



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**MODULADORES DE LA PRODUCCIÓN DE S1P Y
EFECTOS DE ESTE ESFINGOLÍPIDO SOBRE LA
PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA DE CÉLULAS DE
LA GRANULOSA DE BOVINO**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

Cyndi Gabriela Hernández Coronado

COMITÉ TUTORAL

Directora:

Dra. Ana María Rosales Torres

Asesor:

Dr. Adrian Guzmán Sánchez

Asesora:

Dra. Marta Catalina Romano Pardo

Ciudad de México, diciembre del 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

**MODULADORES DE LA PRODUCCIÓN DE S1P Y EFECTOS DE ESTE
ESFINGOLÍPIDO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA DE
CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE BOVINO.**

La presente tesis fue realizada bajo la supervisión del comité tutorial indicado a continuación y aprobada como requisito en el plan de estudios para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

COMITÉ TUTORAL

Dra. Ana María Rosales Torres
Directora

Dr. Adrian Guzmán Sánchez
Asesor

Dra. Marta C. Romano Pardo
Asesora

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

Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Laboratorio de Patología Molecular de la unidad de Investigación Biomolecular en Cardiología. U.M.A.E. Hospital de Cardiología. Centro Médico Nacional Siglo XXI.

“El Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo consejo.

Durante el trabajo realizado en el programa del Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la UAM-Xochimilco recibí una beca otorgada por el CONACYT, con número de becario/CVU 373194/367907, durante el periodo 2013-2016.

El financiamiento de esta tesis fue otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de beca CB 158248 y por la Secretaría de Educación Pública con el número de beca UAM-X-CA-107.

TRABAJOS GENERADOS DE ESTA TESIS

Artículos en revistas indexadas

Hernández-Coronado CG, Guzmán A, Rodríguez A, Mondragón JA, Romano MC, Gutiérrez CG, Rosales-Torres AM. 2016. Sphingosine-1-phosphate, regulated by FSH and VEGF, stimulates granulosa cell proliferation. Gen Comp Endocrinol. 236:1-8. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.06.029.

Trabajos en congresos

Hernández CCG, Guzmán A, Ortega-Serrano PV, Romano PMC, Gutiérrez CG, Rodríguez A, Mondragón JA, Rosales TAM. Regulación de la síntesis de S1P y su efecto sobre la proliferación de células de la granulosa. LI Reuniones Nacionales de Investigación e Innovación Pecuaria, Agrícola, Forestal y Acuícola- Pesquera. Toluca Edo. Mex. Del 25-27 de noviembre del 2015.

Hernández-Coronado CG, Guzmán A, Romano-Pardo M.C, Gutiérrez C.G, Rodríguez A, Mondragón J. A, Rosales-Torres A.M. 2015. Follicle stimulate hormone and vascular endothelial growth factor increase the production of sphingosine-1-phosphate in cultured of bovine granulosa cells. The North American Society for Comparative Endocrinology. Canadá Ottawa. Del 22 al 25 de Junio del 2015.

Hernández-Coronado CG, Guzmán A, Romano-Pardo MC, Rodríguez A, Ortega-Serrano PV, Gutiérrez CG y Rosales-Torres AM. La hormona folículo estimulante (FSH) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) promueven la

proliferación de las células de la granulosa de bovino a través de la producción de esfingosina 1-fosfato (S1P). XX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. IX Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. XIV Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología. Molecular Veracruz, México 16-18, Marzo 2016.

Hernández-Coronado CG, Guzmán A, Rodríguez A, Zamora-Gutiérrez D, Torres AM. (2016). Esfingosina-1-fosfato promueve la proliferación y sobrevivencia de células de la granulosa de bovino vía la transactivación del VEGFR2. 5to Congreso y 1ª feria Técnico-científica del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la UAM-X con una duración de 20 h.

Dedicada a:

Dios

A mis amados padres, **Martha y Felipe**, porque sin su apoyo incondicional nunca hubiera llegado hasta donde estoy, por sus valores, consejos, motivaciones para superarme. Porque son un ejemplo a seguir, personas unidas, respetables que luchan y emiten esas ganas de salir adelante ante cualquier adversidad. Esto logro es gracias a ustedes!

A mi querido hermano **O. Felipe** porque sin querer, gracias a ti me di cuenta que en verdad puedo, porque me impulsaste a conseguir el objetivo deseado y fuiste desde mi niñez ese soporte e imagen académica.

Y finalmente, sin restarle absoluta importancia sino todo lo contrario. A mi adorado esposo **Luis**, porque has estado a mi lado desde hace más de una década, apoyándome directamente en esta travesía durante ya 2 años, porque en las buenas y en las malas me inyectas alegría, paz, amor y ganas de triunfar. Porque seguimos construyendo una historia y este logro es parte de toda nuestra trayectoria.

A todos ustedes les dedico este trabajo de más de 4 años
de entera dedicación y una total satisfacción.

Agradecimientos

A **Dios**.

A mi casa de estudios, la **Universidad Autónoma Metropolitana** por brindarme la oportunidad de seguir creciendo, desarrollarme como profesionista y también como persona.

A mis padres, hermano y esposo.

A la Dra. **Ana María Rosales Torres**, por haberme motivado desde hace ya 7 años en el inicio de la vida científica. Por ser un ejemplo a seguir en todos los ámbitos, confidente y porque gracias a su estímulo y dirección he logrado muchas satisfacciones en el ejercicio académico.

Al Dr. **Adrian Guzmán Sánchez**, por ser tan entregado en el trabajo, por transmitirme y fomentar esas ansias de conocer más allá de las cosas y por ser alguien en quien confiar en toda circunstancia.

A la Dra. **Marta Romano Pardo**, por sus consejos, aportaciones y por compartirme a nivel internacional el desenvolvimiento académico.

A la M.C **Ana Delia Rodríguez**, quien me transmitió toda esa habilidad y conocimiento, parte crucial y fundamental en la realización de esta labor académica.

A **Pamela Ortega**, por ser una persona incondicional, trabajadora, responsable, entregada, confidente y por su tiempo dedicado a una parte primordial en el éxito logrado en este trabajo.

Al Dr. **Carlos Gutiérrez**, quien dedicó gran parte de su tiempo y experiencia en la redacción del artículo científico. Pieza clave en este proyecto.

Al Dr. **José Antonio Mondragón**, con quien compartí desilusión, frustración, desesperación, ilusión e inmensa satisfacción en una parte importante de esta tesis.

Al Dr. **Catillo** por el análisis tan crítico.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Bioquímica de la Reproducción: **Diana**, por ser mi principal confidente, consejera, un apoyo incondicional y por ser una brillante colega, a **Jorge Antonio**, por ser con quien viví de cerca el doctorado, por su formidable amistad y confianza, a **Marina** y **Zay** por todos esos buenos momentos y anécdotas del día a día.

A mi gran amiga **Lily**, que desde la licenciatura ha estado en los mejores y peores momentos, quien entiende a la perfección el sufrimiento y la satisfacción que brindan los estudios de posgrado además de ser una gran consejera y confidente.

Al laboratorio de análisis instrumental de la UAM-X por su disposición en el desarrollo de una gran parte experimental especialmente al Dr. **Jesús** y la maestra **Bety** por su entrega y dedicación.

A mis compañeros del doctorado con quienes compartí cada trimestre los avances y retrocesos durante nuestro recorrido en el posgrado.

Al Dr. **Luis Arturo** y Dr. **Germán**, por su apoyo en la coordinación del posgrado y a todos los miembros de la comisión del **Doctorado en Ciencias Agropecuarias**.

A mis sinodales Dra. **Lucy**, Dr. **Vera** y Dr. **Heberth** por su tiempo y dedicación.

Al **CONACYT** por la beca otorgada.

De corazón, gracias!

Resumen

La esfingosina 1-fosfato (S1P) protege a las células de la granulosa y ovocitos frente a estrés oxidativo, además, folículos sanos poseen una concentración más alta respecto a los atrésicos. El objetivo de este trabajo fue determinar la importancia de S1P en la proliferación y sobrevivencia de células de la granulosa de bovino y si estos efectos son estimuladas por FSH y VEGF. Células de la granulosa (75,000) de folículos sanos de bovino fueron cultivadas con medio MacCoys 5a modificado (37°C, 5% de CO₂ y 95 % de humedad). Se incubaron con FSH (0, 0.1, 1 y 10 ng/ml) y VEGF (0, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml) para cuantificar por HPLC la concentración de S1P. El estímulo con 1 ng/ml de FSH y 0.01 ng/ml de VEGF mostraron una mayor concentración de S1P. Mediante Western Blot se demostró la expresión de la enzima SK1 responsable de la síntesis de S1P. Tanto FSH como VEGF incrementaron la expresión de SK1 ($P < 0.05$), mientras que la adición de un inhibidor (SK-178) redujo la síntesis de S1P. Con 0.1 μ M de S1P se incrementó el número de células de la granulosa ($P < 0.05$) y la proporción de células en la fase G2/M del ciclo celular ($P < 0.05$), mientras que 10 μ M la redujo por un incremento ($P < 0.05$) en las células hipodiploides. Finalmente, se encontró que S1P favorece la proliferación de las células de la granulosa a través de la transactivación del receptor 2 de VEGF (VEGFR2). En conclusión, este trabajo demuestra por primera vez la síntesis de S1P en células de la granulosa a través de FSH, VEGF y que S1P aumenta la proporción de células de la granulosa en la etapa G2/M del ciclo celular favoreciendo su proliferación y que sus efectos son mediados por la transactivación de VEGFR2.

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

Abstract

Sphingosine 1-phosphate (S1P) protects the cells of granulosa and oocytes against oxidative stress, in addition, the healthy follicles have a higher concentration respect to atresicos. The purpose of this work was to determine the importance of S1P in the proliferation and survival of bovine granulation cells and of these effects are stimulated by FSH and VEGF. Granulosa cells (75,000) from healthy bovine follicles were cultured in 96-well plates with modified MacCoys 5a medium (37 ° C, 5% CO₂ and 95% atmosphere). It was incubated with FSH (0, 0.1, 1 and 10 ng / ml) and VEGF (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ng / ml) to quantify the concentration of S1P by HPLC. Stimulation with 1 ng/ml FSH and 0.01 ng / ml VEGF showed a higher concentration of S1P. The Western blotting demonstrated the expression of the enzyme SK1, responsible for the synthesis of S1P. Both FSH and VEGF increased SK1 expression (P <0.05), while addition of an inhibitor (SK-178) reduced the S1P synthesis. With 0.1 μM of S1P, the number of granulosa cells (P <0.05) and the proportion of cells in the G2/M phase of the cell cycle (P <0.05) were increased, whereas 10 μM (P<0.05) in the Hypodiploid cells. Finally, S1P was found to promote the proliferation of granulosa cells through the transactivation of VEGF receptor 2 (VEGFR2). In conclusion, this work demonstrated for the first time the synthesis of S1P in granulosa cells via FSH, VEGF synthesized S1P and that S1P increases the proportion of granulation cells in the G2/M phase of the cell cycle favoring its proliferation and that its effects are mediated by the VEGFR2 transactivation.

Keywords: *Granulosa cell culture, Bovine, FSH, VEGF, S1P.*

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.	1
2. Marco teórico.	5
2.1. Aspectos generales del desarrollo folicular.	5
2.1.1. Reclutamiento.	6
2.1.2. Selección y dominancia.	7
2.2. Mecanismo de acción de las principales hormonas y factores de crecimiento que participan en el desarrollo folicular.	9
2.2.1. Gonadotropinas.	10
2.2.1.1. Estructura.	10
2.2.1.2. Síntesis.	11
2.2.1.3. Mecanismo de acción.	12
2.2.2. Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I).	16
2.2.2.1. Generalidades.	16
2.2.2.2. Mecanismo de acción.	18
2.2.3. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).	20
2.2.3.1. Generalidades.	20
2.2.3.2. Componentes.	21
2.2.3.3. Mecanismo de acción.	22
2.2.4. Estradiol.	25
2.2.4.1. Generalidades.	25
2.2.4.2. Mecanismo de acción.	28
2.2.5. Esfingolípidos (SLPs).	30
2.2.5.1. S1P (Estructura, síntesis y funciones).	32

2.2.5.2.	Mecanismo de acción de S1P.	35
2.2.5.2.1.	Intracelular.	35
2.2.5.2.2.	Extracelular.	39
2.2.5.3.	S1P y VEGF.	43
2.2.5.4.	S1P y desarrollo folicular.	44
2.2.5.5.	¿Por qué es importante realizar cultivos de células de la granulosa?	46
3.	Justificación.	48
4.	Pregunta de investigación.	49
5.	Hipótesis.	49
6.	Objetivo general.	49
7.	Objetivos particulares.	49
8.	Metodología.	51
8.1.	Diseño experimental.	51
8.2.	Colección de folículos y aislamiento de células de la granulosa.	52
8.3.	Cultivo de células de la granulosa.	53
8.4.	Experimento 1.	54
8.4.1.	Efecto de FSH y VEGF sobre la producción de esfingosina 1-fosfato.	54
8.4.2.	Extracción y cuantificación de S1P en medio de cultivo de células de la granulosa.	55
8.4.3.	Identificación de esfingosina cinasa 1 (SK1) en células de la granulosa mediante Western Blot.	57

8.4.4. Efecto de un inhibidor de esfingosina cinasa 1 (SK-178) sobre la producción de S1P por células de la granulosa.	58
8.5. Experimento 2.	59
8.5.1. Efecto de diferentes dosis de FSH y VEGF sobre el número de células de la granulosa.	59
8.5.2. Efecto de S1P sobre el número de células de la granulosa.	60
8.5.3. Determinación del número de células de la granulosa.	60
8.5.4. Efecto de FSH y VEGF sobre el número de células de la granulosa depende de la síntesis de S1P.	61
8.5.5. Efecto de S1P sobre el ciclo celular y la proporción de células de la granulosa hipodiploides mediante citometría de flujo.	62
8.6. Experimento 3.	62
8.6.1. Efecto de S1P sobre el mecanismo de transactivación del receptor 2 de VEGF (VEGFR2) en células de la granulosa.	62
8.7. Análisis estadístico.	63
9. Resultados.	65
9.1. La hormona folículo estimulante (FSH) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) incrementan la producción de S1P en células de la granulosa.	65
9.2. FSH y VEGF estimulan la fosforilación de esfingosina cinasa 1 (SK1) en células de la granulosa.	68
9.3. FSH y VEG incrementan el número de células de la granulosa en cultivo.	69
9.4. Esfingosina 1-fosfato incrementa el número de células de la granulosa <i>in vitro</i> .	70

9.5.	El efecto de FSH y VEGF sobre el número de células de la granulosa depende de la síntesis de S1P.	72
9.6.	Esfingosina 1-fosfato induce la proliferación de células de la granulosa en cultivo.	74
9.7.	S1P promueve la proliferación de células de la granulosa en cultivo mediante la transactivación de VEGFR2.	75
10.	Discusión.	77
11.	Conclusiones.	88
12.	Bibliografía.	89
13.	Artículo	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de un folículo antral.	6
Figura 2. Dinámica del desarrollo folicular ovárico en el bovino.	8
Figura 3. Aspectos fisiológicos más sobresalientes en células de la teca y células de la granulosa durante el desarrollo folicular.	16
Figura 4. Mecanismo de acción de IGF-1.	20
Figura 5. Mecanismo de acción del receptor 2 de VEGF.	24
Figura 6. Integración de la vía genómica y no genómica de estradiol (E2).	30
Figura 7. Estructura química de S1P.	33
Figura 8. Representación esquemática del metabolismo de SLPs y la síntesis de S1P.	34
Figura 9. Modelo de señalización de S1P.	38
Figura 10. Señalización del receptor de S1P.	40
Figura 11. Diseño experimental.	51
Figura 12. Representación esquemática de los tratamientos hormonales en la placa de cultivo.	55
Figura 13. Esquematización de la identificación de esfingosina 1- fosfato (S1P) en medio de cultivo de células de la granulosa de bovino.	57
Figura 14. Concentración de S1P en medio de cultivo de células de la granulosa de folículos bovinos de 4-7 mm de diámetro.	66
Figura 15. Concentración de S1P en medio de cultivo de células de la granulosa de folículos de bovinos de 4-7 mm de diámetro.	67
Figura 16. Análisis de Esfingosina cinasa 1 fosforilada (pSK1) mediante Western blot.	69
Figura 17. Efecto de diferentes dosis de la hormona folículo estimulante (FSH) y el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) sobre el número de células de la granulosa.	70
Figura 18. Efecto de esfingosina-1-fosfato (0, 0.1, 1 y 10 μ M) sobre el número de células de la granulosa.	71

- Figura 19.** Células de la granulosa de bovino después de 48 y 96 h de incubación con esfingosina-1- fosfato (S1P, 0.1 μ M), FSH (1 ng/mL) o la combinación de ambos. **72**
- Figura 20.** Efecto de un inhibidor de esfingosina cinasa 1 (SK-178) sobre el número de células de la granulosa de folículos de 4-7 mm de diámetro. **73**
- Figura 21.** Efecto de S1P (0, 0.1, 1 y 10) sobre la distribución de células de la granulosa en las diferentes etapas del ciclo celular así como, en presencia de 1 μ M de S1P y 1 ng/mL de FSH o su combinación. **75**
- Figura 22.** La S1P estimula la proliferación de células de la granulosa vía la transactivación del VEGFR2. **76**
- Figura 23.** La Hormona foliculoestimulante (FSH) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como moduladores de la producción de esfingosina 1-fosfato (S1P) y efecto de este esfingolípido sobre la proliferación y supervivencia de células de la granulosa. **89**

ABREVIATURAS

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

ATP: Adenosín trifosfato

bGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

C1B1: Proteína unidora de calcio e integrinas

C1P: Ceramida 1-fosfato

Cdc42: Proteínas reguladoras del ciclo celular

Cer: Ceramida

cIAP2: Inhibidor celular de la apoptosis

DAG: Diacilglicerol

E₂: Estradiol

EDG-1: Gen de diferenciación endotelial 1

EGF: Factor de crecimiento epidermal

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

EPAC: Factor de intercambio activado directamente por AMPc

ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares

FAK: Cinasas de adhesión focal

FF-HDLS: Lipoproteínas de alta densidad del líquido folicular

FGF- β : Factor de crecimiento transformante β

FLK1/KDR: fetal liver cinasa 1

Flt-1: fms-like tyrosine kinase 1

FSH: Hormona Foliculoestimulante

FSHR: Receptor de FSH

GDP: Guanosín difosfato

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GPCRs: Receptores de membrana acoplados a proteína C

Gsk-3 β : Glucógeno sintasa 3 β

GTP: Guanosín Trifosfato

HDAC1 y HDAC2: Desacetilasas de histona 1 y 2

HIF1- α : Factor inducible de hipoxia tipo 1

HRE: Elemento de respuesta a hormona

Hsp90: Proteína chaperona de golpe de calor

IGFBP: Proteínas de unión a IGF-I

IGF-I: Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I

IGFII/M6P: IGF-II Manosa 6 fosfato

IP3: Inositos trifosfato

IRS-1 y IRS-2: Sustrato del receptor de insulina 1 y 2

JNK: Cinasas c-Jun amino terminal

LBD: Dominio de unión al ligando, receptor estrógenos

LH: Hormona luteinizante

LHR: Receptor de LH

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

NFK- β : Factor nuclear β

P21: Inhibidor de ciclasas dependientes de ciclinas

P38 MAPK: proteínas activadas por mitógenos 38

P4: Progesterona

PAPP-A: Proteína plasmática asociada a la preñez

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaqueta

PI3K: fosfatidilinositol 3 cinasa

PIP2: fosfatidilinositol bifosfato

PKA: Proteína cinasa A

PKB: Proteína cinasa B

PKC: Proteína cinasa C

PLC: Fosfolipasa C

S1P: Esfingosina 1-fosfato

S1PRs: Receptores de S1P

SK: Esfingosina cinasa

SK1: Esfingoina cinasa 1

SK-178: Inhibidor de SK1

SKs: Esfingosinas cinasas

SLPs: Esfingolípidos

Sph: Esfingosina

Sphk1: Esfingosina cinasa 1 (SK1)

Sphk2: Esfingosina cinasa 2

Src: Proteína tirosina cinasa

STAR: Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRAF2: Receptor 2 asociado a TNF

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGFR2: Receptor 2 de VEGF

1. Introducción

El desarrollo folicular depende principalmente de la diferenciación, proliferación y supervivencia de las células foliculares (Rosales-torres et al., 2012). Existen hormonas y factores de crecimiento que promueven estos procesos dentro de los cuales destacan la hormona folículo estimulante (FSH) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; Aerts y Bols, 2010; Rosales-Torres et al., 2012). La FSH estimula el crecimiento folicular y la esteroidogénesis en células de la granulosa en etapas tempranas del desarrollo de folículos antrales y hasta la selección. La unión de FSH con su respectivo receptor acoplado a proteína Gs, incrementa la producción de AMP cíclico (AMPc) y con ello la activación de proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila a proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y a la fosfatidilinositol 3 cinasa (IP3K; Wulff et al., 2002; Vázquez y Olivera, 2010). Se ha visto que el bloqueo de la acción de FSH mediante la inyección de un anticuerpo en el día 1 del ciclo estral ocasionó detención del crecimiento de folículos reclutados y reduce las concentraciones de estrógenos en sangre (Ravindranath et al., 1989). Por su parte el VEGF estimula el crecimiento de folículos antrales y la proliferación de células de la granulosa (Doyle et al., 2010), además de reducir la expresión de caspasa 3 y el % de células apoptóticas. Tanto FSH como VEGF llevan a cabo estos efectos tróficos (proliferación y supervivencia de células de la granulosa, células de la teca) a través de la activación de la vía de señalización MAPK/ERK e IP3K (Fuller et al., 2002). Sin embargo, existen otras moléculas que favorecen la proliferación y supervivencia celular en el desarrollo de folículos antrales.

