyi, G., & Jakobs, K. H. (2003). Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-

- phosphate causes Ca²⁺ mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS Letters*, 554(3), 443–449.
- Meyer, M. R., Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascular Pharmacology*, 55(1), 17–25.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vph.2011.06.003>
- Mihm, M., & Bleach, E. C. L. (2003). Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, 78(3), 217–237.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00092-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00092-7)
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*, 32(1), 81–151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>
- Montaño, E. L., & Ruiz Cortés, Z. T. (2005). ¿Por qué no ovulan los primeros folículos dominantes de las vacas cebú posparto en el trópico colombiano? *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2), 127–135.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295022959004>
- Moore, A. M., Prescott, M., & Campbell, R. E. (2013). Estradiol Negative and Positive Feedback in a Prenatal Androgen-Induced Mouse Model of Polycystic Ovarian Syndrome. *Endocrinology*, 154(2), 796–806.
<https://doi.org/10.1210/en.2012-1954>
- Morales, A., Lee, H., Goñi, F. M., Kolesnick, R., & Fernandez-Checa, J. C. (2007). Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 923–939.
<https://doi.org/10.1007/s10495-007-0721-0>
- Murugananthan, M., Yoshihara, S., Rakuma, T., Uehara, N., & Shirakashi, T. (2007). Electrochemical degradation of 17β-estradiol (E2) at boron-doped diamond (Si/BDD) thin film electrode. *Electrochimica Acta*, 52(9), 3242–3249.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.09.073>
- Nakahara, T., Iwase, A., Nakamura, T., Kondo, M., Bayasula, Kobayashi, H., Takikawa, S., Manabe, S., Goto, M., Kotani, T., & Kikkawa, F. (2012). Sphingosine-1-phosphate inhibits H₂O₂-induced granulosa cell apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway. *Fertility and Sterility*, 98(4), 1001-8.e1.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.008>

- Navakanitworakul, R., Hung, W.-T., Gunewardena, S., Davis, J. S., Chotigeat, W., & Christenson, L. K. (2016). Characterization and Small RNA Content of Extracellular Vesicles in Follicular Fluid of Developing Bovine Antral Follicles. *Scientific Reports*, 6(1), 25486. <https://doi.org/10.1038/srep25486>
- Navarro, A., Torrejón, R., Báñez, M. J., López-Cepero, J. M., & Boveris, A. (2005). Mitochondrial function and mitochondria-induced apoptosis in an overstimulated rat ovarian cycle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 289(6), E1101–E1109.
- Neganova, I., Cotts, L., Banks, P., Gassner, K., Shukurov, A., Armstrong, L., Ladds, G., & Lako, M. (2019). Endothelial Differentiation G Protein-Coupled Receptor 5 Plays an Important Role in Induction and Maintenance of Pluripotency. *STEM CELLS*, 37(3), 318–331. <https://doi.org/10.1002/stem.2954>
- Neubauer, H. A., Tea, M. N., Zebol, J. R., Gliddon, B. L., Stefanidis, C., Moretti, P. A. B., Pitman, M. R., Costabile, M., Kular, J., & Stringer, B. W. (2019). Cytoplasmic dynein regulates the subcellular localization of sphingosine kinase 2 to elicit tumor-suppressive functions in glioblastoma. *Oncogene*, 38(8), 1151–1165.
- Nishi, T., Kobayashi, N., Hisano, Y., Kawahara, A., & Yamaguchi, A. (2014). Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(5), 759–765. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.07.012>
- Obinata, H., & Hla, T. (2019). Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *International Immunology*, 31(9), 617–625. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz037>
- Ogretmen, B., & Hannun, Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4(8), 604–616. <https://doi.org/10.1038/nrc1411>
- Ohotski, J., Long, J. S., Orange, C., Elsberger, B., Mallon, E., Doughty, J., Pyne,