La esfingosina-1-fosfato (S1P), es un esfingolípido bioactivo y pleiotrópico que actúa como un ligando extracelular uniéndose a su receptor acoplado a proteína G y además promueve intracelularmente la transducción de vías de señalización relacionadas con la supervivencia y proliferación celular (Bartke and Hannum, 2009). Dentro de sus principales funciones destacan, inducir proliferación, supervivencia, migración celular, inflamación y angiogénesis en muchos tipos celulares (Daum et al., 2009; Bartke and Hannum, 2009; Mendelson et al., 2014). La síntesis de S1P depende de la fosforilación de esfingosinas-cinasas (SKs) en respuesta a factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF; Liu et al., 2012), el VEGF (Shu et al., 2002), vitaminas, esteroides como el 17 β estradiol (E₂; Sukocheva et al., 2006) y S1P por sí mismo (Spiegel and Milstein, 2003). Un estudio en células tumorales de vejiga en cultivo reveló que la adición de VEGF induce su proliferación a través de la activación de esfingosina cinasa 1 (SK1) lo cual incrementa a S1P por la estimulación de las vías RAS y ERK (Shu et al., 2002). Dentro de la célula S1P posee funciones antiapoptóticas y por ende de supervivencia, sin embargo, sus precursores, esfingosina (Sph) y Ceramida (Cer), están asociados con arresto en el ciclo celular y la muerte celular (Spiegel and Kolesnick, 2002; Van Broklyn y Williams, 2012). Los niveles de S1P son relativamente bajos y estrictamente se mantienen controlados por un balance entre su síntesis y degradación (Spiegel y Kolesnick, 2002). Dadas estas características, se ha adjudicado el nombre de reóstato de esfingolípidos entre S1P y sus precursores Sph y Cer, donde se ha postulado que es la relación en las

concentraciones y no la concentración individual, lo que determinará el destino de la célula (Kester y Kolesnik, 2003).

Recientemente se demostró que la producción de S1P en células de la granulosa y teca está asociada con la salud folicular (Hernández-Coronado et al., 2015). En este estudio se observó que en células de la granulosa y células de la teca de folículos dominantes sanos (8-17 mm) las concentraciones de S1P fueron 3 y 1.5 veces más altas respecto a células de folículos dominantes atrésicos (Hernández-Coronado et al., 2015). Por otro lado, en un estudio realizado con células de la granulosa luteinizadas de humano, S1P tuvo efecto protector en presencia de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (Nakahara et al., 2012).

De manera general existen evidencias acerca de la importancia de S1P en la función reproductiva. En ovocitos de bovino tratados *in vitro* con S1P tuvieron una tasa más alta de división y desarrollo de blastocistos que los ovocitos control, ambos grupos expuestos a choque térmico (Roth y Hansen, 2004). De igual manera el tratamiento de S1P dentro del saco bursal (estructura que rodea al ovario) ayudó a prevenir la pérdida masiva de ovocitos de ratones inducida por terapia de radiación (Morita et al., 2000; Jurisicova et al., 2006; Kaya et al., 2008). Finalmente en primates tratados con S1P o su análogo FTY720 durante una semana previo a irradiación ovárica favoreció la integridad de folículos ováricos y se reanudaron los ciclos menstruales pos-tratamiento (Zelinski et al., 2012).

Los efectos de S1P en células foliculares mostrados anteriormente indican que este esfingolípido puede promover la salud folicular, sin embargo hasta el momento no se conocían los mecanismos o las señales que reciben las células foliculares para

incrementar la producción de S1P ni el mecanismo que sigue ésta para favorecer la salud folicular.

En la actualidad, implementar técnicas como las de cultivo celular brinda una orientación sobre las acciones y efectos de una gran cantidad de moléculas dentro de una célula, además el uso de pruebas *in vitro* facilita el estudio de muchos procesos fisiológicos entre ellos el desarrollo folicular.

Lo anteriormente mencionado, nos permitió sugerir que S1P sumado a los efectos de FSH y VEGF estimula la sobrevivencia y proliferación de células de la granulosa en cultivo. Nosotros hipotetizamos que los factores tróficos que participan en el desarrollo folicular como FSH y VEGF regulan la producción de S1P en células de la granulosa de bovino y además que S1P promueve la sobrevivencia y proliferación de las mismas células en cultivo.

2. Marco Teórico

2.1. Aspectos generales del desarrollo folicular bovino

El folículo ovárico es la unidad estructural y funcional del ovario ya que en él se alberga la célula germinal femenina, “el ovocito”. Durante el proceso de desarrollo folicular, el ovocito madura y adquiere la capacidad de ser fertilizado (Motta et al., 2011). El folículo antral está conformado por células de la teca externa e interna, una capa basamental, células de la granulosa y una cavidad llena de extravasación y productos de la secreción de las células foliculares, llamado líquido folicular (LF; Rodgers y Rodgers, 2010., Figura 1). Las células de la teca tienen receptores a LH mientras que las células de la granulosa al inicio del desarrollo de un folículo antral poseen receptores para la hormona foliculoestimulante (FSH) y posteriormente adquieren también receptores para la hormona luteinizante (LH). Tanto la FSH como la LH promueven la sobrevivencia y proliferación de las células foliculares a lo largo del desarrollo de los folículos, de manera que la reducción del estímulo de estas hormonas puede desencadenar la atresia folicular (Friberg, 2009).

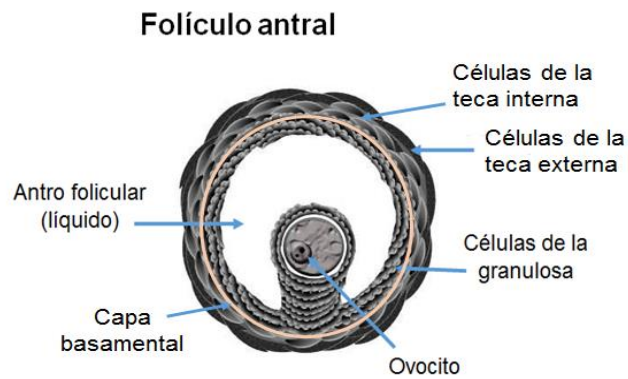


Figura 1. Representación esquemática de un folículo antral. Modificado de Rosales-Torres et al., (2012).

En la mayoría de las especies productivas (vaca, búfalo, oveja, cabra, caballos) y en la mujer, el desarrollo folicular ocurre con un patrón de ondas u olas (Rosell, 2004). Una vaca pueden presentar dos a tres olas de crecimiento folicular durante un ciclo estral. 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 ciclos de 3 ondas en los días 8-9 emerge la segunda y la tercera, el día 15 o 16 (Kanitz, 2003; Aerts y Bolts, 2010). Diversos autores dividen la dinámica folicular de cada onda en 3 fases: reclutamiento, selección y dominancia (Rosell, 2004; Vasquez y Olivera, 2010; Rosales-Torres et al., 2012).

2.1.1. Reclutamiento

Cada onda de desarrollo folicular involucra el restablecimiento en el crecimiento de una cohorte de folículos antrales pequeños (entre 5–10, aunque pueden ser hasta 24 folículos) con un diámetro de 4-5 mm (Aerts y Bols, 2010; Figura 2). El

crecimiento de estos folículos es estimulado por un pico transitorio de FSH (Rodgers y Rodgers, 2010) lo cual permite que uno de estos folículos alcance alrededor de 8.5 mm de diámetro para pasar a la siguiente etapa de crecimiento. Algunas otras moléculas que pueden participar en el crecimiento de este tipo de folículos son el factor de crecimiento parecido a insulina tipo I (IGF-I) y el Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), este último además de estimular la formación de vasos sanguíneos en el folículo, favorece el suministro de oxígeno y nutrientes (Shimizu et al., 2007), además de que estimulan la proliferación y sobrevivencia de las células de la granulosa (Doyle et al., 2010).

2.1.2. Selección y dominancia

Esta fase ocurre al final del periodo común de crecimiento, cuando uno de los folículos alcanza un diámetro de aproximadamente 8.5 mm y es seleccionado para continuar su crecimiento de entre los folículos de su misma cohorte (Sirard, 2016). Este proceso sucede de 2 - 2.5 días después del surgimiento de la onda folicular (Sirard, 2016). El folículo seleccionado como dominante posee una maquinaria molecular que le permite producir grandes cantidades de 17β estradiol (E_2) e inhibina ocasionando una retroalimentación negativa sobre FSH a nivel de la adenohipófisis (dominancia folicular). Además, el folículo seleccionado como dominante expresa mayor cantidad de receptores a FSH, y presenta receptores a LH en las células de la granulosa. Aquellos folículos que no posean estas características serán folículos subordinados que se eliminarán del ovario por el proceso de atresia (Clark et al., 2004; Figura 2). En ausencia de cuerpo lúteo activo

el folículo dominante produce una gran cantidad de estradiol para inducir vía retroalimentación positiva sobre la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), un pico de LH y la ovulación (Driancourt, 2001; Moore *et al*, 2006; Ptaszynska, 2008). En caso de que exista un cuerpo lúteo activo, los niveles circulantes de progesterona inhibirán la secreción de GnRH-LH y consecuentemente el folículo dominante no podrá ovular y también será eliminado del ovario por atresia (Vázquez y Olivera, 2010; Figura 2).

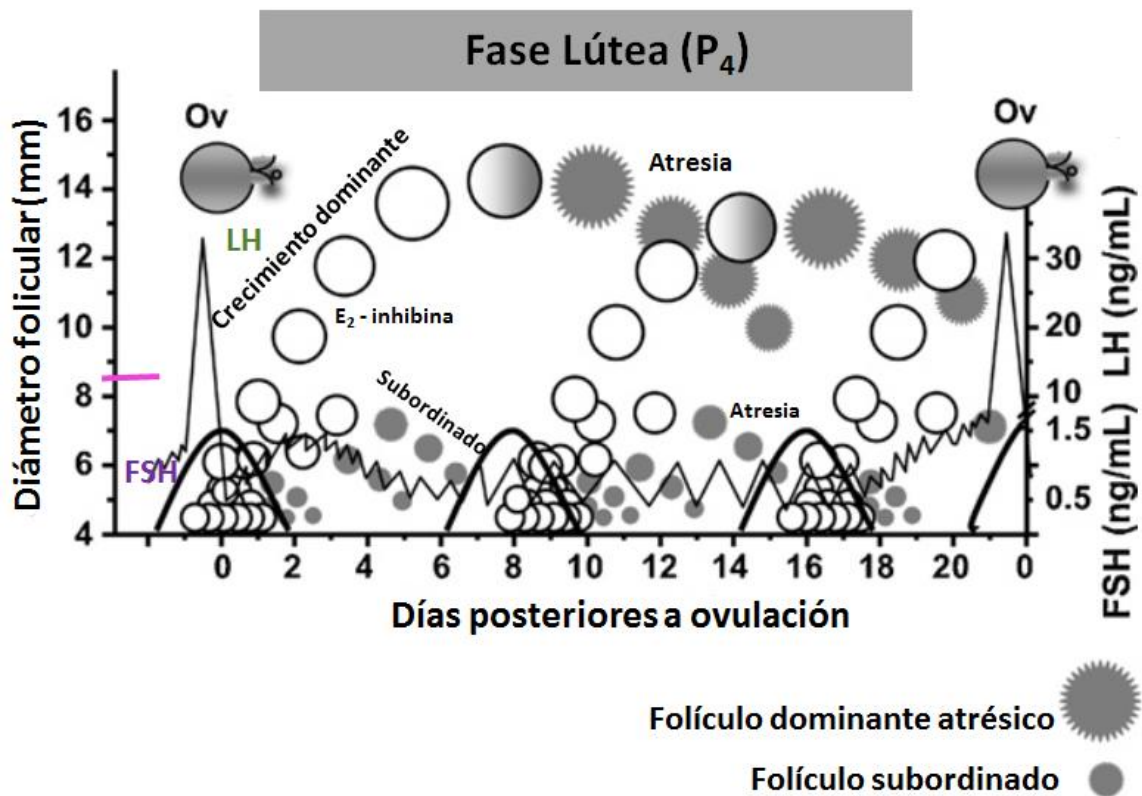


Figura 2. Dinámica del desarrollo folicular ovárico en el bovino. Hormona folículo estimulante (FSH), Hormona luteinizante (LH), inhibina y Estradiol (E2). Tomado de Aerts y Bolts, 2010.

Como se dijo antes, el desarrollo folicular es un proceso dinámico y complejo, caracterizado por la proliferación y diferenciación de las células foliculares, proporcionando un medio ambiente óptimo para la maduración del ovocito y su preparación para la fertilización después de la ovulación (Webb y Armstrong, 1998). Este proceso incluye señales endócrinas, parácrinas y autócrinas dentro del ovario, así como una comunicación con la hipófisis y el hipotálamo (Driancourt, 1991; Aerts y Bolts, 2010). Además involucra una combinación e interacciones de hormonas, factores de crecimiento, sistemas de comunicación celular, expresión de genes (Roche y Boland, 1991) y recientemente se ha evaluado también la presencia de algunos esfingolípidos (Hernández-Coronado et al., 2015).

2.2. Mecanismo de acción de las hormonas y factores de crecimiento que participan en el desarrollo folicular

El ovario tiene dos funciones fundamentales en la vida reproductiva de la hembra, la primera: es desarrollar ovocitos altamente aptos para la fertilización y la segunda: producir y secretar las hormonas esteroides necesarias que prepararán el tracto reproductivo para la fertilización y la implantación del embrión (Palermo, 2007). Las gonadotropinas FSH y LH son las principales hormonas que regulan los mecanismos endócrinos de la biología del ovario, es decir, controlan la función gonadal. Estas hormonas son los factores de sobrevivencia y proliferación con mayor importancia para las células de los folículos antrales (Hsu y Hsueh, 2000). Sin embargo, los factores de crecimiento como el IGF-I y el VEGF han tomado mucha importancia en la función de importantes eventos reproductivos gracias a su

actividad biológica y mecanismo de acción, por lo cual se ha establecido que cumplen una función tan importante y compleja como las gonadotropinas al igual que otras hormonas que intervienen en la reproducción (Peña et al., 2007), principalmente el E₂. Por lo que en los siguientes apartados nos enfocaremos a conocer cómo actúan estas moléculas para favorecer el desarrollo folicular.

2.2.1. Gonadotropinas

2.2.1.1. Estructura.

La FSH y LH son glicoproteínas, es decir, son hormonas polipeptídicas que contienen carbohidratos unidos covalentemente a ellas como parte integral de su estructura y poseen un peso molecular aproximado de 29,400 daltons para LH y de 35,000 - 45,000 daltons para FSH (Palermo, 2007). Ambas hormonas tienen en su estructura ácido siálico, fructosa, manosa, galactosa, acetilglucosamina y N-acetylneuraminidasa como residuos de carbohidratos. La LH contiene una mayor cantidad de ácido siálico que la FSH y la cantidad de este ácido favorece la eliminación de la hormona de la circulación sanguínea por lo que regula la vida media de cada hormona (Palermo, 2007). Esto quiere decir que la vida media de la LH es de aproximadamente 20 min, mientras que para FSH es de 3-4 h (Barros y Esteves, 2013). Las gonadotropinas son hormonas que poseen en su estructura dos subunidades, una α y una β (Palermo, 2007). La subunidad α de todas las glicoproteínas hipofisarias es idéntica y se denomina subunidad común, está compuesta por 92 aminoácidos con un peso molecular de 14,600 daltons mientras

que la cadena β es única para cada hormona por lo que la unión de la cadena α con la cadena β determina la actividad biológica de cada hormona. Sin esta unión no es posible desencadenar un efecto a nivel celular (Mihm y Evans, 2008). La subunidad β de la LH está compuesta por una cadena de 112-114 aminoácidos con 6 puentes disulfuro, alcanzando un peso molecular de 14,800 daltons. En el caso de FSH, la subunidad β tiene un peso de 15400 daltons y posee 4 cadenas glucosídicas unidas por una asparagina de las cuales 2 de ellas se unen a la subunidad α y otras 2 a la β .

2.2.1.2. Síntesis

Tanto la LH como la FSH son sintetizadas y secretadas por las células gonadotróficas, localizadas en la hipófisis anterior de la glándula hipófisis en respuesta a la estimulación pulsátil de la GnRH (Mihm y Evan, 2008).

El decapeptido GnRH es producido por un número relativamente pequeño de neuronas hipotalámicas. Las neuronas parvicelulares neurosecretoras de GnRH se encuentran en el área preóptica del hipotálamo (Prieto y Velásquez, 2001). De esta zona la GnRH es transportada a la eminencia media y liberada al sistema porta-hipofisiario por el surco infundibular. Una vez que la GnRH llega a la adenohipófisis se une a su receptor acoplado a proteína Gq en el gonadótrofo. Esta unión cambia la conformación del receptor en su dominio intracelular y permite que en la subunidad α de la proteína G la guanosina difosfato (GDP) se cambie por guanosina trifosfato (GTP) lo cual disocia a las subunidades β y γ de la α y ésta activa vías de señalización específicas. La subunidad Gq α activa a la fosfolipasa C para

hidrolizar fosfoinositoles de la membrana plasmática y permitir la síntesis de inositol trifosfato (IP₃; Mihm y Evan, 2008). El IP₃ se une a su receptor inotrópico localizado en el retículo y estimula la movilización de calcio intracelular y la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana plasmática. Este aumento en el calcio intracelular es el responsable de la inmediata liberación de FSH y LH por el proceso de exocitosis (Durán y Fiordeliso, 2013). También GnRH incrementa la transcripción de genes para las gonadotropinas y esto lo efectúa mediante la liberación de diacilglicerol (DAG) el cual junto con el Ca⁺⁺ activa a la proteína cinasa C (PKC). La PKC subsecuentemente fosforila a los factores de transcripción y genera el ARNm de LHβ (SF-1, Ptx1, Lhx, Pbx/Prep, AP-1, NFY y Smads) y FSHβ (c-fos, c-jun, Jun B, Jun D, o Smads 2, 3 & 4; Prieto y Velásquez, 2001; Tsutsumi y Webster, 2009).

2.2.1.3. Mecanismo de acción

Los receptores mediante los cuales las gonadotropinas ejercen sus efectos son receptores de membrana de siete dominios acoplados a proteína Gs. La proteína Gs es una proteína trimérica, constituida por 3 subunidades diferentes (α , β y γ). En su estado inactivo, la subunidad α contiene un grupo de guanosa difosfato (GDP), mientras que en su estado activo el GDP se cambia a GTP (Ulloa y Timossi, 1998). De esta manera acción de LH implica la unión con su receptor (LHR) acoplado a proteína Gs en células de la teca para activar a la subunidad α y así a la adenilato ciclasa para inducir la síntesis de AMPc a partir de adenosin trifosfato (ATP). El AMPc permite la activación de la proteína cinasa A (PKA) la cual por un lado

favorece el transporte de colesterol del citoplasma a la mitocondria. La PKA se encarga de fosforilar y activar a proteínas necesarias para la síntesis de esteroides como la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (sSTAR) la cual introduce el colesterol de la membrana externa a la membrana interna de la mitocondria y a la enzima P450_{scc} que convierte el colesterol a pregnenolona. De aquí la pregnenolona es transferida al retículo endoplásmico liso donde la síntesis de testosterona toma lugar gracias a la fosforilación de P450_{17α} por parte de PKA (Walker y CHeng, 2005). Por otro lado la PKA activa factores de transcripción en el núcleo para la generación de ARNm de enzimas de la esteroidogénesis, para la síntesis de receptores de LH y de proteínas antiapoptóticas lo cual favorece la sobrevivencia de células foliculares (Shoham *et al.*, 1993). En el folículo dominante la LH en la granulosa está implicada en el aumento de AMPc, y de la enzima P450 aromatasa (Vásquez y Olivera, 2010) e incrementa las concentraciones de VEGF (Christenson y Stouffer, 1997).

La FSH se une a su receptor (FSHR) acoplado a proteína Gs y estimula a la adenilato ciclasa induciendo la síntesis de AMPc. Este AMPc se une a la subunidad reguladora de PKA para liberar y activar la subunidad catalítica (Shimada y Yamashita, 2011). Una vez activada la PKA favorece el transporte de colesterol a la mitocondria y se lleva a cabo la esteroidogénesis de manera similar a lo que hace la hormona LH (Prieto y Velásquez, 2001). Sin embargo, las células de la granulosa no sintetizan la enzima que convierte progesterona (P₄) a andrógenos (P450_{17α}) pero sí la enzima P450 aromatasa la cual es encargada de convertir testosterona a E₂. De esta manera la testosterona producida por las células de la teca difunde

dentro de las granulosa para ser transformada a estradiol (Craig et al., 2011). Además PKA activa factores de transcripción en el núcleo para la generación de ARNm P450aromatasa, de receptores para FSH y proteínas antiapoptóticas. Se ha observado que la inhibición de la acción de FSH sobre las células de la granulosa conlleva a una desregulación en las proteínas proapoptóticas, aumenta la expresión del receptor FAS y del ligando de Fas (FasL) culminando en la apoptosis mediada por caspasas de estas células (Jiang et al., 2003). Es así que durante la atresia la disminución en los niveles de FSH aumenta el ARNm de receptores de muerte y proteínas proapoptóticas (Figura 3).

De manera similar la PKA permite la activación de la vía de señalización PI3Kinasa/AKT para activar a Ras/Rheb y favorecer la actividad enzimática de mTOR. Esta proteína puede estimular la traducción por fosforilación de p70S6 cinasa activando la proteína ribosomal 6 (PR6) para inducir un incremento en HIF-1 (Factor Inducido por Hipóxia). El HIF-1 es un factor de transcripción que induce la síntesis del ARNm de VEGF, Inhibina y LHR. El AMPc cataliza también la activación de PKA y subsecuentemente de MAPK las cuales tienen efecto en la diferenciación y proliferación celular (Fuller et al., 2002; Alam et al., 2004; Bernard et al., 2009).