- S., Pyne, N. J., & Edwards, J. (2012). Expression of sphingosine 1-phosphate receptor 4 and sphingosine kinase 1 is associated with outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *British Journal of Cancer*, *106*(8), 1453–1459. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.98>
- Olivera, A., Eisner, C., Kitamura, Y., Dillahun, S., Allende, L., Tuymetova, G., Watford, W., Meylan, F., Diesner, S. C., & Li, L. (2010). Sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate receptor 2 are vital to recovery from anaphylactic shock in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(5), 1429–1440.
- Ortega-Domínguez, B., Herrera-Ramírez, M., & Tecalco-Cruz, A. C. (2015). RECEPTORES NUCLEARES: DEL NÚCLEO AL CITOPLASMA. *TIP*, *18*(2), 131–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.005>
- Padmanabhan, V., & Cardoso, R. C. (2020). Neuroendocrine, autocrine, and paracrine control of follicle-stimulating hormone secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *500*, 110632. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110632>
- Palermo, R. (2007). Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, *15*(3), 326–337.
- Pandey, D. P., Lappano, R., Albanito, L., Madeo, A., Maggiolini, M., & Picard, D. (2009). Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *The EMBO Journal*, *28*(5), 523–532. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.304>
- Pappu, R., Schwab, S. R., Cornelissen, I., Pereira, J. P., Regard, J. B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y.-W., Huang, Y., Cyster, J. G., & Coughlin, S. R. (2007). Promotion of Lymphocyte Egress into Blood and Lymph by Distinct Sources of Sphingosine-1-Phosphate. *Science*, *316*(5822), 295 LP – 298. <https://doi.org/10.1126/science.1139221>
- Paradiso, E., Lazzaretti, C., Riccetti, L., Sperduti, S., Antoniani, F., Brigante, G., De Feo, G., Morini, D., Iannotti, F., & Simoni, M. (2019). Sphingosine-1-phosphate induces cAMP/PKA-independent pCREB activation, but not steroidogenesis, in human granulosa cells. *21st European Congress of Endocrinology*, 63.

- Paradiso, E., Lazzaretti, C., Sperduti, S., Antoniani, F., Fornari, G., Brigante, G., Di Rocco, G., Tagliavini, S., Trenti, T., Morini, D., Falbo, A. I., Villani, M. T., Nofer, J.-R., Simoni, M., Potì, F., & Casarini, L. (2021). Sphingosine-1 phosphate induces cAMP/PKA-independent phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) in granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *520*, 111082.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111082>
- Parham, K. A., Zebol, J. R., Tooley, K. L., Sun, W. Y., Moldenhauer, L. M., Cockshell, M. P., Gliddon, B. L., Moretti, P. A., Tigyi, G., & Pitson, S. M. (2015). Sphingosine 1-phosphate is a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- γ that regulates neoangiogenesis. *The FASEB Journal*, *29*(9), 3638–3653.
- Park, E.-S., Choi, S., Shin, B., Yu, J., Yu, J., Hwang, J.-M., Yun, H., Chung, Y.-H., Choi, J.-S., & Choi, Y. (2015). Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF)-interacting protein (TRIP) negatively regulates the TRAF2 ubiquitin-dependent pathway by suppressing the TRAF2-sphingosine 1-phosphate (S1P) interaction. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(15), 9660–9673.
- Pascual-Figal, D. A., Tornel, P. L., Nicolás, F., Sánchez-Más, J., Martínez, M. D., Gracia, M. R., Garrido, I. P., Ruipérez, J. A., & Valdés, M. (2009). Sex Hormone-Binding Globulin: A New Marker of Disease Severity and Prognosis in Men With Chronic Heart Failure. *Revista Española de Cardiología*, *62*(12), 1381–1387. [https://doi.org/10.1016/S1885-5857\(09\)73532-7](https://doi.org/10.1016/S1885-5857(09)73532-7)
- Patmanathan, S. N., Wang, W., Yap, L. F., Herr, D. R., & Paterson, I. C. (2017). Mechanisms of sphingosine 1-phosphate receptor signalling in cancer. *Cellular Signalling*, *34*, 66–75.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.03.002>
- Paulini, F., Silva, R. C., de Paula Rôlo, J. L. J., & Lucci, C. M. (2014). Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *Journal of Ovarian Research*, *7*(1), 102.
<https://doi.org/10.1186/s13048-014-0102-6>