Cada cascada se activa de forma transitoria en un tiempo específico, y algunas cascadas actúan de forma sinérgica, mientras que otros actúan competitivamente como inductores de la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de células de la granulosa (Shimada y Yamashita, 2011). Existen evidencias que indican que las quinasas ERK-MAPK son mediadores esenciales de la funcionalidad de LH, la cual

dicta los cambios en el destino en las células foliculares durante la ovulación y luteinización. La vía PI3K / proteína cinasa (B) PKB (AKT) / (FOXO) también está relacionada con la sobrevivencia de células de la granulosa (Shimada y Yamashita, 2011). Gonzalez-Robayna et al; (2000) mostraron que la FSH incrementa la activación de la vía PKB (AKT) en una manera dependiente de AMPc así como PI3K y es también conocido que ante este estímulo, AMPc activa a 2 proteínas unidoras de GTP denominadas RAP1 y RAS en células de la granulosa (Grandoch et al., 2010). En células neuronales, el factor de intercambio activado directamente por AMPc (EPAC) activa a las proteínas RAP1 independientemente de PKA, sin embargo la activación de estas proteínas depende de la fosforilación de PKB. Considerando que EPAC se expresa en células de la granulosa, Wayne et al; (2007) mostraron que la PKA no induce la activación de PI3K/AKT por lo que estas proteínas están implicadas en la regulación de la fosforilación de la vía AKT en células de la granulosa en cultivo y que la estimulación con FSH incrementa la activación de RAS en células de la granulosa durante el desarrollo folicular.

La proteína Ras regula múltiples cascadas de señalización como la c-RAF-MEK, ERK1/2 y la vía de las proteínas tirosina cinasa (c-Src). Evidencias sugieren que la vía ERK1/2 no se activa completamente en células de la granulosa durante las etapas de desarrollo folicular pero si se activa totalmente durante la ovulación. Es posible que la PKA activada por LH suprima la vía c-RAF para prevenir la activación de ERK1/2 y así reducir la proliferación celular y la inducción de la luteinización de las células de la granulosa (Wayne et al; 2007).

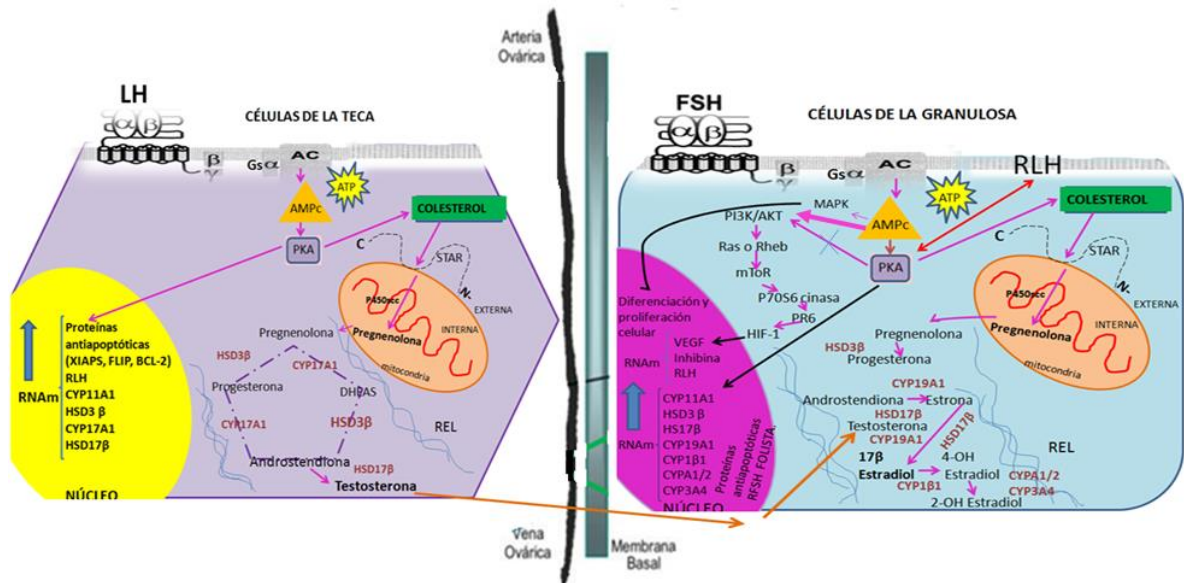


Figura 3 . Aspectos fisiológicos mas sobresalientes en células de la teca y células de la granulosa durante el desarrollo folicular.

2.2.2. Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I)

2.2.2.1. Generalidades

El sistema IGF-I incluye a los ligandos IGF-I e IGF-II, a las proteínas de unión a IGF (IGFBP-1 - IGFBP-6), a los receptores tipo 1 y 2 los cuales son tirosina cinasa y una gran variedad de proteasas que regulan la unión de las IGFBPs con los ligandos (Monget et al., 2002). El IGF-I es una hormona polipeptídica de 70 aminoácidos con un peso molecular de 7,6 kDA, comparte un 60% de homología con el ligando II y un 50% con la insulina. El receptor 1 es el encargado de desencadenar las principales funciones de IGF-I y II. Este receptor está compuesto por una proteína tetramérica $\alpha_2\beta_2$, la afinidad de IGF-I es más sobresaliente que la que posee IGF-II y mucho más alta que la que conserva insulina (Mihm y Evans, 2008). El receptor

tipo II o también llamado IGF-II/manosa-6-fosfato (IGF-II/M6P), está ligado a IGF-II y a moléculas que en su estructura poseen residuos M6P, como enzimas lisosomales, y al factor de crecimiento transformante tipo β I (TGF- β ; Monget et al., 2002, Zah y Lackner, 2010). Este receptor no posee afinidad por la insulina pero si permite la unión con IGF-I aunque con muy baja afinidad. El IGF-I circula en la sangre unido a seis proteínas transportadoras, siendo IGFBP-3 la más abundante en suero (Mihm et al., 2008).

El IGF-I, juega un papel fundamental en el desarrollo del folículo ya que estimula la proliferación de las células foliculares, incrementa la secreción de E₂ e incrementa la respuesta celular a las gonadotropinas en células de la granulosa de bovinos y ovinos (Campbell *et al.*, 1995; Glister *et al.*, 2001; Kwintkiewicz y Giudice, 2009), así mismo favorece la esteroidogénesis en células de la teca (Monget et al., 2002). Se ha observado que cuando la expresión del receptor de FSH y de la enzima P450 aromatasa en células de la granulosa es deficiente en ovarios de ratones Knockout (homocigótico IGF-I), la administración de IGF-I reestablece ambas expresiones y potencia la expresión del receptor de LH (Zhou et al., 1997). Aunado a esto, la FSH induce en las células granulosas la producción de Proteína Plasmática Asociada a la Preñez tipo A (PAPP-A), una proteasa que puede desnaturalizar el IGFBP4. El efecto resultante es el incremento en los niveles de IGF-I libre en granulosa e IGF-II en teca (Driancourt, 2001; Moore et al, 2006; Lucy, 2007).

Los componentes de este sistema están compartamentalizados dentro del ovario de los mamíferos. En bovinos, el ligando IGF-II y la proteína IGFBP-4, se producen en las células de la teca, mientras que IGFBP-2 en las células de la granulosa (Spicer, 2004). Los ligandos IGF-I y II, regulan el crecimiento y diferenciación de las

granulosas, tecas y pueden inhibir la apoptosis (Lamote et al., 2004). Algunos estudios asocian el aumento en la bioactividad de IGF-1 en líquido folicular con la selección del folículo dominante (Ginther et al., 2001).

2.2.2.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de IGF-1 involucra la unión a su receptor ocasionando un cambio conformacional del receptor que permite la unión de ATP y la fosforilación del dominio tirosina cinasa del receptor. Esta fosforilación aumenta la actividad cinasa del receptor para que pueda fosforilar una serie de sustratos citoplasmáticos que en conjunto se llaman “mediadores de transducción de la señal” (Wernet et al., 2008).

Una vez que se activa el receptor de IGF-I, recluta y activa proteínas adaptadoras de señalización, incluyendo las proteínas IRS-1 (sustrato del receptor de insulina-1) y IRS-2 (sustrato del receptor de insulina-2). Estudios han sugerido que la IRS-1 se requiere principalmente para la señalización mitogénica, mientras que el IRS-2, por el contrario, desempeña un papel clave en las respuestas celulares de motilidad (Monget et al., 2002). El cambio conformacional del receptor permite que la IRS-1 se una a la subunidad reguladora de PI3K, estimulando su actividad y generando un incremento en el segundo mensajero inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) por la conversión en fosfatidilinositol bifosfato (PIP2; Zack y Lackner, 2010). Este evento sirve para reclutar a AKT hacia la membrana donde puede ser fosforilada y activada por PDK1 y al complejo de la rapamicina (mTORC2). La activación de AKT ejerce efectos anti-apoptóticos por la inhibición de la fosforilación de factores pro-

apoptóticos como BAD y miembros de la familia Foxo, además promueve una mayor expresión de proteínas anti-apoptóticas tales como Bcl-2, Bcl-XL, y del factor nuclear kappa B (NF- κ B) para inhibir la apoptosis y favorecer la proliferación (Zack y Lackner, 2010). La señalización por parte de AKT también afecta el metabolismo de la glucosa a través de la regulación de la actividad de la glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β) y desempeña un papel clave en la síntesis de proteínas y el crecimiento celular mediante la regulación de la actividad del complejo TORC1 a través de una serie de eventos de señalización intermedio (Zah y Lackner, 2010). Por otro lado, la unión ligando-receptor activa a unas proteínas llamadas Shc, estimulando la activación de la vía de la quinasa RAS / MAPK y la transducción de señales mitogénicas a través de la activación ELK1 nuclear incrementando la proliferación celular (Le Roith y Yakar, 2007; Trojan et al., 2007 Figura 4).

El IGF-1 puede activar transportadores de glucosa y aminoácidos, estimular la síntesis de proteínas mediante la activación de factores de transcripción e inhibir la gluconeogénesis (Le Roith y Yakar, 2007; Trojan et al., 2007).

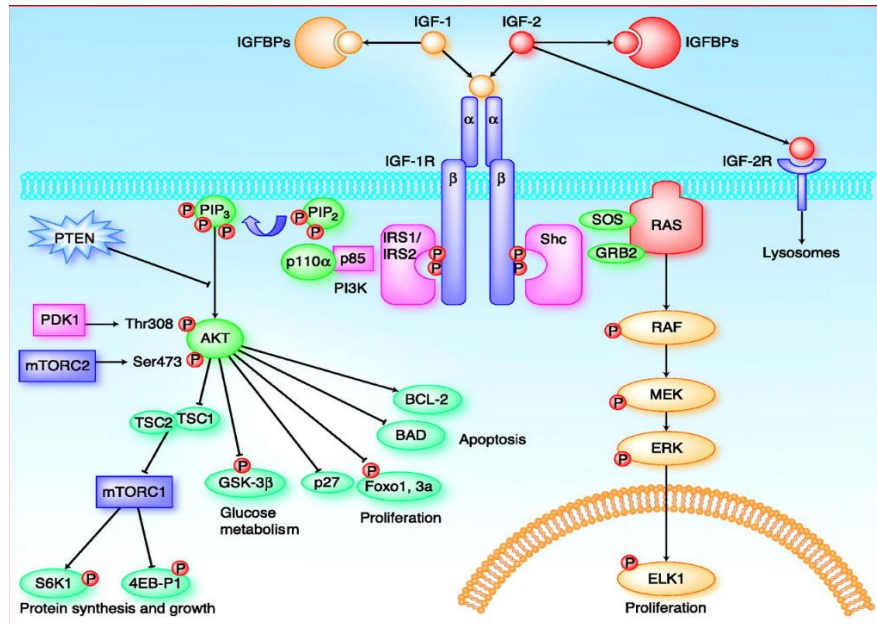


Figura 4. Mecanismo de acción de IGF-I. Tomado de Zack y Lackner, (2010).

2.2.3. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

2.2.3.1. Generalidades

En el ovario, la formación de nuevos vasos sanguíneos facilita la transferencia de hormonas, oxígeno y nutrientes hasta las células del folículo que lo demanden. Los folículos producen varios factores angiogénicos, de los cuales VEGF es considerado el de mayor importancia (Rosales-Torres et al., 2012). La expresión de VEGF en los folículos ováricos depende del tamaño. La inhibición de la expresión de VEGF, ocasiona la disminución de la angiogénesis del folículo y la pérdida de desarrollo y maduración en los folículos antrales. Además, se cree que por su actividad permeabilizante, VEGF puede ser responsable de la formación del antro y participar en la ovulación (Fraser et al., 2000). Estudios reportan un claro efecto

citoprotector de VEGF en células foliculares, especialmente en células de la granulosa, por lo cual su expresión se ha relacionado con la salud del folículo (Greenaway et al., 2005 o 2004). Greenaway et al., (2004) demuestra que VEGF y su receptor de 2 de membrana (VEGFR-2) se expresa en células de la granulosa de bovino, lo que claramente permite suponer que está implicado en la sobrevivencia de estas células. Además, en cultivo de células de la granulosa estimuladas con VEGF fue inhibida la apoptosis mediante la supresión de la caspasa 3-activa (Kosaka, 2007).

2.2.3.2. Componentes

La familia VEGF está compuesta por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF (factor de crecimiento placentario), VEGF-E (Orf-VEGF), and *Trimeresurus flavoviridis* svVEGF, con la excepción de al menos 2 de los miembros, 5 genes de la familia están presentes en genomas mamíferos, incluyendo al humano (Shibuya, 2011).

El VEGF-A pertenece a una súper familia de factores de crecimiento caracterizados por la presencia de 8 residuos conservados de cisteína entre cuyos integrantes destaca por su acción angiogénica, sin embargo también promueve la sobrevivencia, induce la proliferación y permite la migración tanto en células foliculares como en diversos tipos celulares (Byrne et al., 2005; Rosales-Torres y Guzmán, 2011). Al menos han sido reportadas seis isoformas de VEGF con actividad angiogénica (VEGF120a, VEGF144a, VEGF164a, VEGF182a, VEGF189a y VEGF205a) y cinco con actividad antiangiogénica (VEGF120b,

VEGF144b, VEGF164b, VEGF182b y VEGF189b). El efecto biológico de VEGF es mediado casi exclusivamente por dos receptores tirosina cinasa con alta afinidad; Flt-1 (fms-like tyrosine kinase flt-1 por sus siglas en inglés) ó VEGFR-1 con un peso de 18 kDA y el Flk-1/KDR (fetal liver kinase 1 por sus siglas en inglés) ó VEGFR-2 con un peso de 200-300 kDA (Kaczmarek et al., 2005; Shibuya, 2010). El principal mediador de los efectos de VEGF es el VEGFR-2 ya que éste es activado con mayor potencia, característica que le confiere una amplia participación en diversos procesos celulares, sin embargo con el VEGFR1 el VEGF tiene más afinidad (Cross et al; 2003),

2.2.3.3. Mecanismo de acción

Los receptores de VEGF (VEGFR1 y VEGFR2), pertenecen a la familia de receptores tirosina cinasa clase 5, poseen 7 dominios de unión a inmunoglobulina en el dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular que se caracteriza por tener un inserto cinasa de aproximadamente 70 aminoácidos de longitud (Shibuya, 2010). Además VEGF interactúa con correceptores como sulfato de heparan-heparina y neurofilina 1 (Stuttfeld y Ballmer, 2010) y se ha visto su expresión principalmente en células endoteliales, aunque existen evidencias de su expresión en células de la granulosa y teca de folículos en diferentes estadios del desarrollo folicular (Ortega-Serrano et al., 2010).

La señalización completa de los efectos de VEGF está ya muy bien documentada en células endoteliales y es iniciada por la unión de VEGF con el dominio extracelular del receptor. Antes de la unión ligando-receptor, los receptores se

encuentran en estado de monómeros y sin ninguna actividad enzimática (Shibuya, 2011). Por lo que al haber una interacción de VEGF con su receptor ocurre una homo o heterodimerización por interacciones homotípicas del dominio 4 o 5 ligado a inmunoglobulinas del sitio proximal de la membrana, lo cual provoca un cambio conformacional y la activación de su dominio catalítico, es decir la fosforilación de los residuos tirosina específicos localizados en el dominio intracelular yuxtamembranal, del receptor (Stutfeld y Ballmer, 2010). Subsecuentemente, moléculas de señalización son reclutadas y ensambladas al VEGFR llamadas partículas de transducción de la señal o señalosomas que activan distintas vías de señalización, dentro de las que destacan el dominio SH2 (del inglés Src Homology 2) y los dominios de unión a tirosina (del inglés phosphotyrosine-binding (PTB) Domains) (Stutfeld y Ballmer, 2010). Esto permite que al fosforilar al VEGFR se genere la activación de la fosfolipasa C ($PLC\gamma$) para hidrolizar al fosfoinositol 2 fosfato (PIP₂) en la membrana plasmática y producir las moléculas de transducción de señales diacilglicerol (DAG) e IP₃ (Cross et al., 2003; Figura 5) quien se une en el retículo endoplásmico a un receptor específico resultando en la liberación de calcio intracelular. Otras moléculas como el cinasas de adhesión focal (FAK), proteínas activadas por mitógenos 38 (P38 MAPK) involucradas en la migración y permeabilidad vascular, así como PI3K son activadas por un mecanismo no conocido. La activación de PI3K genera PIP₃ para así activar la vía PKB/Akt para favorecer la sobrevivencia celular. Además el PI3K favorece la activación de RAc que es importante en la permeabilidad vascular y migración (Figura; Cross et al., 2003). El DAG está involucrado en la activación de

dos rutas distintas, por una parte activa a la PKC, en particular la forma PKC β . A continuación, la PKC β se fosforila y activa la ruta Ras/MAPK (Kliche y Waltenberger, 2001; Cross et al., 2003) para favorecer la proliferación. Por otro lado, también en células endoteliales y tumorales la activación de PKC estimula un incremento en síntesis de S1P a través de la activación de la enzima SK1. Este incremento reduce los niveles de Sph y la inhibición de las proteínas activadoras de GTPasas, RasGAP (Inhiben la vía de Ras). La activación de Ras por S1P lleva a la activación de Raf, MAPK y ERK generando síntesis de DNA y con ello favorece la proliferación celular (Spiegel y Milstien, 2003; Figura 5)

En cuanto al VEGFR1 podemos mencionar que en cuanto a las vías de señalización en las que destaca se encuentra la activación de P38 MAPK importantes para la migración y la permeabilidad vascular (Takahashi y Shibuya, 2005).

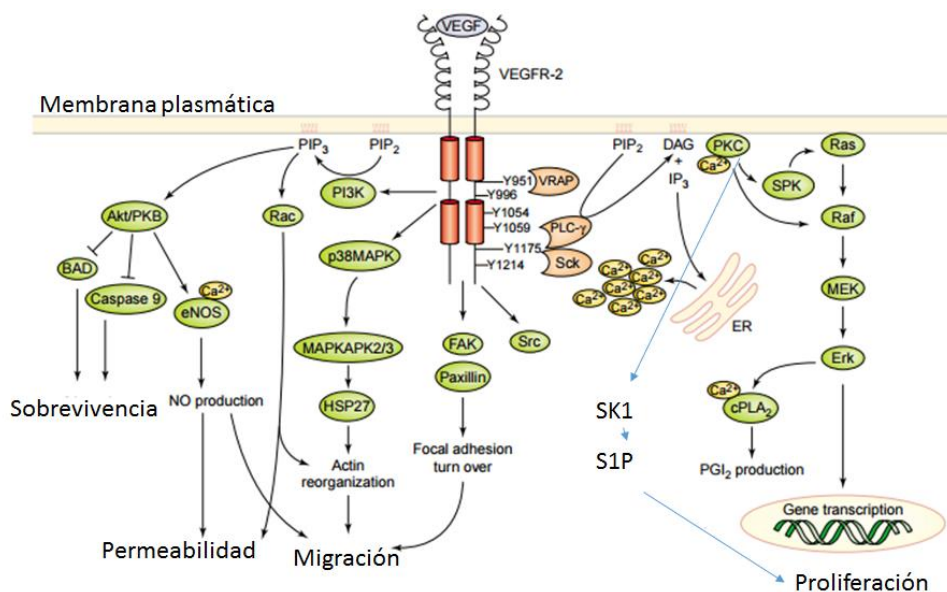


Figura 5. Mecanismo de acción del receptor 2 de VEGF. Modificada de Cross et al., (2003).

2.2.4. Estradiol

2.2.4.1. Generalidades

El E₂ es una hormona esteroide (lipofílica) con gran importancia en la regulación de aspectos reproductivos de la hembra. El E₂ modula la diferenciación de células de la granulosa al inducir la expresión de los receptores de LH y FSH e incrementa la secreción de IGF-I en células de la granulosa de porcino (Salvetty et al., 2007).