- Pedram, A., Razandi, M., Wallace, D. C., & Levin, E. R. (2006). Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 17(5), 2125–2137. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-11-1013>
- Perez, G. I., Jurisicova, A., Matikainen, T., Moriyama, T., Kim, M.-R., Takai, Y., Pru, J. K., Kolesnick, R. N., & Tilly, J. L. (2005). A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline. *The FASEB Journal*, 19(7), 860–862. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2903fje>
- Ponce, Y., Ponce, A., Rodríguez, A., Universitario, H., Hernández, C., Santa, R., & Clara, V. (2013). *Las lipoproteínas de alta densidad : protectoras vasculares contra la aterosclerosis*. 5(4), 366–378.
- Ponikwicka-Tyszko, D., Chrusciel, M., Stelmaszewska, J., Bernaczyk, P., Sztachelska, M., Sidorkiewicz, I., Doroszko, M., Tomaszewski, J., Tapanainen, J. S., Huhtaniemi, I., Wolczynski, S., & Rahman, N. A. (2016). Functional Expression of FSH Receptor in Endometriotic Lesions. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(7), 2905–2914. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1014>
- Prasad, R., Hadjidemetriou, I., Maharaj, A., Meimaridou, E., Buonocore, F., Saleem, M., Hurcombe, J., Bierzynska, A., Barbagelata, E., Bergadá, I., Cassinelli, H., Das, U., Krone, R., Hacıhamdioglu, B., Sari, E., Yesilkaya, E., Storr, H. L., Clemente, M., Fernandez-Cancio, M., ... Metherell, L. A. (2017). Sphingosine-1-phosphate lyase mutations cause primary adrenal insufficiency and steroid-resistant nephrotic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 942–953. <https://doi.org/10.1172/JCI90171>
- Prieto, B., & Velazquez, M. (2003). FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN: HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS. *Revista de La Facultad de Medicina*, 45, 252–257.
- Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., & Sklar, L. A. (2007). GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265–266, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.010>
- Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Smith, H. O., Oprea, T. I., Sklar, L. A., &

- Hathaway, H. J. (2008). Estrogen Signaling through the Transmembrane G Protein–Coupled Receptor GPR30. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 165–190. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100518>
- Prossnitz, E. R., & Maggiolini, M. (2009). Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 308(1–2), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.03.026>
- Ptaszynska, M. (2008). *Compendium de reproducción animal* (Octava edi). Internet internacional.
- Pulli, I., Asghar, M. Y., Kemppainen, K., & Törnquist, K. (2018). Sphingolipid-mediated calcium signaling and its pathological effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(11, Part B), 1668–1677. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.04.012>
- Pyne, N. J., & Pyne, S. (2010). Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(7), 489–503. <https://doi.org/10.1038/nrc2875>
- Pyne, S., Adams, D. R., & Pyne, N. J. (2016). Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinases in health and disease: recent advances. *Progress in Lipid Research*, 62, 93–106.
- Rangel, L., & Hernandez, J. (2018). *Fisiología reproductiva de los animales domésticos* (1°). UNAM.
- Rangel, L., Rodríguez, A., Rojas, S., Sharp, P., & Gutierrez, C. (2009). Testosterone stimulates progesterone production and STAR, P450 cholesterol side-chain cleavage and LH receptor mRNAs expression in hen (*Gallus domesticus*) granulosa cells. In *Reproduction (Cambridge, England)* (Vol. 138). <https://doi.org/10.1530/REP-09-0071>
- Reyes, V. S. V., Pareto, S. C., González, S. S., García, S. C., Montero, M. I. S., Romero, O. M., Cruz, J. C. H., de la Jara Díaz, J. F., & Muñoz, E. R. (2010). Evaluación de la reserva ovárica. *Herramientas*, 2(4).
- Riboni, L., Abdel Hadi, L., Navone, S. E., Guarnaccia, L., Campanella, R., & Marfia, G. (2020). Sphingosine-1-Phosphate in the Tumor Microenvironment: A Signaling Hub Regulating Cancer Hallmarks. In *Cells* (Vol. 9, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/cells9020337>

- Riera, M. F., Regueira, M., Galardo, M. N., Pellizzari, E. H., Meroni, S. B., & Cigorruga, S. B. (2012). Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 302(8), E914–E923.
- Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid¹. *Biology of Reproduction*, 82(6), 1021–1029. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082941>
- Rodriguez, A. M., Graef, A. J., LeVine, D. N., Cohen, I. R., Modiano, J. F., & Kim, J.-H. (2015). Association of Sphingosine-1-phosphate (S1P)/S1P Receptor-1 Pathway with Cell Proliferation and Survival in Canine Hemangiosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(4), 1088–1097. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jvim.13570>
- Rohrbach, T., Maceyka, M., & Spiegel, S. (2017). Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate in liver pathobiology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(5), 543–553. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1337706>
- Rosales-Torres, A. M., Guzman-Sanchez, A., & Gutierrez, C. (2012). Follicular development in domestic ruminants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15, 147–160.
- Rosen, H., & Goetzl, E. J. (2005). Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nature Reviews Immunology*, 5(7), 560–570.
- Rosen, H., Gonzalez-Cabrera, P. J., Sanna, M. G., & Brown, S. (2009). Sphingosine 1-Phosphate Receptor Signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 743–768. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.072407.103733>
- Rosner, W. (2015). Free estradiol and sex hormone-binding globulin. *Steroids*, 99, 113–116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.005>
- Rosner, W., Hryb, D. J., Kahn, S. M., Nakhla, A. M., & Romas, N. A. (2010). Interactions of sex hormone-binding globulin with target cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316(1), 79–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.009>
- Roth, Z., & Hansen, P. J. (2004). Sphingosine 1-phosphate protects bovine

- oocytes from heat shock during maturation. *Biology of Reproduction*, 71(6), 2072–2078. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031989>
- Rouigny, A., Gloaguen, P., Langonné, N., Reiter, E., Crépieux, P., Poupon, A., & Froidevaux, C. (2018). A logic-based method to build signaling networks and propose experimental plans. *Scientific Reports*, 8(1), 7830. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26006-2>
- Royer, C., Lucas, T. F. G., Lazari, M. F. M., & Porto, C. S. (2012). 17Beta-Estradiol Signaling and Regulation of Proliferation and Apoptosis of Rat Sertoli Cells1. *Biology of Reproduction*, 86(4). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096891>
- Rutherford, C., Childs, S., Ohotski, J., McGlynn, L., Riddick, M., MacFarlane, S., Tasker, D., Pyne, S., Pyne, N. J., Edwards, J., & Palmer, T. M. (2013). Regulation of cell survival by sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 via reciprocal ERK-dependent suppression of Bim and PI-3-kinase/protein kinase C-mediated upregulation of Mcl-1. *Cell Death & Disease*, 4(11), e927–e927. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.455>
- Rybska, M., Knap, S., Jankowski, M., Jeseta, M., Bukowska, D., Antosik, P., Nowicki, M., Zabel, M., Kempisty, B., & Jaśkowski, J. M. (2018). Characteristic of factors influencing the proper course of folliculogenesis in mammals. *Medical Journal of Cell Biology*, 6(1), 33–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.2478/acb-2018-0006>
- Ryu, J. M., Baek, Y. Bin, Shin, M. S., Park, J. H., Park, S. H., Lee, J. H., & Han, H. J. (2014). Sphingosine-1-phosphate-induced Flk-1 transactivation stimulates mouse embryonic stem cell proliferation through S1P1/S1P3-dependent β -arrestin/c-Src pathways. *Stem Cell Research*, 12(1), 69–85.
- Saba, J. D., & Hla, T. (2004). Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circulation Research*, 94(6), 724–734.
- Sacchi, S., D'Ippolito, G., Sena, P., Marsella, T., Tagliasacchi, D., Maggi, E., Argento, C., Tirelli, A., Giulini, S., & La Marca, A. (2016). The anti-Müllerian hormone (AMH) acts as a gatekeeper of ovarian steroidogenesis inhibiting the granulosa cell response to both FSH and LH. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(1), 95–100. <https://doi.org/10.1007/s10815->