Durante el desarrollo folicular el E₂ es una hormona crucial que permite al folículo seleccionado como dominante continuar su crecimiento para poder alcanzar la ovulación (Aerts y Bols, 2010). La cooperación de las células de la granulosa y las células de la teca, ante el estímulo de las gonadotropinas manifiesta que en el ganado bovino el nivel de estrógenos en un folículo es un buen indicador de su estado de salud. Los folículos considerados estrógeno activos, cuya relación E₂:P₄ es en favor de los estrógenos, son folículos sanos, mientras que esta relación se vuelve en favor de P₄ desde los primeros estadios de la atresia (Sunderland *et al.*, 1994), lo cual también ha sido confirmado para otras especies como el ovino (Rosales *et al.*, 2000). La alta concentración de E₂ en folículos dominantes sanos, está relacionada con la mayor expresión del ARNm para la P450 aromatasa, para el receptor beta de estrógenos y para los receptores de FSH y LH en células de la granulosa comparado con los folículos subordinados de bovino (Evans et al., 2004). La concentración de E₂ de los folículos sanos dominantes también ha sido asociada positivamente con la expresión de genes relacionados con la sobrevivencia celular, mientras que en los folículos estrógeno inactivos (relación E₂:P₄ en favor de P₄),

predomina la expresión de genes asociados a la muerte celular por apoptosis (Evans *et al.*, 2004; Rosales-Torres y Guzmán, 2008). La inhibición de apoptosis mediada por gonadotropinas en células de la granulosa de los folículos está vinculada en parte con los cambios en la expresión de varios genes relacionados con la muerte celular. Las gonadotropinas pueden inducir la expresión de Bcl-2, GATA-4, FLIP y XIAP (moléculas de sobrevivencia) y disminuir la expresión de Bax, Apaf-1 (Factor-1 activador de la proteasa-apoptosis), Fas/FasL y p53 (moléculas proapoptóticas; Kim *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002 Figura 3) como ya se había mencionado a través de la vía PI3K/AKT. La disminución en la producción de E₂ es un evento temprano en la atresia folicular, lo cual precede a la muerte por apoptosis de las células de la granulosa (Valdez *et al.*, 2005). Algunos estudios indican que el 17β estradiol puede modular la activación del factor nuclear kappa β (NFκβ; Valdez *et al.*, 2005). El NFκβ es un factor de transcripción involucrado en la expresión de genes asociados con la apoptosis de las células de la granulosa; sin embargo aunque la activación de NFκβ está directamente relacionada con la concentración de E₂, su activación parece tener efectos anti y pro apoptótico (Valdez *et al.*, 2005).

En células de la granulosa, los efectos de proliferación y sobrevivencia de E₂ son mediados a través de la unión con su receptor nuclear-acción genómica (respuesta rápida pero transitoria) y se ha observado la presencia de 2 subtipos, el receptor alfa y el receptor beta (Salvetty *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los procesos de proliferación y sobrevivencia son mediados en células de la granulosa por el receptor beta de estrógenos y por potenciar la acción de FSH sobre la proliferación y diferenciación (Shimada y Yamashita, 2011). Los esteroides actúan regulando la

transcripción de genes específicos a través de receptores nucleares los cuales actúan como factores de transcripción y su actividad está regulada por la unión con una hormona esteroide específica (DeMAYO et al., 2002). Sin embargo, en la actualidad se ha reportado la existencia de receptores de membrana para E₂ con acción no genómica (respuesta retardada pero prolongada), estos receptores son alfa y beta así como el receptor GPER1 o también conocido como GPR30 y son acoplados a proteína G α and G $\beta\gamma$ (Levin, 2010; Francois et al., 2015). El E₂ se une con alta afinidad al receptor de membrana desencadenando diversas vías de señalización implicadas en el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y apoptosis aunque la función biológica en el ovario aún no es muy clara (Pavilk et al., 2011). Pavilk et al., (2011) demostraron la expresión del GPER1 en células de la granulosa de mujer y observaron que FSH y LH en mayor medida incrementan la expresión del receptor de membrana de estradiol.

Los receptores nucleares alfa y beta para E₂ están organizados en 6 dominios denominados por letras de la "A" a la "F". La región A/B está localizada en el lado amino terminal de la proteína y es la región menos conservada entre los distintos receptores nucleares. Este dominio contiene una función de activación de la transcripción genética (Activation Function 1 o AF-1) y varios sitios de fosforilación, que son importantes en el proceso de activación de la proteína especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona por lo que ambos receptores (alfa y beta) son sólo 47% idénticos (Beato y Klug, 2000). Adyacente se encuentra la región de unión al ADN o dominio C, la más conservada entre los diferentes receptores nucleares compuesta por nueve residuos de cisteínas que son invariablemente conservados entre los diferentes receptores de

esteroideos, de los cuales, ocho están coordinados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar dos dedos de zinc que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN (Kimbrel y McDonnell, 2003).

La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos dedos de zinc, conocida como la caja P (P-box). Entre la región de unión al ADN y el dominio E/F, se encuentra la región D o región de bisagra, la cual no ha sido bien caracterizada y que participa en la unión a la proteína chaperona de choque térmico hsp90 (heat shock protein 90), la cual permanece unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo. Finalmente, en el extremo carboxiterminal se encuentra la región E/F o dominio de unión al ligando (LBD), donde se une el E_2 . Esta región a pesar de que es conservada entre los diferentes receptores esteroideos es altamente específica para su hormona, es decir que el receptor de estrógeno une E_2 con alta afinidad, pero no otras hormonas esteroideas. Otras funciones del dominio LBD incluyen la activación de la transcripción o AF-2 (Activation Function 2), dimerización, interacción con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción, fosforilación y localización nuclear (Kimbrel y McDonnell, 2003).

2.2.4.2. Mecanismo de acción

El E_2 difunde por la membrana plasmática y se une a un receptor citoplásmico el cual en ausencia de su ligando se encuentra de manera inactiva asociado con proteínas hsp. Una vez que el E_2 se une a su receptor, las proteínas hsp se disocian del receptor y éste se dimeriza con otro receptor para activarse. El dímero activado

se une a los elementos de respuesta a hormona (HRE) del gen en el núcleo así como a factores transcripcionales BDEF y la ARN polimerasa-II los cuales son reclutados para que se lleve a cabo el inicio de la transcripción del ARNm (Beato y Klug, 2000). Sin embargo además de esta vía existen receptores de E₂ acoplados a proteínas G los cuales activan a la adenilato ciclasa, generan AMPc activando diferentes vías de señalización (Beato y Klug, 2000; Bottino y Lanari, 2010).

El mecanismo de acción que sigue el receptor alfa de membrana de los estrógenos toma lugar en la caveola (balsa lipídica) llevando a la generación de calcio y AMPc para activar a las proteínas cinasas proximales Src y PI3K así como a las proteínas distales ERK, AKT. Esta activación lleva a la fosforilación de proteínas que modulan la migración celular, la sobrevivencia y la proliferación (Levin, 2009).

En cuanto a la señalización por parte de estos receptores en células de la granulosa aún es muy deficiente, sin embargo se ha encontrado que en tumores de estas células, el E₂ al unirse con su receptor GPER1 activa por un mecanismo de transactivación al receptor del factor de crecimiento epidermal llevando a la activación de moléculas como PI3K/AKT y ERK vía Ras/Raf favoreciendo la proliferación y sobrevivencia de estas células (Francois et al., 2015). Es probable que estos mecanismo se suman a los ya conocidos por los receptores nucleares de E₂ para colaborar en el desarrollo folicular (Figura 6).

bioactivas por participar en la inhibición de la activación de proteína cinasa C (PKC; Hannun et al., 1986) y más adelante por el descubrimiento de receptores acoplados a proteína G (Goodemote et al., 1995; Lee et al., 1998). En la actualidad está bien documentado que los SLPs actúan como reguladores de la dinámica de la membrana plasmática, participan como segundos mensajeros en diversas cascadas de señalización, regulando procesos importantes en la fisiología celular como crecimiento, diferenciación y muerte celular (Zhou y Blom, 2015). De esta manera los SLPs se han convertido en un blanco importante para la investigación (Merril y Sandhoff, 2002; Alewijnse y Peters, 2008). Los SLPs comprenden un largo grupo de lípidos que incluyen esfingosinas, ceramidas, esfingomielinas y varios derivados fosforilados y glicosilados (Breslow y Weisman, 2010).

Dentro de los principales SLPs bioactivos se incluyen: ceramida (Cer), esfingosina (Sph), ceramida 1-fosfato (C1P) y esfingosina 1- fosfato (S1P). De ellos destaca Cer por ser el centro de la ruta de síntesis y degradación de los SLPs (Venkataraman y Futerman, 2000).

Cer y Sph son importantes componentes reguladores de la respuesta a estrés por inducir arresto de las células en el ciclo celular y apoptosis, mientras que la transformación de Cer a Sph y posteriormente a S1P está implicada en motilidad, reordenamiento del citoesqueleto, formación de uniones adherentes, proliferación y sobrevivencia celular (Sánchez y Díaz, 2008; Strub et al., 2010). Dadas estas evidencias es claro que el balance entre la dinámica de Cer y S1P y la consecuente regulación de sus vías de señalización es un factor determinante en el destino de la célula (Strub et al., 2010).

Los SPLs están formados por 3 dominios estructurales principales: una base de cadena larga, normalmente la Sph, un ácido graso de longitud variable unido al carbono 2 de la cadena base y diferentes cabezas polares unidas al carbono 1 lo cual permite diferenciar a todos los SPLs (Sterin y Leocata, 2007; Sánchez y Díaz, 2008; Navarrete y Ibáñez; 2008, Milhas et al., 2010).

2.2.5.1. S1P (Estructura, síntesis y funciones)

La S1P es un esfingolípido polar, bioactivo que actúa como un mediador extracelular y como un segundo mensajero intracelular (Bartke y Hannum, 2009). Tiene como base de su estructura a una Sph. Esta última molécula es un aminoalcohol formado por 18 carbonos, creando entonces una cadena hidrocarbonada insaturada, es decir, que tiene como mínimo un doble enlace (Mendelson et al., 2014). Este aminoalcohol, contiene un grupo amino en el carbono 2, y dos grupos alcohol en el carbono 1 y 3. Para convertirse en S1P a la Sph se le añade un grupo fosfato al comienzo de la cadena, es decir, en el carbono 1, el cual aparece esterificado con el grupo alcohol de la esfingosina de este mismo carbono. (Rosen et al., 2013; Figura 7).

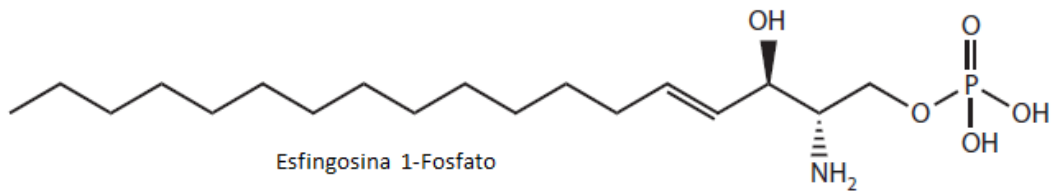


Figura 7. Estructura química de S1P. Tomada de Mendelson et al, (2014).

La S1P es formada mediante el catabolismo de Cer ya sea a partir de la síntesis de *novo* o por la vía de esfingomielina (Agraves et al., 2010). Mediante la vía de esfingomielina, Cer puede ser hidrolizada por CDAsas para liberar el ácido graso y producir Sph. Posteriormente por acción de la enzima biosintética esfingosina cinasa (SK) la Sph es fosforilada formándose así S1P (Sterin y Leocata, 2007; Figura 8). Existen 2 isoenzimas de SK (esfingosina cinasa 1 y 2; SphK1 o SK1 y Sphk2 o SK2; Bartke y Hannum, 2009). Las dos isoenzimas de SK en mamíferos tienen 5 dominios conservados (C1-C5) con un único dominio catalítico que va del C1-C3 localizado en el sitio de unión al ATP localizado en la región C2 (Pyne et al., 2016). La SK1 no posee un dominio hidrofóbico transmembranal mientras que SK2 posee 4. Por lo que aunque las dos isoformas de la enzima muestran homología y producen el mismo producto, tienen diferentes propiedades catalíticas así como localización subcelular, distribución en tejidos y patrones de expresión temporal durante su desarrollo (Van Brocklyn et al., 2005; Sankala et al., 2007; Pyne et al., 2016). La SK1 tiene afinidad por esfingosinas *D-erythro* como sustrato mientras que SphK2 fosforila un amplio rango de bases esfingoides como sustrato, incluyendo fitoesfingosina y dihidroesfingosina. Sin embargo una baja en la expresión de estas enzimas resulta en la inhibición del crecimiento celular e inducción de apoptosis, por

otra parte tanto SK1 como SK2 son enzimas encargadas de la regulación de la generación de Cer, disminuyendo sus niveles y aumentando los de S1P (Maceyka et al., 2005; Sterin y Leocata, 2007). Cabe señalar que la carencia de SK1 puede ser suplida por SK2 y viceversa. En ratones knockout para una de las isoformas se corroboró un desarrollo neural adecuado (Mizugishi et al., 2005). Además de estas enzimas, los niveles de S1P también son regulados por enzimas de degradación como la S1P fosfatasa y liasa encargadas de regular sus niveles en la célula (Mendelson et al., 2014).

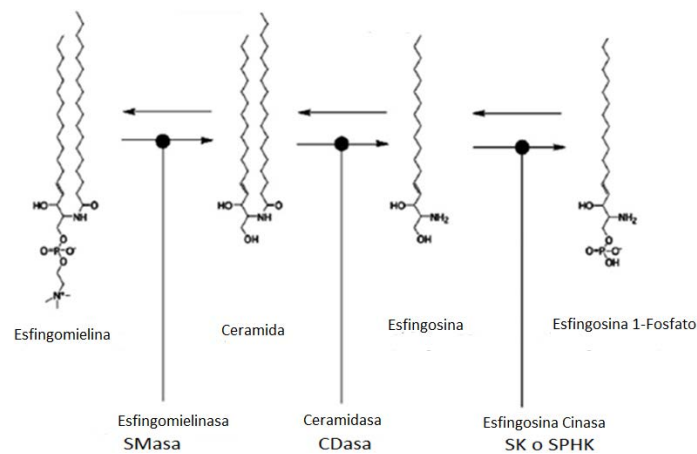


Figura 8. Representación esquemática del metabolismo de SLPs y la síntesis de S1P. Tomado de Alewijnse y Peters, (2010).

Dentro de las funciones más importantes de S1P destacan la regulación de la proliferación, crecimiento, sobrevivencia, migración celular, inflamación, angiogénesis, vasculogénesis y resistencia a la muerte celular por apoptosis en células endoteliales, neumocitos, embrionarias y principalmente cancerígenas (Daum et al., 2009; Bartke y Hannum, 2009). La acumulación de S1P en la célula

depende de los niveles de expresión y actividad principalmente de CD45 (ácida, neutra y alcalina) y SK (Sterin y Leocata, 2007).

La S1P es almacenada en plaquetas pero es sintetizada en una gran variedad de tipos celulares como: eritrocitos, células mononucleares, neutrófilos y células endoteliales, en respuesta a estímulos extracelulares tales como factores de crecimiento y citocinas (Pyne et al., 2016; Venkataraman et al., 2008). En mamíferos, S1P es encontrada principalmente en la sangre y en la linfa. Las plaquetas han sido consideradas como la principal fuente de S1P en sangre, sin embargo los niveles de este metabolito no se ven modificados al haber una disminución de plaquetas por lo cual estudios recientes de Bode et al (2010) indican que los eritrocitos son también un almacén de S1P. Además las células del endotelio vascular han emergido como las grandes contribuyentes en la producción de S1P en plasma (González et al., 2008).

2.2.5.2. Mecanismo de acción de S1P

2.2.5.2.1. Intracelular

Uno de los modelos ampliamente estudiados para explicar la función de S1P es la señalización “inside-out”, de adentro hacia afuera, la cual propone que la producción intracelular de S1P a través de la activación de SK permite su liberación en el espacio extracelular a través de proteínas transportadoras (ATP-binding cassette (ABC) y Spns2) o lo sitúan dentro de la porción lipídica de la membrana plasmática lo cual genera una gran proximidad con sus receptores generando su

activación de manera autócrina o parácrina para transducir diferentes vías de señalización (Dai et al., 2014). En el espacio extracelular S1P se une a la apolipoproteína M (unión no específica a albúmina) asociada con lipoproteínas de alta densidad (HDL, Takuwa et al., 2011). Sin embargo la señalización “inside out” ha adquirido relevancia porque S1P actúa como ya se ha mencionado como “segundo mensajero” y no necesita de la unión con su receptor para generar una señalización intracelular (Spiegel y Milstein; Dai et al., 2014, Figura 9).

Hay un gran número de proteínas blanco para S1P la cuales son diferencialmente reguladas por SK1 y SK2 gracias a la localización de cada una de éstas (Pyne y Pyne, 2016). Mientras que ambas enzima pueden ser fosforiladas por quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK-1/2) en respuesta a agonistas, la activación de SK1 es mayormente pronunciada y acoplada con su translocación, de una manera dependiente de la proteína unidora de calcio e integrinas (C1B1), del citoplasma a la membrana plasmática donde reside su sustrato Sph que origina una producción localizada de S1P en la superficie de la célula (Jarman et al., 2010). La fosforilación en Ser225 por ERK2 (cinasa reguladora de señales extracelulares-2) es esencial para una mejor afinidad a la membrana plasmática (Johnson et al., 2002; Pitson et al., 2005). La SK1 puede ser estimulada por una amplia variedad de factores de crecimiento los cuales incluyen al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al VEGF, al factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos, citosinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), hormonas esteroides (estradiol) entre otros para producir S1P (Takabe et al., 2008). En contraste SK2 es localizada en el retículo endoplásmico o es asociada a la mitocondria (Pyne et al., 2016). Es menor el conocimiento sobre la función y

regulación de SK2. Existen reportes que indican que EGF y la PKC, estimulan SK2, vía ERK1, el cual se une a SK2 y la fosforila en residuos de serina y treonina incrementando su actividad enzimática. Sin embargo otros estudios sugieren que la fosforilación de SK2 es catalizada por la proteína cinasa D la cual la lleva a su exportación nuclear mediante “shuttles-lanzaderas” (se encuentran dentro y fuera del núcleo) para una subsecuente señalización celular (Hait et al., 2005, 2007; Ding et al., 2007; Takabe et al., 2008; Pyne et al., 2016).

La síntesis de S1P está implicada en la regulación de los niveles de calcio, independientemente de la formación de inositol trifosfato. Por otro lado la producción de S1P derivada de la activación de SK1 actúa como un cofactor que le confiere actividad E3 ligasa sobre el receptor 2 asociado al factor de TNF (TRAF2; asociado con una mejor activación de la SK1) lo cual cataliza la Lys63 poliubiquitinación de la proteína cinasa RIP1. Esta proteína es una plataforma de señalización en la vía del factor nuclear beta (NF κ - β) (Dai et al., 2014; Pyne et al., 2016). Es así que TNF estimula a la SK llevando a la activación del factor nuclear beta (NF κ - β) el cual es esencial para la prevención de la apoptosis y por consiguiente encargado de regular la sobrevivencia celular (Spiegel y Milstein, 2003; Pyne et al., 2016). Por otro lado S1P mejora el funcionamiento de cIAP2 (inhibidor celular de la apoptosis 2) mediante la poliubiquitinación de K63 del factor IRF-1 (factor regulador de interferón 1) el cual es fundamental para inducir la producción mediada por interleucina 1 de quimiocinas CXCL10 y CCL5 (Nagahashi et al., 2014). Además S1P promueve la sobrevivencia celular a través de la activación de la vía ERK y la inhibición de la cinasas c-Jun amino terminal (JNK; Maceyka et al., 2002). El incremento en las

concentraciones de S1P disminuye las de Sph e inhibe a las proteínas activadoras de GTPasas. Además este incremento de S1P activa Ras, y Raf, MAPK, la cinasa ERK (MEK) y eventualmente estimula la síntesis de ADN. Esta vía de señalización está implicada en el crecimiento y proliferación celular (Spiegel y Milstein, 2003). También se ha observado una interacción entre S1P generado por SK1 y las vías Ras y STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3, Nagahashi et al., 2014). Dentro de los efectos generados por S1P sintetizado por SK2 se encuentra que en el núcleo inhibe a las desacetilasas de histonas (HDAC1 y HDAC2), regulando la transcripción de genes incluyendo al inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas p21 (Nagahashi et al., 2014).

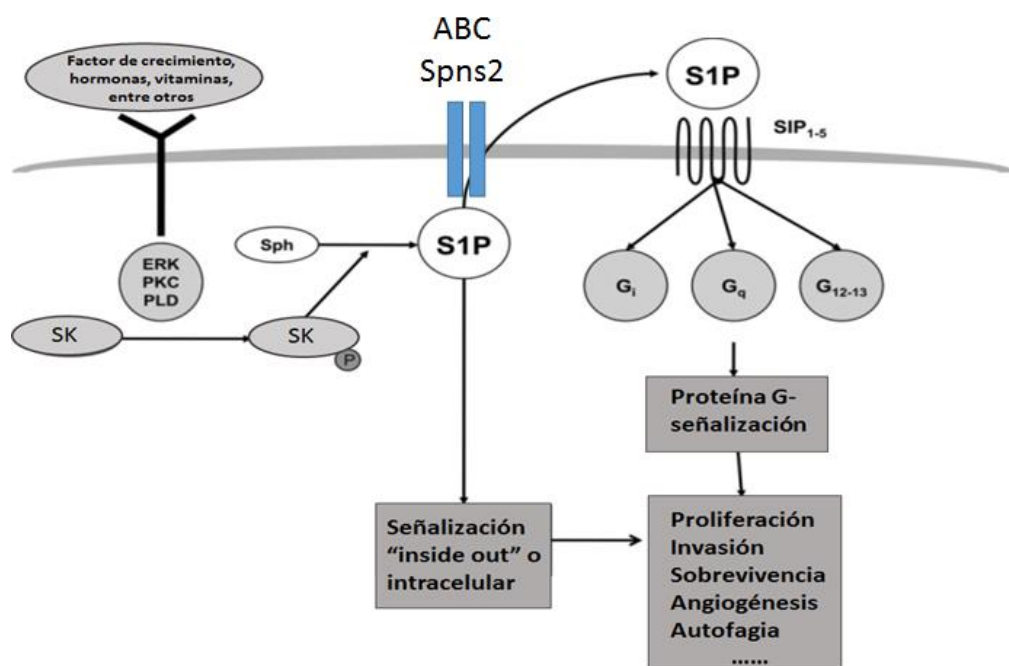


Figura 9. Modelo de señalización de S1P. Múltiples moléculas (factores de crecimiento, hormonas, vitaminas, entre otros) activan a la esfingosina cinasa (SK). S1P es entonces generada intracelularmente por la conversión de Sph a S1P y actúa como segundo mensajero o a través de proteínas transportadoras (ABC-ATP binding cassette y Spns2). Además puede salir al espacio extracelular y unirse a uno de sus 5 receptores (S1PR₁₋₅) para generar sus efectos. Modificada de Dai et al., 20014.

2.2.5.2.2. Extracelular

Una vez producido la S1P dentro de la célula es exportada desde el interior celular al medio extracelular por transportadores específicos (Spinters 2; Spns2, ABC-ATP binding cassette) y algunos otros aún no caracterizados (Figura 8; Xia y Wadman, 2011; Mendelson et al., 2014). En este caso, S1P actúa como un ligando, uniéndose a receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCRs), generando una señalización autócrina o parácrina, provocando respuestas en migración, supervivencia, proliferación y crecimiento celular (Agraves et al., 2010) detalladas más adelante. Los GPCRs pertenecen a la familia de proteínas conocidas como el gen de diferenciación endotelial 1 (EDG-1) y recientemente se les ha atribuido el nombre de receptores de S1P (S1PRs). Se han caracterizado cinco subtipos de S1PRs: S1PR1 (EDG-1), S1PR2 (EDG-5), S1PR3 (EDG-3), S1PR4 (EDG-6) y S1PR5 (EDG-8) (Rosen y Goetzl, 2005; Rosen, 2009; Figura 10). Mientras que los receptores S1P1, S1P2 y S1P3 son el principal blanco de S1P en miocitos, células endoteliales, leucocitos y fibroblastos, los receptores S1PR4 y S1PR5 están limitados a el sistema inmune y al sistema nervioso central respectivamente (Chun y Hartung, 2010). En células endoteliales, S1PR1 y S1PR2 son conocidos por participar en el desarrollo vascular (Shoham et al., 2012; Mendelson et al., 2013), la estimulación de S1PR1 y/o S1PR3 frecuentemente modulan la proliferación celular y migración en células cancerígenas, mientras que S1P2 puede inhibir la proliferación celular y migración (Rosendfelt et al., 2001; Sukocheva et al., 2006). Dado que en células mieloides y endoteliales la expresión de S1PR1/S1PR3 favorece la migración y proliferación se les ha considerado como receptores

angiogénicos, mientras que en las mismas células como efecto contrario, S1PR2 disminuye la migración y proliferación, por lo que la ha atribuido como un receptor antiangiogénico (Takuwa et al., 2011). Hasta el momento en células de la granulosa de mujer se ha encontrado la expresión de los receptores S1PR1, S1PR2, S1PR3 y S1PR5, sin embargo los efectos de sobrevivencia y proliferación son mediados a través de los receptores S1P1/S1P3 (Nakahara et al., 2012).

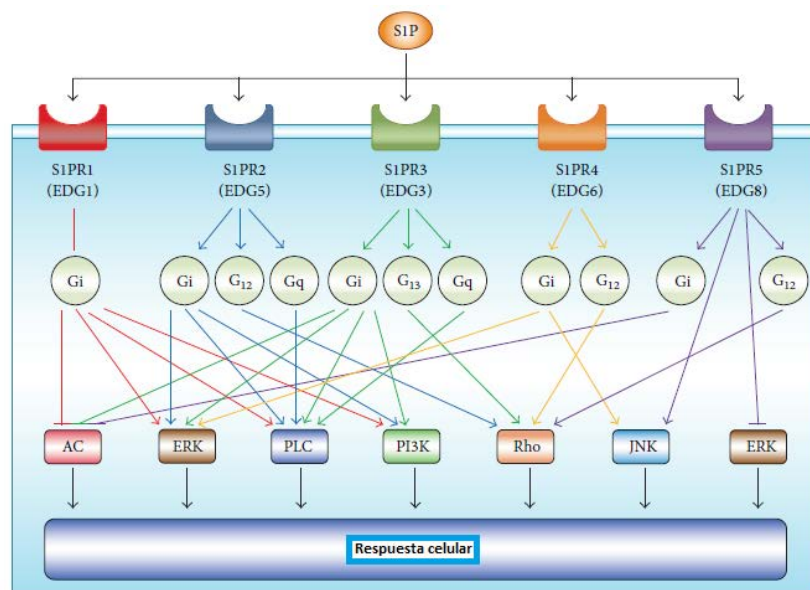


Figura 10. Señalización del receptor de S1P. La figura muestra aspectos de la cascada de señalización que son mediados por los 5 miembros de la familia de receptores de S1P. Tomada de Nagahashi *et al*, (2014).

Los receptores se acoplan a diferentes proteínas G (Gai, Gaq, Gα12/13 (algunos autores separan 12 y 13), esto representa un punto importante en el que la expresión de los receptores en diferentes órganos modula la actividad de S1P (Brunkhorst et al., 2014). El S1PR1 es conocido por acoplarse a proteína Gi lo cual lleva a la activación de PLC, Ras, ERK, PI3K y AKT así como la inhibición de la AC. Tanto el S1PR2 y S1PR3 se acoplan a Gi, Gq, G12/13, pero sus efectos son

distintos, esto quiere decir que la unión de S1P con su receptor 2 activa ERK (Gi), PLC (Gq) y Rho (G12/13) pero no Rac (Gi), sin embargo la unión con su receptor 3 resulta en la activación PLC (Gq), Ras (Gi) y Rac (Gi) (Takuwa et al., 2011). El S1PR1 y S1PR3 son dependientes de Gi lo cual incrementa la proliferación celular por la vía Ras/ERK y migración por la vía PI3K/Rac y reducen la apoptosis por la activación de AKT. La unión de S1P con su receptor 2 (G12/13) inhibe la proliferación celular, crecimiento y migración debido a que es bien sabido que son procesos dependientes de la activación de Rho y Rac (Tamashiro et al., 2013; Nagahashi et al., 2014 Figura 10).

Mucho menos conocidas son hasta la fecha las señalizaciones a través de los receptores 4 y 5 de S1P, sin embargo el S1PR4 se acopla a proteína Gi, G12 y G13 donde la unión a Gi activa a Cdc42 (proteína reguladora del ciclo celular), PLCy ERK y la unión a G12/13 resulta en la activación de Rho y la inhibición de la proliferación. Lo poco que se sabe del S1PR5 es que se acopla a proteína Gi y G12 por lo que tiene una función dual que depende de la etapa de desarrollo de la célula, por ejemplo en oligodendrocitos prematuros induce su retracción (daño), mientras que en los maduros a través de Gi y la activación de la vía AKT, favorece su sobrevivencia (Jaillard et al., 2005).

La vía general de sobrevivencia y angiogénesis indica que S1P se une a su receptor 1 o 3 subunidad Gi activando a PI3K, por otro lado esta vía de PI3K y AKT generan señalización de sobrevivencia celular así como de proliferación. Otra vía de señalización para la migración celular, implica que S1P unida al receptor 3 acoplado a proteína Gq activa a la fosfolipasa C (PLC) para así generar movilización de calcio (Agraves *et al.*, 2010). Además el receptor 3 de S1P acoplado a G12/13

puede activar la GTPasa monomérica Rho, la cual es un importante regulador del citoesqueleto y de la movilidad celular (Sánchez y Díaz, 2006).

Finalmente a través de la unión ligando receptor la vía de proliferación celular es generada mediante la activación de Ras hasta la activación de ERK (Spiegel y Milstein, 2003).

La unión de S1P a S1PR1 y S1PR3 en células endoteliales, son encargados de modular la angiogénesis lo cual involucra la migración de estas células, proliferación sobrevivencia y morfogénesis de estructuras tubulares, lo cual depende del reforzamiento de vascular endotelial caderina (Skoura y Hla, 2009).

Por otro lado, la S1P puede activar al receptor 2 de VEGF (VEGFR-2) ya que la unión de S1P a su receptor S1P1/S1P3 activa a la subunidad G_i y $G_{\beta\gamma}$ con la subsecuente fosforilación de componentes como Src que resulta en la fosforilación de VEGFR-2 en células endoteliales (Ader et al., 2009; Ryu et al., 2014). Es decir, existen evidencias que indican que la estimulación de algunos receptores acoplados a proteínas G, como es el caso de receptores de S1P, resulta en la activación de receptores tirosina cinasa como el VEGFR2 en ausencia de un ligando para estos últimos. Este proceso es denominado “transactivación” y depende de señales intracelulares inducidas por la estimulación de receptores acoplados a proteína G en las que participan las subunidades de las proteínas G, así como fenómenos de fosforilación mediados por diferentes cinasas (Sánchez y Árias, 2004). La transactivación del VEGFR2 a través de S1P puede llevar a la activación de dos cascadas de señalización: la primera se refiere a la activación de la familia tirosinas cinasas-Src y la proteína adaptadora CrkII, la segunda a la activación del PI3K, proteína cinasa B (PKB)/AKT y a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) para la

formación de óxido nítrico (NO). Estas vías son importantes para el movimiento celular y la remodelación vascular (Spiegel y Milstein, 2003; Ader et al., 2009). Finalmente la activación de la vía PKB/AKT favorece la proliferación celular y la activación de PLC incrementa los niveles de calcio intracelular (Tanimoto et al., 2002; Spiegel y Milstien, 2003; Sánchez y Arias, 2004). Por otro lado en células cancerígenas ante un estímulo de hipoxia, la Sphk1 es rápidamente estimulada incrementando los niveles de S1P, este esfingolípido como ya lo hemos venido mencionando, sale de la célula y se une a su receptor generando la activación de la vía AKT/ *Gsk3-beta* lo cual regula los niveles de HIF-1 α , permitiendo en el núcleo la transcripción del VEGF (Ader et al., 2009).

2.2.5.3. S1P y VEGF

De acuerdo a lo mencionado antes, la S1P puede tener una función dual; puede funcionar de manera autócrina o parácrina para estimular al receptor de S1P presente en la superficie de esa célula o de células vecinas, aunque también puede actuar intracelularmente para modular diversas vías de señalización. Esta función dual parece involucrar a VEGF por lo que la interacción entre S1P y VEGF han sido estudiada principalmente en células endoteliales a diferentes niveles:

1. La S1P puede fosforilar a VEGFR-2 mediante transactivación en una manera independiente de su ligando (Igarashi et al., 2003)
2. El VEGF, regula la expresión del receptor 1 y 2 de S1P (Fieber et al., 2006).
3. La S1P y el VEGF cooperan o convergen en algunas cascadas de señalización: por un lado VEGF adicionalmente se involucra en la activación

de la vía AKT inducida por S1P y además VEGF induce la expresión del AKT3 en una manera dependiente del receptor S1PR3 (Shu et al., 2002).

4. El VEGF puede modular la concentración intracelular de S1P por la activación de Sphk1, en células endoteliales y tanto VEGF como S1P interactúan para regular diferentes vías de señalización (Endo et al., 2002, Hughes et al. 2005).
5. La S1P contribuye en la expresión de VEGF a través de la modulación del HIF-1 α (Ader et al., 2009).

Estudios *in vitro* indican que S1P estimula la expresión de VEGF en condrocitos articulares humanos (Masuko et al., 2012). Además, S1P incrementa los niveles del ARNm de VEGF en células endoteliales de vena umbilical humana a través de la unión con su receptor acoplado a proteína G por la vía de fosfolipasa C, AKT, ERK y p38 MAPK (Heo et al., 2009). El VEGF induce la activación de ERK y este a su vez activa a SK1 llevando a la generación de S1P, lo cual incrementa la expresión de VEGF (Dai et al., 2014).

2.2.5.4. S1P y desarrollo folicular

Debido a los efectos de S1P como una molécula pleiotrópica es que hay tantos estudios sobre su participación como regulador central en la biología de los mamíferos, incluyendo su participación en la reproducción (Guo et al., 2014).

Existe una gran cantidad de estudios que sugieren la participación de S1P en el desarrollo folicular. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que la S1P está relacionada con la salud o atresia folicular, ya que mediante la relación

hormonal E₂/P₄ se clasificaron folículos antrales sanos y atrésicos y se observó que la relación S1P/Cer en células de la teca y de la granulosa es mayor en folículos sanos que en atrésicos, así mismo las concentraciones de S1P en folículos dominantes sanos fue mayor respecto a los atrésicos (Hernández-Coronado et al., 2015). En cultivo de células de la granulosa luteinizadas de humano se observó el efecto protector de S1P (1 y 10 mM) en presencia de peróxido de hidrógeno como inductor de apoptosis (Nakahara et al., 2012). En estudios de mujeres con hiperestimulación ovárica se detectó la presencia de S1P asociado con lipoproteínas de alta densidad en líquido folicular (FF-HDLs) y lo consideraron importante para el desarrollo folicular ya que promueve la proliferación y la angiogénesis (von Otte et al., 2006). Adicionalmente en estudios sobre el desarrollo de folículos primarios hasta folículos antrales se observaron altas concentraciones de CDasa ácida, por lo que esta enzima es clave en el desarrollo folicular y concluyen que S1P lo promueve (Eliyahu et al., 2010).

La adición de S1P dentro del saco bursal que rodea al ovario, previno la pérdida masiva de ovocitos inducida por terapia de radiación en ratones (Morita et al., 2000; Jurisicova et al., 2006; Kaya et al., 2008).

Primates tratados con S1P o su análogo FTY720 por 1 semana previa a irradiación ovárica, retuvieron folículos ováricos y reanudaron el ciclo menstrual post tratamiento (Zelinski et al., 2011). La incubación de ovarios de ratones y de murino con 12 µM de S1P estimula el crecimiento folicular a través de la inducción de polimeración de actina y funciona como un agente terapéutico para el síndrome de ovario poliquístico y otros desórdenes ováricos (Cheng et al., 2015). La estimulación con 1ng/mL de S1P durante 7 días, activa el desarrollo de folículos preantrales de

cabra cultivados *in situ* y mantiene la viabilidad tanto del ovocito como del folículo (Nóbrega et al., 2014). Finalmente la expresión de S1PR1, S1PR2, S1PR3 y S1PR5 pero no de S1PR4 se encontró en cultivo primario de células de la granulosa lútea y en una línea de células de la granulosa de humano (HGL5 cells, Becker et al., 2011).

2.2.5.5. ¿Por qué es importante realizar cultivos de células de la granulosa?

El aislamiento de un tipo específico de células provenientes de tejidos u órganos animales que posteriormente se colocan en un medio “artificial” para favorecer su división, crecimiento, multiplicación y en algunos casos diferenciación, se denomina cultivo de células animales y es una herramienta útil para el conocimiento de muchos procesos fisiológicos. Dentro de los procesos a estudiar destacan la actividad intracelular, los flujos metabólicos, las interacciones con el medio ambiente, la genética, las interacciones célula-célula y las generaciones de metabolitos de interés (Tavira et al., 2010).

La proliferación de las células de la granulosa desempeña un papel importante durante el desarrollo folicular. Las gonadotropinas y los estrógenos son los principales moduladores del crecimiento celular durante el periodo preovulatorio. Se ha demostrado que las células de la granulosa obtenidas de folículos de bovino son capaces de proliferar *in vitro* en presencia de diferentes factores de crecimiento y en presencia o ausencia de suero fetal bovino. En este sentido, una combinación adecuada de factores de crecimiento y hormonas sería suficiente para promover a las células ingresar a la fase de síntesis del ciclo celular. El cultivo de células de la

granulosa de bovino ha sido ampliamente estudiado y se han desarrollado diferentes sistemas *in vitro* para la evaluación de la regulación fisiológica del crecimiento folicular y la ovulación, entre otros procesos. El sistema de cultivo para estas células involucra a FSH e insulina para lograr un crecimiento eficaz y mantener las células sin luteinizar (Ferreira et al., 2011). Dadas estas características, el cultivo de células de la granulosa proporciona un enfoque a través del cual se pueden determinar las acciones e interacciones de hormonas y factores de crecimiento específico que permite conocer la participación de factores tróficos durante el desarrollo folicular (Gutiérrez et al., 1997).

3. Justificación

El desarrollo de folículos antrales se basa principalmente en la proliferación de las células foliculares y es promovido por la acción de hormonas y factores tróficos dentro de los cuales destacan la hormona folículo estimulante (FSH) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La unión de estas moléculas con su receptor promueve la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y fosfoinositol 3 cinasa (IP3K) para inducir la proliferación y supervivencia de células de la granulosa. Por otro lado esfingosina 1 fosfato (S1P) es un esfingolípido que favorece la proliferación y supervivencia celular, es sintetizado a partir de ceramida (Cer) por la acción de ceramidasa (CDasas) y esfingosinas cinasas (SKs) de las cuales destaca la esfingosina cinasa 1 (SK1). En células endoteliales el VEGF activa a la SK1 y por consiguiente la síntesis de S1P aunque se desconoce si esto ocurre en células foliculares. La S1P puede unirse a su receptor acoplado a proteína G y generar la transcripción de VEGF y la transactivación del receptor 2 para VEGF (VEGFR2), generando efectos proliferativos y de supervivencia. Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que folículos dominantes sanos de bovino tienen una mayor producción de S1P respecto a folículos dominantes atrésicos. Sin embargo se desconocen los mecanismos por los cuales en un folículo sano se activan las SKs que promueven la síntesis de S1P. Considerando que FSH y VEGF son reguladores del desarrollo folicular, es probable que ellos sean los responsables de la activación de SKs, para inducir la síntesis de S1P, actuando como un mecanismo adicional a los ya conocidos para favorecer la supervivencia y proliferación de células foliculares de bovino.

4. Pregunta de investigación

¿El efecto de esfingosina 1-fosfato (S1P) se suma a los efectos de proliferación y supervivencia que tienen los factores tróficos en células de la granulosa?

5. Hipótesis

- Los factores tróficos que participan en el desarrollo folicular como la hormona folículo estimulante (FSH) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) regulan la producción de S1P en células de la granulosa en cultivo.
- La S1P promueve la supervivencia y proliferación de células de la granulosa en cultivo.

6. Objetivo general

Determinar la importancia de S1P en la proliferación y supervivencia de células de la granulosa de bovino y si estos efectos son estimulados por FSH y VEGF.

7. Objetivos particulares

- Determinar si FSH y VEGF incrementan la síntesis de S1P en células de la granulosa de bovino en cultivo.
- Conocer si FSH y VEGF están involucrados en la activación de esfingosina cinasa 1 (SK1) en células de la granulosa de bovino en cultivo.

- Comprobar si S1P maximiza el efecto de FSH y VEGF en la supervivencia y proliferación de células de la granulosa de bovino en cultivo.
- Conocer si los efectos de S1P en células de la granulosa de bovino en cultivo dependen del incremento en la síntesis de VEGF o de la transactivación del receptor 2 de VEGF.

8. Metodología

8.1. Diseño experimental

Se obtuvieron ovarios de vacas sacrificadas en rastro para recuperar folículos de 4-7 mm de diámetro. Los folículos fueron diseccionados para desprender las células de la granulosa y cultivarlas para investigar: ¿quién sintetiza a S1P, qué procesos desencadena esta molécula en células de la granulosa y cómo lo realiza? (Figura 11).

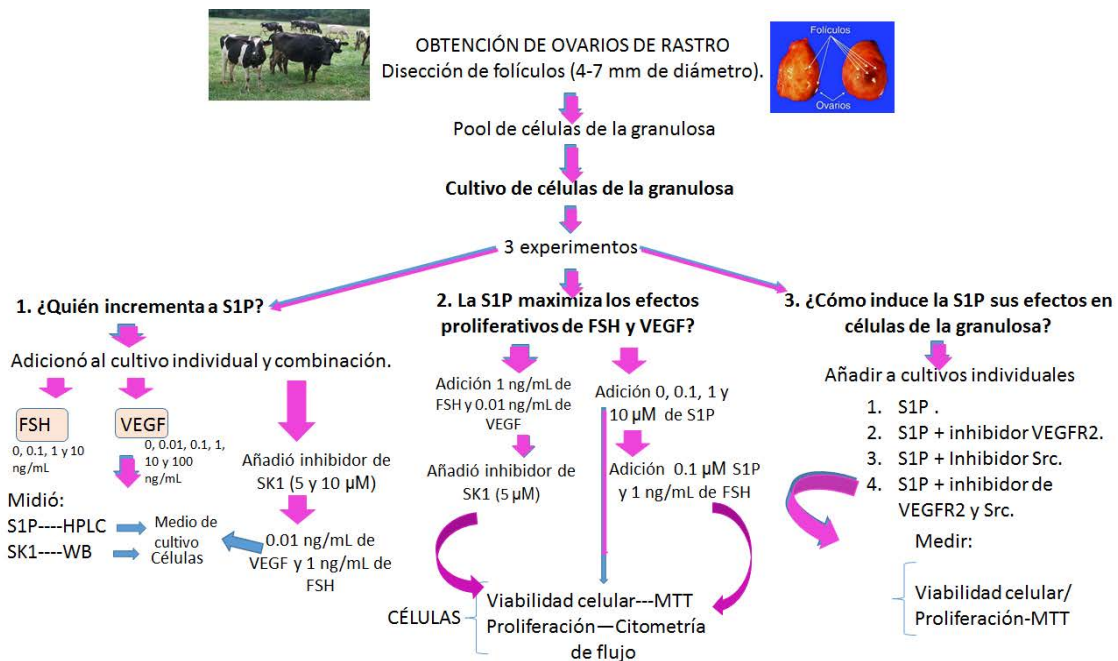


Figura 11. Diseño experimental. Hormona folículo estimulante (FSH), Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), esfingosina 1-fosfato (S1P), esfingosina cinasa 1 (SK1), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), Western Blot (WB), receptor 2 de membrana de VEGF (VEGFR2), proteínas cinasas Src.