015-0615-y

- Sánchez, A. M., & Díaz-Laviada, I. (2006). *Papel de los esfingolípidos en la señalización celular*.
- Santacreu, B. J., Pescio, L. G., Romero, D. J., Corradi, G. R., Sterin-Speziale, N., & Favale, N. O. (2019). Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate regulate epithelial cell architecture by the modulation of de novo sphingolipid synthesis. *PLoS One*, *14*(3).
- Schubert, M., Pérez Lanuza, L., & Gromoll, J. (2019). Pharmacogenetics of FSH Action in the Male. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 47.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00047>
- Schulze, H., & Sandhoff, K. (2014). Sphingolipids and lysosomal pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1841*(5), 799–810. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.10.015>
- Selvam, S. P., De Palma, R. M., Oaks, J. J., Oleinik, N., Peterson, Y. K., Stahelin, R. V., Skordalakes, E., Ponnusamy, S., Garrett-Mayer, E., & Smith, C. D. (2015). Binding of the sphingolipid S1P to hTERT stabilizes telomerase at the nuclear periphery by allosterically mimicking protein phosphorylation. *Science Signaling*, *8*(381), ra58–ra58.
- Sever, R., & Glass, C. K. (2013). Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(3), a016709.
- Sevilhano, T., Carvalho, R. F. de, Oliveira, N. A. de J., Oliveira, J. E., Maltarollo, V. G., Trossini, G., Garcez, R., & Bartolini, P. (2017). Molecular cloning and characterization of pirarucu (*Arapaima gigas*) follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone β -subunit cDNAs. *PLoS One*, *12*(8), e0183545–e0183545.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183545>
- Shen, M., Jiang, Y., Guan, Z., Cao, Y., Li, L., Liu, H., & Sun, S.-C. (2017). Protective mechanism of FSH against oxidative damage in mouse ovarian granulosa cells by repressing autophagy. *Autophagy*, *13*(8), 1364–1385.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1327941>
- Shen, M., Jiang, Y., Guan, Z., Cao, Y., Sun, S.-C., & Liu, H. (2016). FSH protects mouse granulosa cells from oxidative damage by repressing mitophagy.

- Scientific Reports*, 6, 38090. <https://doi.org/10.1038/srep38090>
- Shen, Y., Zhao, S., Wang, S., Pan, X., Zhang, Y., Xu, J., Jiang, Y., Li, H., Zhang, Q., Gao, J., Yang, Q., Zhou, Y., Jiang, S., Yang, H., Zhang, Z., Zhang, R., Li, J., & Zhou, D. (2019). S1P/S1PR3 axis promotes aerobic glycolysis by YAP/c-MYC/PGAM1 axis in osteosarcoma. *EBioMedicine*, 40, 210–223. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.038>
- Shinjini, C., Vivek, C., Mrunal, C., Xunsheng, C., & B, B. W. (2020). Abstract P250: Sphingosine-1-phosphate Receptor Agonist And Very Low-density Lipoprotein Regulate Aldosterone Production Via Lipin-1 In Human Adrenocortical Cells. *Hypertension*, 76(Suppl_1), AP250–AP250. https://doi.org/10.1161/hyp.76.suppl_1.P250
- Shu, X., Wu, W., Mosteller, R. D., & Broek, D. (2002). Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 22(22), 7758–7768.
- Simpkins, J. W., Yang, S.-H., Sarkar, S. N., & Pearce, V. (2008). Estrogen actions on mitochondria--physiological and pathological implications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.013>
- Smith, P., Wilhelm, D., & Rodgers, R. J. (2014). Development of mammalian ovary. *Journal of Endocrinology*, 221(3), R145–R161. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0062>
- Smitz, J., Wolfenson, C., Chappel, S., & Ruman, J. (2015). Follicle-Stimulating Hormone: A Review of Form and Function in the Treatment of Infertility. *Reproductive Sciences*, 23(6), 706–716. <https://doi.org/10.1177/1933719115607992>
- 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–e19475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019475>
- Son, W. Y., Das, M., Shalom-Paz, E., & Holzer, H. (2011). Mechanisms of follicle

- selection and development. *Minerva Ginecologica*, 63(2), 89–102.
<http://europepmc.org/abstract/MED/21508900>
- Spiegel, S., & Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(5), 397–407.
<https://doi.org/10.1038/nrm1103>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.10.015>
- Stilley, J. A., Guan, R., Duffy, D. M., & Segaloff, D. L. (2014). Signaling Through FSH Receptors on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Promotes Angiogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(5), E813–E820. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3186>
- Strauss, J. F., & Williams, C. J. (2019). *Chapter 8 - Ovarian Life Cycle* (J. F. Strauss & R. L. B. T.-Y. and J. R. E. (Eighth E. Barbieri (eds.); pp. 167-205.e9). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>
- Swanson, R., & R Beasley, J. (2010). Pathway-specific, species, and sub-type counterscreening for better GPCR hits in high throughput screening. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(7), 757–763.
- 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. <https://doi.org/10.1124/pr.107.07113>
- Takabe, K., & Spiegel, S. (2014). Export of sphingosine-1-phosphate and cancer progression. *Journal of Lipid Research*, 55(9), 1839–1846.
- Takasugi, N., Sasaki, T., Suzuki, K., Osawa, S., Isshiki, H., Hori, Y., Shimada, N., Higo, T., Yokoshima, S., & Fukuyama, T. (2011). BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *Journal of Neuroscience*, 31(18), 6850–6857.
- Tata, J. R. (2002). Signalling through nuclear receptors. *Nature Reviews Molecular*