8.2. Colección de folículos y aislamiento de células de la granulosa

Para cada cultivo de células de la granulosa, se colectaron en promedio 22 pares de ovarios de vacas o novillas Holstein, sacrificadas en un rastro particular ubicado en Temamatla Estado de México. Los ovarios se colectaron inmediatamente después del sacrificio de los animales en solución salina fisiológica SSF al 0.9%, se lavaron 2 veces con la misma solución y se transportaron al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción a 37°C, en un tiempo máximo de dos horas. Una vez en el laboratorio, los ovarios se enjuagaron 5 veces con solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% y 30 segundos en etanol al 75% para colocarlos nuevamente en SSF al 0.9% y 50 µL de medio McCoy's 5a modificado con bicarbonato (*in vitro*-ME-043), suplementado con 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 (Gropep), 10⁻⁷ M androstenediona (Donada por Departamento de Reproducción de la FMVZ de la UNAM), 2.5 ug/ml transferrina (T8158-sigma) y 4 ng/mL de selenito (S5261-sigma), en ausencia de suero y se mantuvieron todo el tiempo en una estufa de cultivo a 35-37 °C. Los folículos de 4 a 7 mm se disecaron eliminando a los folículos claramente atrésicos (Rosales et al., 2000 y Rosales et al., 2010).

Una vez disecados los folículos, se eliminó el líquido folicular y se hemiseccionaron sobre una caja Petri con medio de cultivo, todo sobre parrillas de calentamiento para mantener las células siempre entre 35-37 °C. En cada folículo se realizó un raspado suave de la pared para separar las células de la granulosa y se juntaron las células

de todos los folículos. La suspensión de células de la granulosa de todos los folículos colectados se transfirió a un tubo de 50 mL haciéndolas pasar a través de un filtro de células (Cell strainer FALCON a Corning Brand, 352350). Se lavaron 2 veces adicionando 3 mL de medio de cultivo previamente gaseado en incubadora de CO₂ y se centrifugaron a 1900 g por 10 minutos. Para eliminar la interferencia de eritrocitos se realizó un último lavado con DPBS (Fosfato Dulbecco con buffer salino) 1X (*in vitro*-SS-05), agua estéril (1:10 v/v) y finalmente las células de la granulosa se resuspendieron en 3 mL de medio de cultivo (Gutiérrez et al., 1997). El número de células de la granulosa fue evaluado tomando 10 µL de la suspensión celular y 90 µL de solución azul Tripán (4%). Esta mezcla fue colocada en una cámara de Neubauer doble para realizar 2 conteos en 5 cuadrantes cada uno. El número de células totales fue obtenido usando la siguiente fórmula: promedio del número de células totales contadas en las 2 cámaras X 10,000 / número de cuadrantes X la dilución (Hernández-Coronado et al., 2015) para determinar el número de células viables.

8.3. Cultivo de células de la granulosa

Las células se cultivaron en placas de 96 pozos con tapa (Thermo scientific, NUNC estéril, 167008) en medio de cultivo McCoy's 5a. Previo al sembrado de células, las placas fueron pre-incubadas con los tratamientos hormonales, S1P o los diferentes inhibidores durante cuatro horas. Setenta y cinco mil células viables en 50 µL de medio se colocaron dentro de cada pozo y se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y 90% humedad (Gutiérrez et al., 1997; Figura 12

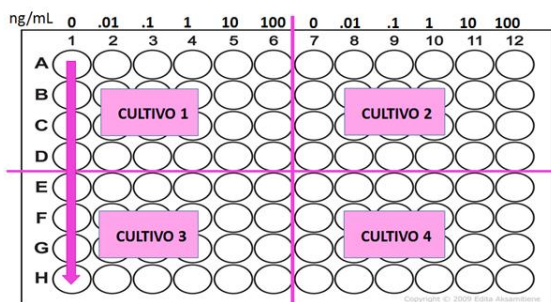
8.4. EXPERIMENTO 1

- ¿Quién o quienes estimulan la síntesis de S1P?
- ¿Los factores tróficos están involucrados en la producción de SK1?

8.4.1. Efecto de FSH y VEGF sobre la producción de esfingosina 1-fosfato

Para evaluar el efecto de FSH y VEGF sobre la síntesis de S1P en células de la granulosa se realizaron cuatro cultivos (células provenientes de ovarios y folículos distintos), incubados por 48 o 96 h en las que se probaron cuatro dosis para FSH y seis para el VEGF. Se adicionó FSH (0, 0.1, 1 y 10 ng/mL; Sigma F8174 St Louis USA; Monga et al., 2011; Shimizu et al., 2007) o VEGF (0, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 ng/mL de VEGF; V7259 St Louis USA; Greenaway et al., 2004), o bien la combinación de ambas en un diseño factorial cuatro X seis.

VEGF



FSH

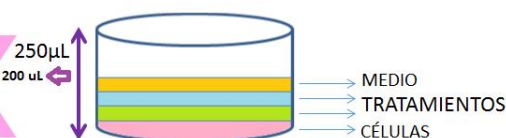
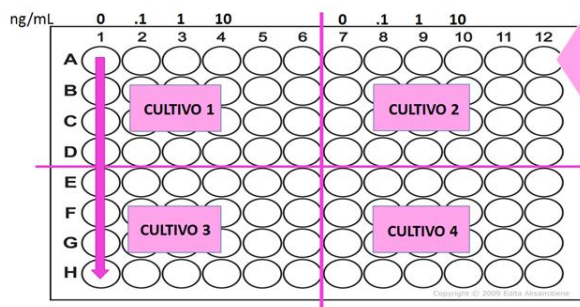


Figura 12. Representación esquemática de los tratamientos hormonales en la placa de cultivo. Cada pozo soporta un volumen hasta de 250 μ L, sin embargo en los cultivos realizados se ajustaron a 200 μ L conteniendo tratamientos, medio y células. Cada cultivo se realizó con células provenientes de diferentes folículos y ovarios.

8.4.2. Extracción y cuantificación de S1P en medio de cultivo de células de la granulosa

Para cada tratamiento se realizó un pool con el medio de cultivo de 4 pozos para obtener 400 μ L a los cuales se les adicionaron 400 μ L de NaCl (2490-Monterrey), 800 μ L de HCL (7647-01-0-J.T. Baker) y se agitaron durante 1 min. Posteriormente se agregó 1.6 mL de cloroformo (34854-sigma) y se agitó por aproximadamente 2 min para posteriormente centrifugar la muestra a 1900 g durante 5 min. Se recuperó la fase acuosa para realizar una segunda extracción y la fase orgánica fue colectada. La fase orgánica de la primera y segunda extracción se juntó y se

evaporaron con nitrógeno. El extracto fue almacenado a -20°C hasta la cuantificación de S1P por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC; Villa *et al.*, 2009; Sensken *et al.*, 2010; Hernández-Coronado *et al.*, 2015).

El estándar de S1P (Sigma, Saint Louis USA-S 9666) y los extractos de medio de cultivo fueron analizados por HPLC en un equipo automatizado Hitachi Elite Lachrom L-2200 con una columna XTerra RP18 ($5\ \mu\text{m}$, $3.0 \times 150\ \text{mm}$) utilizando una precolumna de 2PK, XTerra RP18 ($3.0 \times 20\ \text{mm}$) y un detector de fluorescencia Hitachi Elite Lachrom L-2485 con una longitud de onda de excitación y emisión de 340 y 435 nm respectivamente. La corrida del estándar y muestras del medio de cultivo fueron derivatizados con *O*-phtalaldehde (OPA) por 20 min y el loop-sistema de inyección tanto para el estándar como para las muestras fue de $30\ \mu\text{l}$. La derivatización consistió en tomar $50\ \mu\text{l}$ del estándar o de la muestra para mezclarlos con $50\ \mu\text{l}$ de OPA (5mg OPA, 0.1mL de etanol, $10\ \mu\text{l}$ 2-mercaptoetanol y 9.9 mL de ácido bórico pH 10.5 al 3% (p/v) como describe Merrill *et al* (1988). Las corridas para el estándar de S1P y el medio de cultivo fueron isocráticas utilizando como solvente metanol y un buffer de fosfato de potasio con pH 7 (K_2HPO_4) 5 mM, (80:20), con un flujo de 0.6 mL/min (Figura 13).

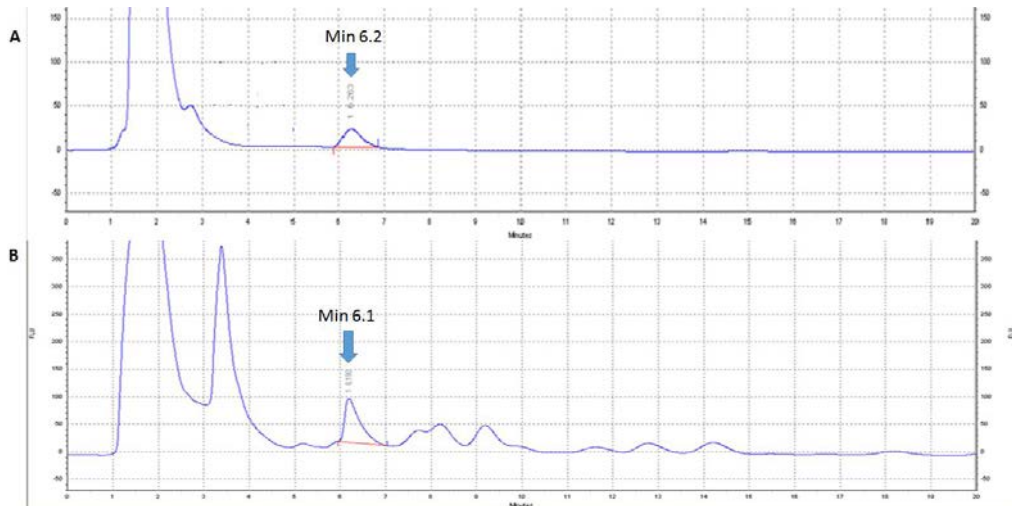


Figura 13. Esquematzación de la identificación de esfingosina 1- fosfato (S1P) en medio de cultivo de células de la granulosa de bovino. A, estándar de S1P identificado en un tiempo de retención de 6.2 min y B, S1P determinado en medio de cultivo con un tiempo de retención de 6.1 min.

8.4.3. Identificación de esfingosina cinasa 1 (SK1) en células de la granulosa mediante Western Blot

Para identificar la proteína SK1 se realizaron 4 cultivos de células de la granulosa que se cultivaron y fueron removidas por la adición de 150 μ L de buffer de lisis (150 mM de NaCL (2490-Monterrey), 20 mM de Tris HCL (161-0719-Biorad), 5 mM de EDTA (8993-01-J. T. Baker), glicerol al 10% PH 7.4 (56915- J. T. Baker), 1% de nonidet P-40 (213277-sigma), inhibidor de proteasas (0.20 mM de aprotinin, 5.25 mM de leupeptin y 1.8 mM de pespstatin A, P2714,sigma) y 1 mM de ortovanadato de sodio como inhibidor de fosfatasa (S6508-sigma) seguido de raspados de cada pozo de la placa de cultivo para desprender las células y colectándolas en tubos Eppendorf. Se homogenizaron y centrifugaron a 13,000 rpm/30min/4°C y en el sobrenadante se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford,

(1976). Una alícuota con 40 µg de proteínas fue sometida a electroforesis en SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas por 24h a 4°C con un bloqueador de fosfoproteínas (Phosphoprotein Blocker Millipore-WBAVDP001). Posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios contra (Sphingosine Kinase 1 (Ser-225), phospho-specific 1:250, SP1641-ECM Bioscience y GAPDH 1:500, sc-59540-Santa Cruz Biotechnology) como control de carga en Bloqueador de fosfoproteínas. Las membranas se lavaron 3 veces/15 min con PBS-Tween-20 y se mantuvieron incubadas con los anticuerpos secundarios (Anti-Rabbit 1706515-BIORAD y Anti-Mouse 1706516-BIORAD para SK1 y GAPDH, respectivamente) por 24 h a 4°C en PBS-Tween 20. La señal fue detectada mediante el reactivo quimioluminiscente Luminata Forte,WBLUF0500 (Millipore).

8.4.4. Efecto de un inhibidor de esfingosina cinasa 1 (SK-178) sobre la producción de S1P por células de la granulosa

Para determinar si los efectos de FSH y VEGF sobre la síntesis de S1P son dependientes de la activación de SK1, las células fueron estimuladas con 1 ng/mL de FSH y 0.01 ng/mL de VEGF en presencia de 0, 5 y 10 µM de un inhibidor de SK1 (SK-178, Calbiochem; 567732). Se realizaron 4 cultivos de células de la granulosa y a cada tratamiento correspondieron 4 pozos. Después de 48 h de cultivo, se colectó el medio de los 4 pozos correspondientes al mismo tratamiento y se realizó extracción y cuantificación de S1P mediante HPLC como se describió anteriormente.

8.5. EXPERIMENTO 2

- El incremento en la síntesis de S1P maximiza los efectos proliferativos de gonadotropinas, IGF-I y VEGF en células de la granulosa?
- S1P es necesario para la sobrevivencia y proliferación de células de la granulosa?

8.5.1. Efecto de diferentes dosis de FSH y VEGF sobre el número de células de la granulosa

Como primer paso para dar respuesta a las preguntas planteadas en el experimento 2, se implementaron 2 cultivos donde las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de FSH (0, 0.1, 1 y 10 ng/mL) y VEGF (0, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100) e incubadas durante 48 h para determinar la dosis con la cual se tuvo el mayor número de células de la granulosa. El cálculo del número de células, se hizo por la técnica de MTT descrito más adelante.

8.5.2. Efecto de S1P sobre el número de células de la granulosa

Para determinar el efecto de S1P sobre el número de células de la granulosa, se evaluaron cuatro dosis de este esfingolípido (0, 0.1, 1 y 10 ng/mL; Sigma, Saint Louis USA-S 9666). Esta evaluación se realizó en 3 cultivos y cada pozo se tomó como una repetición (n=8 por tratamiento). Una vez identificada la dosis más efectiva de S1P, se probaron sus efectos sobre el número de células de la granulosa en 3 cultivos independientes así como con 1 ng/mL de FSH. Los

tratamientos se adicionaron al medio de cultivo y las incubaciones fueron de 48 y 96 h, de acuerdo a lo siguiente: Control (0 ng/mL de FSH y 0 ng/mL de S1P); 1 ng/mL de FSH, 0.1 ng/mL de S1P y su combinación (1 ng/mL de FSH más 0.1 ng/mL de S1P). Para cada tratamiento se tuvieron 8 repeticiones.

8.5.3. Determinación del número de células de la granulosa

La determinación de la proliferación de células de la granulosa se realizó mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolio (MTT) como describe Rangel et al., 2009. El ensayo de MTT se fundamenta en la reducción de la sal de tetrazolio, MTT, por las células viables. Las deshidrogenasas presentes en las células usan NADH o NADPH como coenzimas para convertir el MTT (soluble en agua, de color amarillo) a cristales insolubles de formazán, color púrpura (Cai *et al.*, 2015). Después del tiempo de incubación se adicionaron 20 µL de la solución MTT (5 mg/mL de Tetrazolio-Sigma M5655, en medio de cultivo) a cada pozo y se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y 90% humedad durante 24 h. Pasadas las 24 h se adicionó a cada pozo 100 uL 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 uL de ácido acético 1 N (9507-02- J. T. Baker) y 500 uL de ácido clorhídrico 1 N. Después, las células se incubaron por 4 h a temperatura ambiente en obscuridad 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 células de la granulosa por pozo (15,750-252,000 células). Se dejó estabilizar por 1 hora en

incubadora, se adicionó 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 595 nm como se menciona. 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.

8.5.4. El efecto de FSH y VEGF sobre el número de células de la granulosa depende de la síntesis de S1P

Para evaluar si el efecto de FSH y VEGF sobre la proliferación depende de la producción de S1P, se realizaron cuatro cultivos con cuatro réplicas para cada tratamiento a los cuales se les adicionó 0 y 5 μ M de SK-178 (inhibidor de SK1) en presencia o ausencia de 1 ng/mL de FSH o 0.01 ng/mL de VEGF. Después de 48 y 96 h de cultivo, se obtuvieron 150 μ L de medio de cultivo y el número de células se estimó por la técnica de MTT ya previamente descrita.

8.5.5. Efecto de S1P sobre el ciclo celular y la proporción de células de la granulosa hipodiploides mediante citometría de flujo

El efecto de S1P y FSH sobre el ciclo de las células de la granulosa, fue analizado por citometría de flujo. Para este estudio se emplearon cuatro cultivos diferentes de células de la granulosa compuestos por 8 pozos por tratamiento. Después de 48 h de incubación, las células fueron colectadas y organizadas en grupos por cada

tratamiento, se diluyeron a una concentración final de 1.0×10^6 células/mL. Las células fueron permeabilizadas con 125 μ L por pozo de BD Cycletest Plus Buffer Solution y el DNA fue marcado con yoduro de propidio usando Cycle Test Plus DNA reagent kit (340242, Becton Dickinson Company, San José, CA, USA). La proporción de células de la granulosa en las diferentes fases del ciclo celular se determinó por su contenido de DNA nuclear en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA) equipado con un láser de argón (488nm). Se colectaron 25,000 eventos para cada muestra. Basados en su contenido de DNA, los porcentajes de células en cada etapa del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) e hipodiploides o apoptóticas (situadas a la izquierda de G0/G1), fueron calculadas usando el programa Modfit Lt. 4.1.

8.6. EXPERIMENTO 3

■ ¿Cómo induce la S1P sus efectos en las células de la granulosa?

8.6.1. Efecto de S1P sobre el mecanismo de transactivación del receptor 2 de VEGF (VEGFR2) en células de la granulosa

Con la finalidad de conocer si los efectos proliferativos de S1P en células de la granulosa son inducidos a través de la transactivación de VEGFR2, se realizaron 2 cultivos y cada pozo se tomó como una repetición (n=8 por tratamiento). En el primer cultivo, las células fueron estimuladas con 0.1 μ M de S1P, 5 y 10 μ M de un inhibidor de las proteínas Src-proteínas tirosina cinasa, I-Src (PP2, BML-E1297-0001, Enzo

Life Science) y 5 o 10 μM de un inhibidor de VEGFR2, I-VEGFR2 (CB0-P11, US1676496, Merck Millipore), ambos inhibidores en presencia de 0.1 μM de S1P para conocer la dosis ideal de los inhibidores. El segundo cultivo consistió en estimular a las células con los siguientes tratamientos: control (medio sin tratamientos), 0.1 μM de S1P ó 10 μM de I-Src, ó 5 μM de I-VEGFR2 y su combinación (0.1 μM de S1P, 10 μM de I-Src, 5 μM de I-VEGFR2). Pasadas 48 h de incubación, se obtuvo el medio de cultivo y el número de células se estimó por MTT.

8.7. Análisis estadístico.

El efecto de FSH, VEGF así como su interacción con el tiempo de incubación sobre la producción de S1P fue evaluado mediante análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre medias de las diferentes concentraciones de FSH y VEGF contra el control fueron determinadas por la prueba de Dunnet's. De igual forma, el efecto de FSH, S1P y su interacción con el tiempo sobre el número de células de la granulosa fue evaluado mediante ANOVA y las diferencias entre los tratamientos fue determinada por la prueba de Tukey's. En este caso, previo al análisis del número de células, los datos fueron transformados a valores logarítmicos para corregir la heterocedasticidad de las varianzas. El efecto del inhibidor de S1P (SK-178) sobre la producción de S1P y el número de células de la granulosa estimulada o no con FSH y VEGF fue evaluado mediante ANOVA, seguido por la prueba de Tukey's. En todos los casos las réplicas de cada cultivo fueron consideradas como efecto aleatorio. Por otro lado, el efecto de S1P y FSH sobre la distribución de

células de la granulosa en las diferentes etapas del ciclo celular fueron analizadas por regresión ordinal, seguida de una transformación logarítmica de los datos. Los resultados fueron entonces nuevamente transformados para obtener la proporción de células de la granulosa en cada etapa del ciclo celular. Finalmente, el efecto del uso de inhibidores de las proteínas Src y del receptor tipo 2 de VEGF sobre el número de células de la granulosa fue evaluado mediante ANOVA, usando las diferentes concentraciones de los tratamientos como efectos fijos y las réplicas de cada cultivo fueron consideradas como efecto aleatorio.

9. Resultados

9.1. La hormona folículo estimulante (FSH) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) incrementan la producción de S1P en células de la granulosa

La mejor respuesta en la producción de S1P, se obtuvo con la adición de 1 ng/mL de FSH al cultivo de células de la granulosa, con esta dosis se tuvo un incremento significativo en la concentración de S1P ($P < 0.05$) en el medio a 96 h de incubación respecto del grupo control (0 ng/mL de FSH, Figura 13 panel B). La adición de 0.1 ó 10 ng/mL de FSH, no modificó las concentraciones de S1P ($P > 0.05$) respecto al control (Figura 13).

En cuanto a VEGF solo se observó efecto de este factor de crecimiento sobre la concentración de S1P a las 48 h de cultivo (Figura 14 C) pero no a las 96 h (Figura 14 D). En los cultivos de 48 h con la adición de 0.01 ng/mL de VEGF al medio de cultivo, se incrementó la concentración de S1P ($P < 0.05$) comparado con el control (0 ng/mL de VEGF). En tanto que las concentraciones mayores de VEGF (0.1, 1, 10 y 100 ng/mL) produjeron concentraciones de S1P similares a los del grupo control (Figura 14 panel C y D).