- Cell Biology*, 3(9), 702–710. <https://doi.org/10.1038/nrm914>
- Tigyi, G. J. B. T.-R. M. in B. S. (2018). *Lysophospholipid Receptors* ☆. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11136-5>
- Tsutsumi, R., & Webster, N. J. G. (2009). GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocrine Journal*, 56(6), 729–737. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k09e-185>
- Ulloa-Aguirre, A., Midgley Jr., A. R., Beitins, I. Z., & Padmanabhan, V. (1995). Follicle-Stimulating Isohormones: Characterization and Physiological Relevance. *Endocrine Reviews*, 16(6), 765–787. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-6-765>
- Ulloa-Aguirre, A., Reiter, E., & Crépieux, P. (2018). FSH Receptor Signaling: Complexity of Interactions and Signal Diversity. *Endocrinology*, 159(8), 3020–3035. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00452>
- Uribe-Velásquez, L. F., Correa-Orozco, A., & Osorio, J. H. (2009). Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*, 8(1), 117–131.
- Valdez-Morales, F. J., Vital-Reyes, V. S., Hinojosa-Cruz, J. C., & Cerbón, M. (2014). Funcionalidad y cambios endometriales asociados con la inducción de ovulación con citrato de clomifeno y FSH recombinante en mujeres con infertilidad. *Ginecología y Obstetricia de México*, 82(02), 143–153.
- van Meer, G., & Holthuis, J. C. M. (2000). Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1486(1), 145–170. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00054-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00054-8)
- Vanselow, J., & Fürbass, R. (2018). Epigenetic control of folliculogenesis and luteinization. *Animal Reproduction (AR)*, 7(3), 134.
- Vasconsuelo, A., Pronsato, L., Ronda, A. C., Boland, R., & Milanesi, L. (2011). Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids*, 76(12), 1223–1231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.08.001>
- Vásquez-Cano, J. F., & Olivera-A, M. (2010). Señalización Celular en el Folículo Antral Bovino. *Orinoquia. Redalyc. Colombia*, 2(14), 178–187.

- Voliotis, M., Garner, K. L., Alobaid, H., Tsaneva-Atanasova, K., & McArdle, C. A. (2018). Gonadotropin-releasing hormone signaling: An information theoretic approach. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *463*, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.028>
- Von Bischoffshausen, P. K., Hempe, I. S. G., & Rodrigo, D. M. (2019). Rol de los estrógenos en la génesis de los trastornos dolorosos músculo-esqueléticos articulares. In *Odontoestomatología* (Vol. 21, pp. 70–80). scielouy.
- Wang, D., Di, X., Wang, J., Li, M., Zhang, D., Hou, Y., Hu, J., Zhang, G., Zhang, H., Sun, M., Meng, X., Sun, B., Jiang, C., Ma, T., & Su, W. (2018). Increased Formation of Follicular Antrum in Aquaporin-8-Deficient Mice Is Due to Defective Proliferation and Migration, and Not Steroidogenesis of Granulosa Cells. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 9, p. 1193). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.01193>
- Wang, M., Zhang, Y., Feng, L., Zheng, J., Fan, S., Liu, J., Yang, N., Liu, Y., & Zuo, P. (2017). Compound porcine cerebroside and ganglioside injection attenuates cerebral ischemia–reperfusion injury in rats by targeting multiple cellular processes. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *13*, 927.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(13), 10166–10177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293274>
- Webb, R., Buratini, J., Hernandez-Medrano, J. H., Gutierrez, C. G., & Campbell, B. K. (2020). Follicle development and selection: past, present and future. *Animal Reproduction*, *13*(3).
- Wennerberg, E., Kremer, V., Childs, R., & Lundqvist, A. (2015). CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *64*(2), 225–235. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1629-5>
- Wide, L., & Eriksson, K. (2017). Molecular size and charge as dimensions to identify and characterize circulating glycoforms of human FSH, LH and TSH.