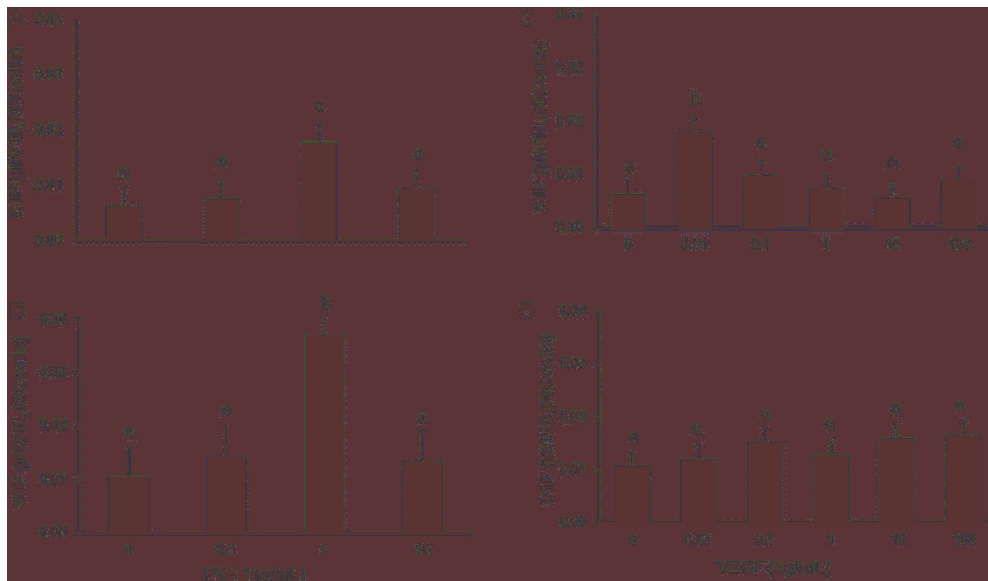


Figura 14. Concentración de S1P en el medio de cultivo de células de la granulosa de folículos bovinos de 4-7 mm de diámetro. (A) Efecto de FSH sobre la producción de S1P a las 48 h de incubación. (B) Efecto de FSH sobre la producción de S1P a las 96 h de incubación. (C) Efecto de VEGF sobre la producción de S1P a las 48h de incubación. (D) Efecto de VEGF sobre la producción de S1P a las 96h de incubación. a y b: (Literales diferentes indican diferencias significativas $P < 0.05$ entre tratamientos). Las concentraciones de S1P se presentan como relativas a 10,000 células al final del cultivo.

Basados en los resultados anteriores, se probó si la combinación de 1 ng/mL de FSH con dosis crecientes de VEGF tenía un efecto sumatorio sobre la concentración de S1P en el medio de cultivo. Los resultados muestran que a las 48 h la adición de VEGF en dosis crecientes, reduce casi de manera lineal la concentración de S1P en el medio y sólo la combinación de 1 ng/mL de FSH con 0.01 ng/mL de VEGF ocasiona un incremento ($P < 0.05$) de S1P respecto al grupo control (0 ng/mL), sin embargo este incremento no es diferente ($P > 0.05$) comparado al que se observa con el uso solamente de FSH (Figura 15 A). En cuanto a los resultados a las 96 h (Figura 15 B), la concentración de S1P tiene un comportamiento bifásico en el cual hay una reducción del esfingolípido al adicionar

0.01 y 0.1 ng/mL de VEGF en combinación con 1 ng/mL de FSH, mientras que con el uso de concentraciones mayores de VEGF hay un incremento lo cual es solo significativamente mayor ($P < 0.05$) respecto al control con 10 ng/mL de VEGF (Figura 15 B). De manera similar que a las 48 h, a las 96 h ninguna combinación de FSH con VEGF incrementa las concentración de S1P comparada con el uso de FSH solamente (1 ng/mL). Con estos resultados es evidente que el uso de 1 ng/mL de FSH ó 0.01 ng/mL de VEGF por separado en los cultivos es suficiente para producir la mayor síntesis de S1P en las células de la granulosa.

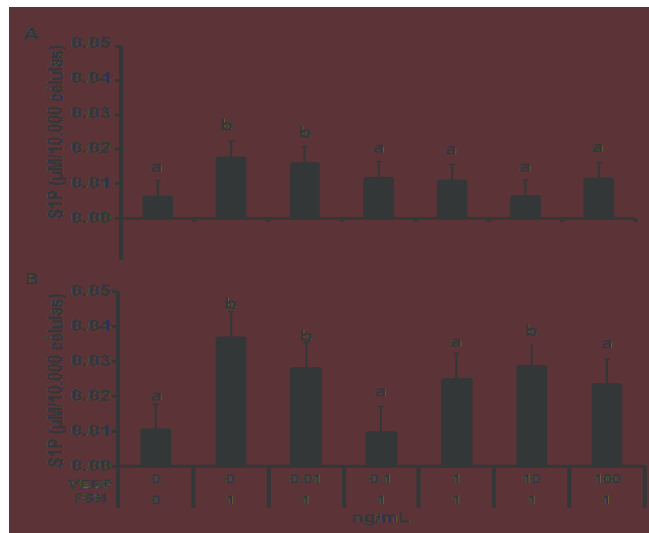


Figura 15. Concentración de S1P en medio de cultivo de células de la granulosa de folículos de bovinos de 4-7 mm de diámetro. (A). Efecto de la combinación de 1 ng/mL de FSH y VEGF (0, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 ng/mL) sobre la producción de S1P a las 48 h y a las 96 h (B) de incubación. (B). a y b: (Literales diferentes indican diferencias significativas $P < 0.05$ entre tratamientos). Las concentraciones de S1P se representan como relativas a 10,000 células al final del cultivo.

9.2. FSH y VEGF estimulan la fosforilación de esfingosina cinasa 1 (SK1) en células de la granulosa

Los resultados indican que las células de la granulosa en cultivo tratadas con 1 ng/mL de FSH expresan el doble de la enzima SK1 fosforilada (pSK1) respecto al control (células sin el estímulo de FSH y VEGF) ($P < 0.05$), algo muy similar a lo observado en células estimuladas con 0.01 ng/mL de VEGF ($P < 0.05$), (Figura 15 A y B). El aumento de pSK1 con estos dos tratamientos nos permite explicar por qué se encontraron las mayores concentraciones de S1P cuando se adicionaron estos mismos tratamientos 1ng/mL de FSH y 0.01ng/mL de VEGF a los cultivos (Figura 14).

Debido a que las dosis de 1 ng/mL de FSH (96 h) y 0.01 ng/mL de VEGF (48 h) mostraron una mejor respuesta en la síntesis de S1P por las células de la granulosa (Figura 14) y a que con estas dosis se incrementa la concentración de pSK1 (Figura 16 A y B), se evaluó si la inhibición de esta enzima reduce la síntesis de S1P en presencia o no de FSH y VEGF. Los resultados muestran que la adición de SK-178 (inhibidor específico de SK1) disminuyó dramáticamente la producción de S1P de manera dosis dependiente en células cultivadas FSH y VEGF. Interesantemente, cuando las células fueron estimuladas con FSH y VEGF en presencia de SK-178 (5 y 10 μM), las concentraciones de S1P en el medio de cultivo se redujeron a niveles similares a los del control (Figura 16 C y D).

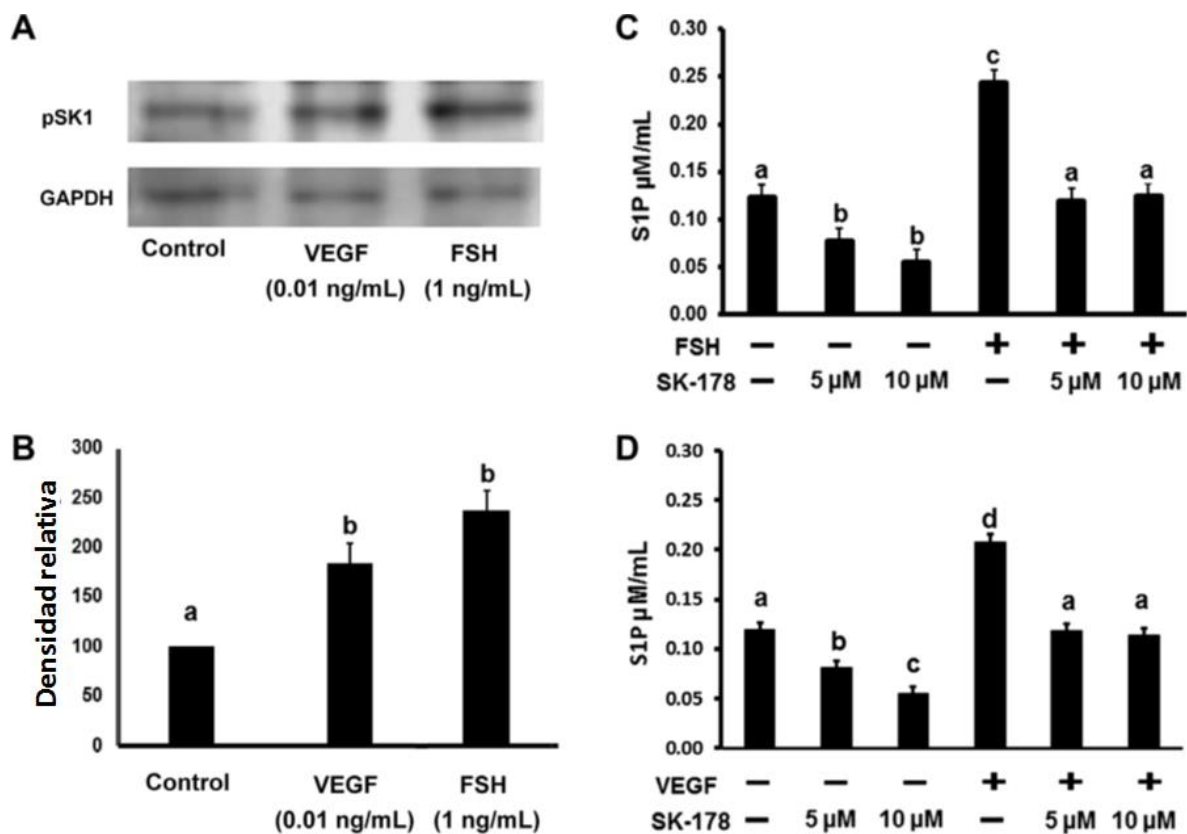


Figura 16. Análisis de Esfingosina cinasa 1 fosforilada (pSK1) mediante Western blot (A). Cuantificación mediante la densidad relativa de la banda de SK1 fosforilada en células de la granulosa de bovino estimuladas por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) ó con la hormona folículo estimulante FSH (B). Efecto del inhibidor de SK1 (SK-178) sobre la producción de esfingosina 1-fosfato (S1P) por células de la granulosa de bovino de folículos de 4-7 mm de diámetro después de 48 h de cultivo con o sin 1 ng/mL de FSH (C) o 0.01 ng/mL de VEGF (D).

9.3. FSH y VEG incrementan el número de células de la granulosa en cultivo

La adición de 1 ng/mL, así como 0.01 y 0.1 ng/mL de VEGF incrementaron el número de células de la granulosa viables ($P < 0.05$) después de 48 h de incubación, respecto al control. Sin embargo, el uso de dosis más altas de estas hormonas no

modificó la viabilidad de las células, sino que se redujo a niveles similares a los del grupo control (Figura 17).

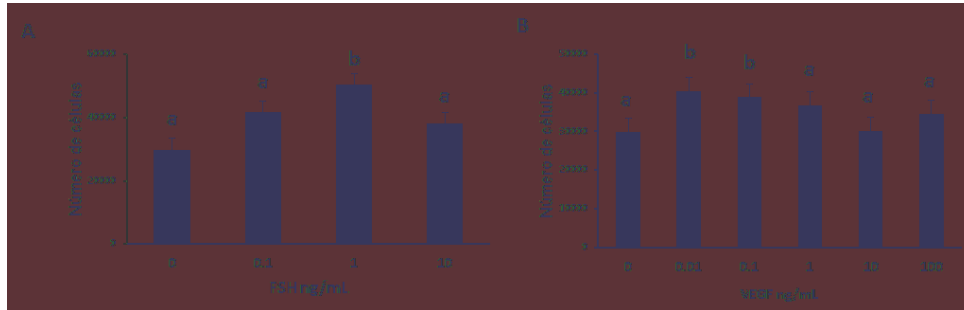


Figura 17. Efecto de diferentes dosis de la hormona folículo estimulante (FSH) y el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) sobre el número de células de la granulosa a las 48 h de incubación.

9.4. Esfingosina 1-fosfato incrementa el número de células de la granulosa en cultivo

En cuanto al efecto de S1P sobre la proliferación de células de la granulosa, los resultados muestran que la adición de 0.1 μM de S1P a los cultivos incubados por 48 y 96 h, incrementa ($P < 0.05$) el número de células comparado con el grupo control. Sin embargo el uso de (10 μM) de S1P provocó que el número de células se reduzca ($P > 0.05$) en comparación con el control y con el uso de 0.1 μM de S1P (Figura 18 A y B).

Basados en estos resultados se evaluó si el uso de 0.1 μM de S1P tiene efectos similares sobre la proliferación en cultivos de células de la granulosa que los que se obtuvieron con 1 ng/mL de FSH. Los resultados muestran que efectivamente a las

48 (Figura 19 A) y 96 h (Figura 19 B), el uso de S1P en el medio de cultivo incrementa ($P < 0.05$) el número de células de manera similar al observado con el tratamiento con FSH. Sin embargo, cuando se trataron las células con la combinación de FSH y S1P, se observó un incremento en el número de células de la granulosa, respecto al grupo control, pero no diferente al observado con los tratamientos con FSH o S1P por separado (Figura 19 A y B), lo que indica que sus efectos no se suman.

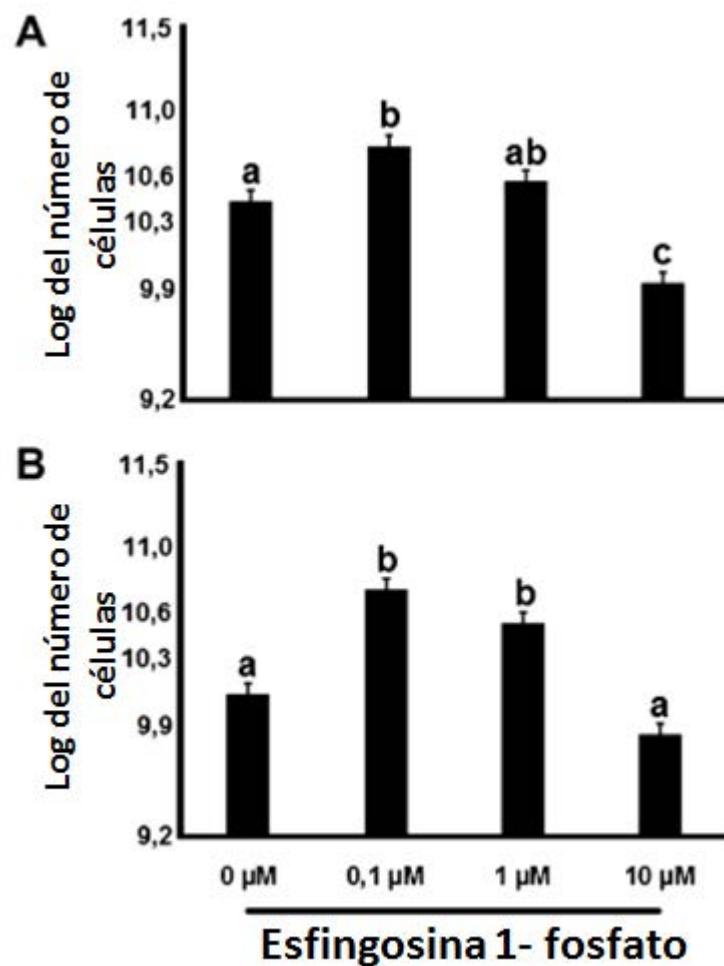


Figura 18. Efecto de esfingosina-1-fosfato (0, 0.1, 1 y 10 μM) sobre el número de células de la granulosa incubadas por 48 h (A) y 96 h (B). a, b y c indican diferencias significativas entre tratamientos $P < 0.05$.

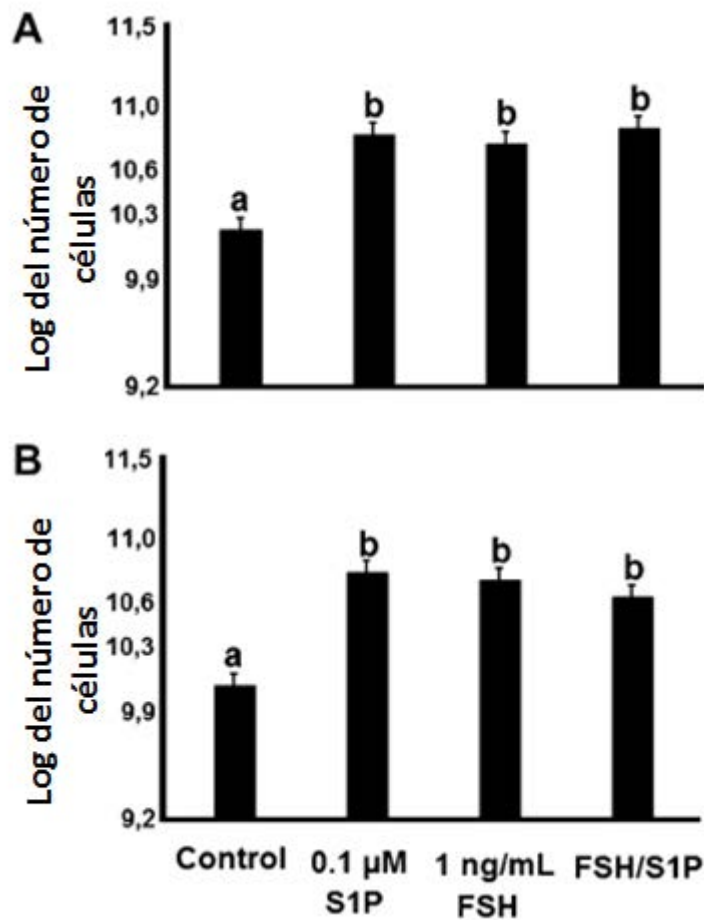


Figura 19. Evaluación del número de células de la granulosa de bovino después de 48 h (A) y 96 h (B) de incubación con esfingosina-1- fosfato (S1P, 0.1 μ M), FSH (1 ng/mL) o la combinación de ambos. a y b indican diferencias significativas entre tratamientos $P < 0.05$.

9.5. El efecto de FSH y VEGF sobre el número de células de la granulosa depende de la síntesis de S1P

Como mostró antes, el tratamiento con 1 ng/mL de FSH y 0.01 ng/mL de VEGF incrementan el número de células de la granulosa ($P < 0.05$) a las 48 y 96 h de cultivo (Figura 17). No obstante, la adición de SK-178 como inhibidor de SK1 (5 μ M) en

presencia de FSH ó VEGF produjo una reducción del número de células de la granulosa en ambos tiempos de incubación ($P < 0.05$), caso contrario a lo que sucedió con la adición de SK-178 ($5 \mu\text{M}$) en usencia de estímulo de FSH y VEGF donde no se afectó el número de células de la granulosa cultivadas a las 96 h pero si a las 48 h aunque estadísticamente el número de células fue inferior a lo mostrado con 1 ng/mL de FSH ($P < 0.05$, Figura 20).

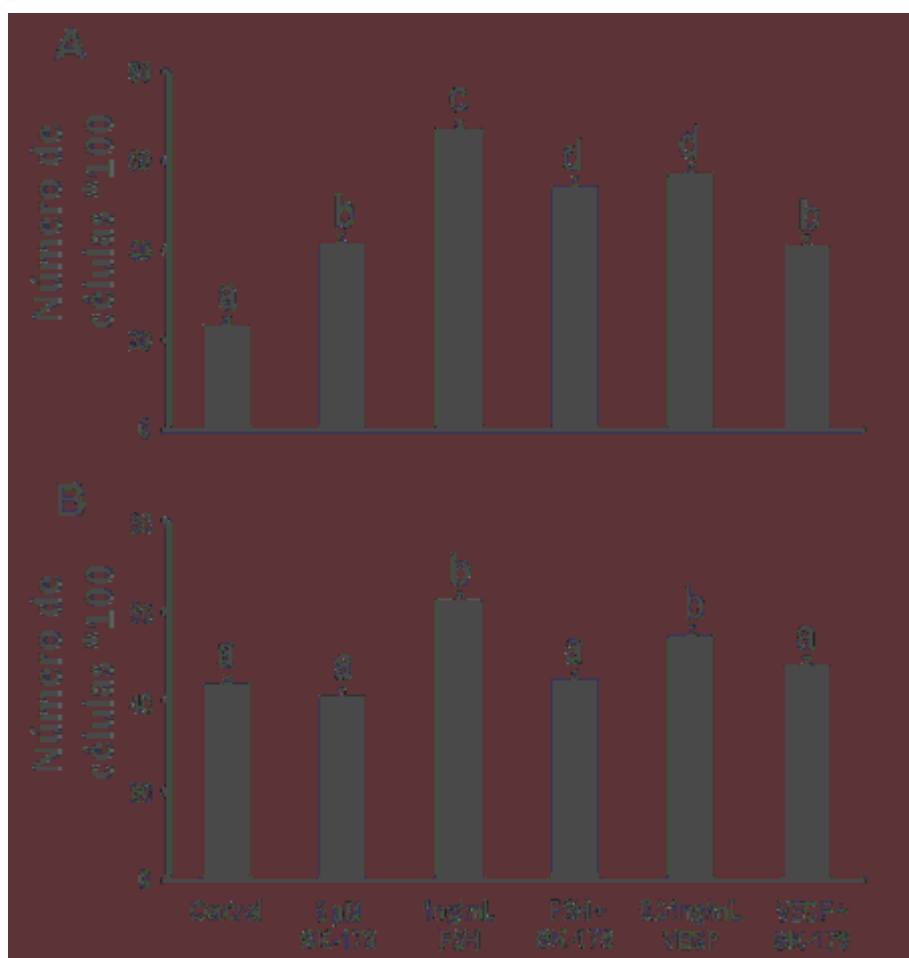


Figura 20. Efecto de un inhibidor de esfingosina cinasa 1 (SK-178) sobre el número de células de la granulosa de folículos de 4-7 mm de diámetro después de 48 (A) y 96 h (B) de incubación en presencia o ausencia de 1 ng/mL de FSH ó 0.01 ng/mL de VEGF. a, b y c indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

9.6. Esfingosina 1-fosfato induce la proliferación de células de la granulosa en cultivo, estimada por citometría de flujo

El efecto de diferentes dosis de S1P (0, 0.1, 1 y 10 μM) sobre la proliferación de células de la granulosa se hizo evidente, por el incremento de células en la etapa S y G2/M del ciclo celular ($P < 0.05$). Similarmente, la proporción de células con contenido hipodiploide de DNA se incrementó con la dosis de S1P. Es importante resaltar que la adición de 10 μM de S1P, incrementó 3.6 y 2.1 veces ($P < 0.05$) más la proporción de células hipodiploides comparado con el control con 0.1 y con 1 μM de S1P (Figura 21 A).