- Upsala Journal of Medical Sciences*, 122(4), 217–223.
- Williams, S. I., & de la Sota, R. L. (2017). Follicular dynamics and ovulation time in gilts and post-weaning sows. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 58(1), 65–69.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28042157>
- Xia, P., Wang, L., Moretti, P. A. B., Albanese, N., Chai, F., Pitson, S. M., D'Andrea, R. J., Gamble, J. R., & Vadas, M. A. (2002). Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor- α signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7996–8003.
- Yambire, K. F., Fernandez-Mosquera, L., Steinfeld, R., Mühle, C., Ikonen, E., Milosevic, I., & Raimundo, N. (2019). Mitochondrial biogenesis is transcriptionally repressed in lysosomal lipid storage diseases. *Elife*, 8, e39598.
- Yan, H., Yi, S., Zhuang, H., Wu, L., Wang, D. W., & Jiang, J. (2018). Sphingosine-1-phosphate ameliorates the cardiac hypertrophic response through inhibiting the activity of histone deacetylase-2. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(3), 1704–1714.
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G., & Muyan, M. (2016). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(1), 4–20. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>
- Yding Andersen, C., Bungum, L., Nyboe Andersen, A., & Humaidan, P. (2011). Preovulatory progesterone concentration associates significantly to follicle number and LH concentration but not to pregnancy rate. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(2), 187–195.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.04.003>
- Yoest, K., Cummings, J., & Becker, J. (2014). Estradiol, dopamine and motivation. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 14(2), 83–89.
- Yong-Seok, O., Bae, S. S., Park, J. B., Ha, S. H., Ryu, S. H., & Suh, P.-G. (2015). Mouse sphingosine kinase 1a is negatively regulated through conventional PKC-dependent phosphorylation at S373 residue. *PloS One*, 10(12).

- Young, J. M., & McNeilly, A. S. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, *140*(4), 489.
- Yu, X., Zhang, X., Dhakal, I. B., Beggs, M., Kadlubar, S., & Luo, D. (2012). Induction of cell proliferation and survival genes by estradiol-repressed microRNAs in breast cancer cells. *BMC Cancer*, *12*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-29>
- Yun, S. P., Lee, M. Y., Ryu, J. M., Song, C. H., & Han, H. J. (2009). Role of HIF-1 α and VEGF in human mesenchymal stem cell proliferation by 17 β -estradiol: involvement of PKC, PI3K/Akt, and MAPKs. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *296*(2), C317–C326.
- Zhang, H., Zhang, F., Zhu, M., Wang, J., Sheng, X., Yuan, Z., Han, Y., Watanabe, G., Taya, K., & Weng, Q. (2017). Seasonal expressions of follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor in the scented gland of the male muskrat (*Ondatra zibethicus*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *312*(4), R569–R574.
- Zhang, L., Zhang, X., Zhang, X., Lu, Y., Li, L., & Cui, S. (2017). MiRNA-143 mediates the proliferative signaling pathway of FSH and regulates estradiol production. *Journal of Endocrinology*, *234*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0488>
- Zheng, X., Li, W., Ren, L., Liu, J., Pang, X., Chen, X., Kang, D., Wang, J., & Du, G. (2019). The sphingosine kinase-1/sphingosine-1-phosphate axis in cancer: Potential target for anticancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, *195*, 85–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.10.011>
- Zhou, J., Lu, P., Ren, H., Zheng, Z., Ji, J., Liu, H., Jiang, F., Ling, S., Heng, B. C., Hu, X., & Ouyang, H. (2014). 17 β -Estradiol Protects Human Eyelid-Derived Adipose Stem Cells against Cytotoxicity and Increases Transplanted Cell Survival in Spinal Cord injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *18*(2), 326–343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jcmm.12191>
- Zhou, J. Y., Zhang, X. Y., Yu, M. L., Lu, S. F., & Chen, X. (2016). Effect of transcutaneous acupoint electrostimulation on serum sex hormone levels and expression of ovarian steroid hormone metabolic enzymes in polycystic ovary

- syndrome rats. *Zhen Ci Yan Jiu= Acupuncture Research*, 41(1), 11.
- 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 (Baltimore, Md.)*, 27(3), 511–523. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1307>
- Zhu, Q., Pan, P., Chen, X., Wang, Y., Zhang, S., Mo, J., Li, X., & Ge, R.-S. (2019). Human placental 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/steroid Δ 5,4-isomerase 1: Identity, regulation and environmental inhibitors. *Toxicology*, 425, 152253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152253>
- Zurita, E. D. (2015). *Regulación del ciclo de las vesículas sinápticas por sinaptotagminas*. Universidad de Sevilla.