Para precisar los datos obtenidos con la técnica de MTT sobre el número de células de la granulosa en presencia de 0.1 μM de S1P, 1 ng/mL de FSH ó su combinación. Se evaluó la proporción de células de la granulosa en fase S y G2/M después que fueron sometidas a los diferentes tratamientos. Los resultados indican que el tratamiento con 0.1 μM de S1P o bien con 1 ng/mL de FSH incrementa la proporción de células de la granulosa en las fases S y G2/M del ciclo celular. En general, estos dos tratamientos produjeron una distribución similar en las fases del ciclo celular y estadísticamente diferente ($P < 0.05$) a la de las células del grupo control. Sin embargo, cuando se usó la combinación de 0.1 μM de S1P más 1 ng/mL de FSH como tratamiento para las células de la granulosa, la distribución de éstas, en las fases del ciclo celular fue similar a la del grupo control (Figura 21 B).

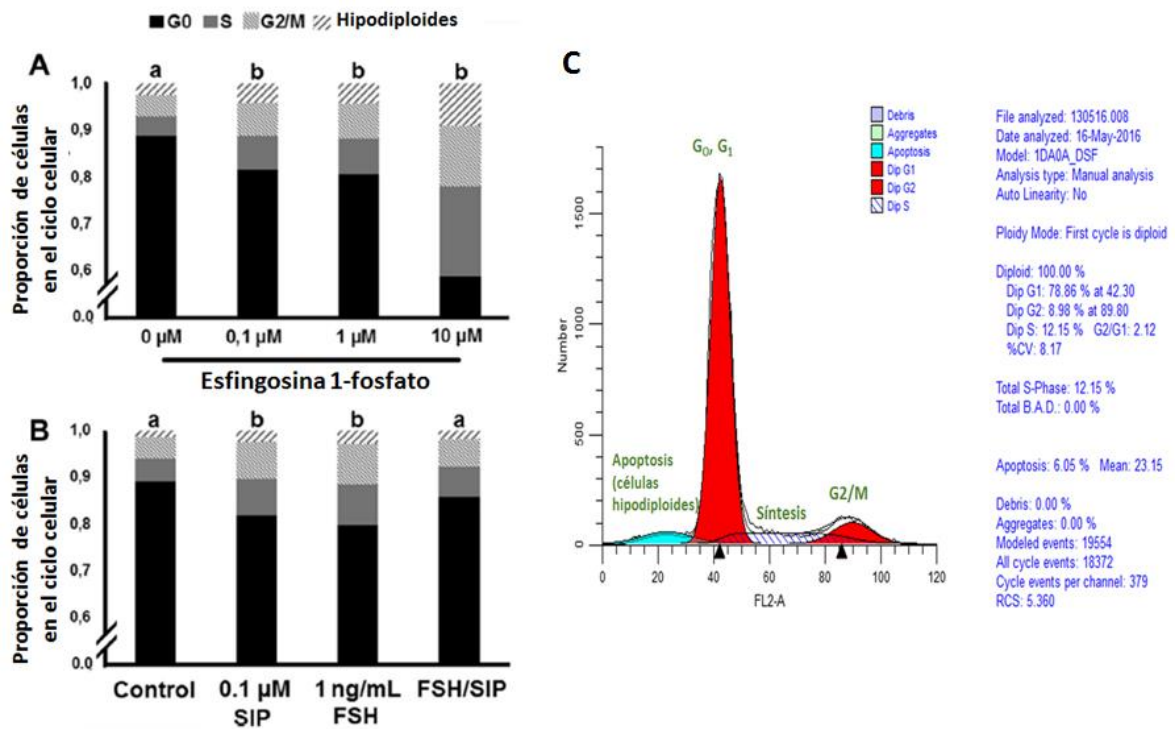


Figura 21. Efecto de S1P (0, 0.1, 1 y 10) sobre la distribución de células de la granulosa en las diferentes etapas del ciclo celular (A) así como, en presencia de 1 μM de S1P y 1 ng/mL de FSH o su combinación (1 μM de S1P y 1 ng/mL de FSH) (B). Las células de la granulosa fueron colectadas de folículos ováricos de bovino de 4-7 mm de diámetro y cultivadas durante 48 h. a y b indican diferencias significativas en la distribución de las células en el ciclo celular contra el control (P <0.01). (C) Representación de un histograma obtenido por citometría de flujo donde se esquematizan todas las fases del ciclo celular en células de la granulosa de bovino. GO/G1 corresponden a células que están quiescentes o que están por iniciar su multiplicación. S, son células que están en síntesis, es decir replicando su ADN. G2, células que se preparan para dividirse y M, células que se están dividiendo. Las células hipodiploides son aquellas que presentan ADN fragmentado (apoptóticas).

9.7. S1P promueve la proliferación de células de la granulosa en cultivo mediante la transactivación de VEGFR2

Los resultados del número de células de la granulosa en cultivo en respuesta a S1P o a inhibidores de Src y VEGFR2 mostraron un número mayor de células de la granulosa en los cultivos estimulados con 0.1 μM de S1P respecto al control

($P < 0.05$). Sin embargo, en presencia de 5 y 10 μM de I-VEGFR2 (inhibidor específico del receptor), así como de 5 μM de I-Src (proteínas con actividad tirosina cinasa), el número de células de la granulosa se redujo ($P < 0.05$) hasta niveles similares a los del grupo control. Lo mismo fue observado con la combinación de los inhibidores en presencia de 0.1 μM de S1P (Figura 22 A y B). Interesantemente los efectos de S1P sobre el número de células de la granulosa en presencia de 10 μM de I-Src se redujeron ($P < 0.05$) incluso, por debajo del grupo control (Figura 22 A y B).

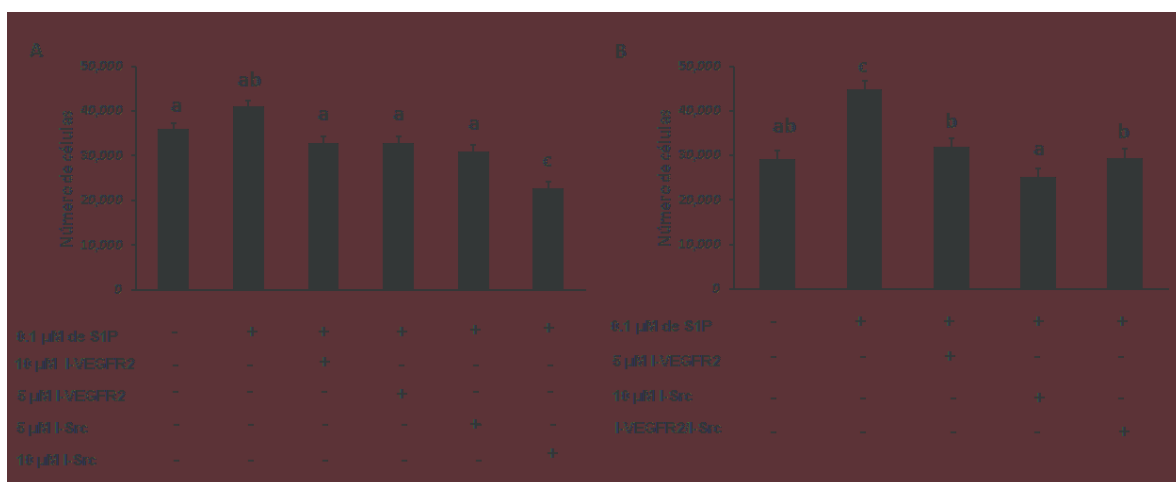


Figura 22. La S1P estimula la proliferación de células de la granulosa vía la transactivación del VEGFR2. A) Efecto de diferentes dosis de I-Src e I-VEGFR2 en presencia de S1P sobre el número de células de la granulosa. B) Efecto de S1P sobre el número de células de la granulosa en presencia de 5 y 10 μM de I-VEGFR2 e I-Src respectivamente ó su combinación (S1P/I-VEGFR2/I-Src). a, b y c indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

10. Discusión

En el presente trabajo se demuestra que tanto FSH como VEGF incrementan la síntesis de S1P en células de la granulosa en cultivo a través de la activación de SK1. También nos indica que S1P incrementa el número de células de la granulosa viables y su proliferación de manera similar a lo observado por efecto de la presencia en el cultivo de FSH y VEGF. Los resultados de los experimentos sustentan que FSH y en menor medida VEGF promueven la síntesis de S1P en las células de la granulosa y que este esfingolípidio actúa de manera autócrina o parácrina favoreciendo la sobrevivencia y proliferación de estas células, muy probablemente a través de la transactivación de VEGFR2.

El desarrollo folicular involucra la diferenciación, proliferación y sobrevivencia de las células de la teca y de la granulosa, estos procesos son estimulados por las gonadotropinas, estrógenos, así como por factores de crecimiento dentro de los cuales destaca VEGF (Fogui et al., 1998; Flores et al., 2005; Vásquez y Olivera, 2010). Los folículos ováricos antrales contienen un ovocito rodeado por células de la granulosa, una lámina basal y capas de células de la teca interna y externa. El crecimiento y maduración de estos folículos durante el reclutamiento cíclico del desarrollo folicular está determinado por la hormona FSH (Hunzicker Dunn y Maizels, 2006). La FSH tiene receptores situados exclusivamente en células de la granulosa y por esta razón es la encargada de orquestar su proliferación, crecimiento y diferenciación (Hunzicker Dunn y Maizels, 2006). En células de la granulosa de gallina *in vitro*, Lin et al., (2011) demostraron que el tratamiento con FSH incrementa la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación

(PCNA) y reduce el porcentaje de células apoptóticas. De manera similar, Mani et al., 2010 mostraron que la adición de altas dosis de FSH (50 ng/mL) reduce la expresión del ARNm de BAX (activador de apoptosis,) en células de la granulosa de bovino. Asimismo, el tratamiento con 1 ng/mL de FSH a cultivos de células de la granulosa de bovino redujo la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1), de la caspasa 3 activa e incrementó el porcentaje de células en etapa S+G2/M del ciclo celular (Zheng et al., 2009). Además, de las gonadotropinas, existen evidencias que indican que los factores de crecimiento, tales como el VEGF a través de su receptor 2 también están implicados en controlar la fase de reclutamiento y selección durante el desarrollo folicular (Zimmermann et al., 2001 y 2003) y existe información que indica que es un factor importante en la proliferación y sobrevivencia de células de la granulosa (Rosales-Torres et al., 2012). Greenaway et al., (2004) demostró que la adición de 50 ng/mL de VEGF a células de la granulosa en cultivo, reduce la expresión de la caspasa 3 activa protegiendo a las células de la apoptosis, además la estimulación con 1 ng/ml VEGF promueve la proliferación de células de la granulosa (Doyle et al., 2010). En nuestras manos pudimos comprobar que con 1 ng/mL de FSH, así como con 0.01 y 0.1 ng/mL de VEGF se incrementó el número de células de la granulosa en los cultivos, con lo cual corroboramos los efectos que otros autores han descrito para FSH y VEGF en este tipo de células.

Por otro lado, en la actualidad, además de las gonadotropinas, esteroides y los factores de crecimiento, se ha visto una participación sobresaliente de los SPLs a nivel reproductivo (Guo et al., 2014) específicamente durante el desarrollo folicular. Los SPLs tienen un papel importante en los conocimientos novedosos acerca de

la biología de la membrana celular y del papel importante de estos compuestos como segundos mensajeros al modular la homeostasis celular, participar en diversas vías de señalización y por responder a una gran variedad de estímulos (Salmanzadeh et al., 2013). Dentro de los principales SPLs destacan Sph, Cer, Ceramida 1-fosfato y S1P. Este último esfingolípido despertado mucho interés en la investigación por ser una molécula bioactiva que regula procesos biológicos de manera intracelular y extracelular en diversos tejidos (Guo et al., 2014). La producción de S1P está determinada por la transformación de Sph a S1P por efecto de la enzima SK1 (Maceyka y Spiegel, 2014). Los procesos modulados por S1P son, entre otros: la regulación del crecimiento celular, la proliferación, diferenciación, sobrevivencia celular y migración (Sun et al., 2010). Estudios recientes en nuestro laboratorio mostraron que las células de la granulosa de folículos sanos de bovino, contienen tres veces más S1P que los folículos atrésicos (Hernández et al., 2015). En el presente estudio demostramos que cuando se adiciona FSH y en menor medida VEGF al medio de células de la granulosa en cultivo, se incrementa la concentración de S1P respecto a los niveles detectados en el grupo control, lo cual indica que S1P es un mediador para los efectos tróficos de FSH y VEGF sobre células de la granulosa. Tanto FSH como VEGF provocaron el incremento de SK1-fosforilada, de manera que, cuando en los cultivos se inhibió a esta enzima, se redujo la concentración de S1P en el medio en presencia o no de FSH (46% y 70% respectivamente) y VEGF (47% y 61% respectivamente). Se conoce que la síntesis de S1P depende de la activación de SKs (SK1 y SK2, Takabe et al., 2008), sin embargo la participación de SK1, es más importante debido a que ésta se traslada del citoplasma a la membrana plasmática donde reside su sustrato Sph, originando

una producción localizada de S1P en la superficie de la célula (Jarman et al., 2010). Además esta enzima es estimulada por una gran variedad de moléculas, que median la activación de PKC (Johnson et al., 2002). La activación de SK1 depende de la acción de factores de crecimiento (Pitson et al., 2005) los cuales incluyen al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, Hobson et al., 2001), el factor de crecimiento epidermal (EGF, Sarkar et al., 2005), citocinas (TNF- α , Xia et al., 2002; Pettus et al., 2003), el factor de crecimiento de hepatocitos (Duan et al., 2004), hormonas esteroideas (E₂) (Sukocheva et al., 2006), ligandos GPCR (acetylcholine, van Koppen et al., 2001), ácido lisofosfatídico (Delon et al., 2004), así como la propia S1P (Meyer zu Heringdorf et al., 2001) y VEGF (Shu et al., 2002, Spiegel and Milstien, 2003;Taha et al., 2006; Alvarez et al., 2007, Takabe et al., 2008).

En diferentes tipos celulares (endoteliales y cancerígenas), la unión de VEGF a VEGFR2 induce la activación de PKC, lo cual provoca un incremento en la síntesis de S1P a través de la activación de la enzima SK1. Este incremento reduce los niveles de Sph y la inhibición de las proteínas activadoras de GTPasas y RasGAP (Shu et al., 2002; Spiegel y Milstien, 2003). Por otro lado, se conoce que la señalización de FSH es mediada principalmente por la activación de PKA y la subsecuente activación de las MAPK y de la vía PI3K/AKT en células de la granulosa para modular los procesos de sobrevivencia, proliferación y esteroidogénesis (Bernard et al., 2010). Con este trabajo se demuestra por primera vez que FSH está involucrado en la síntesis de S1P gracias a la activación de SK1, sin embargo para este caso no se tiene clara la ruta que puede seguir esta hormona para provocar este estímulo. En células de la granulosa de porcino en cultivo, a través de la subunidad G α q11, la FSH, también puede activar a la PKC generando

diferenciación, expansión del cumulus y maduración de estas células (Yamashita et al., 2014). Si esto ocurriera igual en las células de la granulosa de los bovinos es probable entonces que FSH, utilice la vía PKC para estimular la síntesis de S1P en estas células, de manera similar a la vía utilizada por VEGF.

En el presente trabajo, el uso de dosis altas de VEGF (0.1, 1 y 10 y 100 ng/mL), de FSH (10 ng/mL) o bien la combinación de altas dosis de VEGF y 1ng/mL de FSH al medio de cultivo no ocasionaron mejor respuesta en la concentración de S1P en las células de la granulosa en cultivo. Se sabe que en las células de la granulosa de bovino en un sistema libre de suero, el estímulo con dosis altas de FSH (1 ng/mL) afecta las concentraciones de E₂ y a dosis más altas de esta hormona se reduce la proliferación de estas células en folículos de 4-8 mm de diámetro (Gutiérrez et al., 1997). Además en células de la granulosa de bovino en cultivo bajo el estímulo de altas concentraciones de VEGF (10 y 100 ng/mL) disminuyó la respuesta proliferativa. Interesantemente en el mismo estudio el uso de VEGF solo (1 ng/mL) generó efectos proliferativos, aunque en combinación con 10 ng/mL de FSH no tuvo efecto sobre la expresión de enzimas esteroideogénicas (CYP11A1) e incluso exacerbó la proliferación de células de la granulosa de folículos de 4-8 mm de diámetro (Doyle et al., 2010). Existen evidencias claras que sugieren que en presencia de altas concentraciones de alguna molécula, se ven afectados los receptores (Hsueh y LaPolt, 1992). Como ejemplo podemos mencionar que bajas dosis de FSH incrementan los sitios de unión de esta hormona en paralelo al incremento en los niveles del ARNm de su receptor, mientras que altas dosis de FSH regulan a la baja los receptores (internalizándolos) así como los niveles de su ARNm, sugiriendo una supresión en la respuesta celular a concentraciones altas

del ligando (Simoni et al., 1997). Además, de estas evidencias, es importante mencionar que los niveles de S1P en la célula son regulados mediante su síntesis y degradación. Cuando los niveles de S1P son altos, ésta pueda ser desfosforilado por fosfatasas específicas las cuales la convierten a Shp y mediante una ceramidasa sintasa la transforman en Cer (Strub et al., 2010; Mendelson et al., 2014). Así mismo, la S1P puede ser eliminada por una S1P liasa generando un aldehído graso (hexadecenal) y a una fosfoetanolamina como un paso final durante la degradación de SPLs (Strub et al., 2010; Mendelson et al., 2014; Dai et al., 2014). Estas evidencias nos permiten comprender porqué el uso de altas concentraciones de FSH y VEGF así como su combinación redujeron la síntesis de S1P.

De manera interesante, los resultados de este trabajo mostraron que el uso de 0.1 μ M de S1P incrementó el número de células de la granulosa viables y la proporción de estas células en proliferación, esto pudo deberse a un incremento en la división celular o bien una reducción en la muerte celular. Dentro de las funciones más importantes de S1P destacan la regulación de la proliferación, crecimiento, sobrevivencia y migración celular en células endoteliales (Kimura et al., 2000), ovocitos (Guo et al., 2014), células satélites (Calise et al., 2012) y principalmente en células cancerígenas (Daum et al., 2009; Bartke y Hannum, 2009). Estudios in vivo, en ratones tratados con S1P previo a terapia de radiación, demostraron que rescató a los ovocitos de la apoptosis (Morita et al., 2000). Además la inyección de S1P (2 mM) dentro de la bursa ovárica, protegió a los folículos primordiales ante el estímulo de quimioterapia en ratas (Jurisicova et al., 2006; Kaya et al., 2008). Similarmente, en cultivo de células de la granulosa luteinizadas de humano se observó el efecto protector de S1P (1 y 10 mM) en presencia de peróxido de hidrógeno como inductor

de apoptosis (Nakahara et al., 2012). De manera general se conocen dos mecanismos mediante los cuales la S1P genera sus efectos sobre la célula (Takabe et al., 2008): 1) La unión de S1P con alguno de sus 5 receptores, activa las diferentes proteínas G de los receptores (Gi, Gq y G12/13) y la distribución de los receptores puede depender del tejido ya que los receptores S1PR1, S1PR2 y S1PR3 se localizan principalmente en miocitos, células endoteliales, leucocitos, fibroblastos y células de la granulosa de mujer (Nakahara et al., 2012) y los receptores S1PR4 y S1PR5 están limitados al sistema inmune y al sistema nervioso central respectivamente (Chun y Hartung 2010). En células endoteliales, S1PR1 y S1PR2 son conocidos por participar en el desarrollo vascular (Shoham et al., 2012; Mendelson et al., 2013), la estimulación de S1PR1 y/o S1PR3 frecuentemente modula la proliferación celular y migración en células cancerígenas, mientras que S1PR2 puede inhibir la proliferación celular y migración (Rosendfelt et al., 2001; Sukocheva et al., 2006). La señalización generada por la unión de S1P a receptores anclados a proteína Gi (S1PR1 y S1PR3), promueve la activación de pequeñas trifosfatasas de guanosina (GTPasa), Ras y ERK para promover la proliferación, además activa a PI3K/AKT y a la proteína cinasa B, para favorecer un incremento en la sobrevivencia inhibiendo la apoptosis (Brinkmann, 2007). 2) Otro de los mecanismos que usa la S1P es que al sintetizarse, actúa intracelularmente activando directamente la vía de señalización ERK e inhibiendo a las cinasas C-Jun N-terminal (JNK) para bloquear la apoptosis intrínseca (Maceyka et al., 2002), además de modular la poliubiquitinación de las proteínas cinasas RIP1 las cuales son una plataforma en la vía de NF- κ B y así regular la sobrevivencia celular (Pyne et al., 2016). Además, la activación de SK1 y la subsecuente síntesis de S1P genera

el desplazamiento de las RasGAPS (proteínas activadoras de Ras) de la Sph para incrementar los niveles de Ras-GTP llevando a la activación de la vía ERK/MAPK y así la división celular (Shu et al., 2002; Spiegel y Milstien, 2003). Basados en estas evidencias podemos sustentar que el aumento observado en el número de células en presencia de S1P puede ser consecuencia de un incremento en la división celular, una reducción de la muerte celular o bien, ambos. El efecto directo de S1P sobre la proliferación celular, pudimos comprobarlo cuando el uso de un inhibidor de la SK1 redujo la síntesis de S1P y el número de células de la granulosa, aun en presencia de FSH y VEGF.

La vía de señalización que sigue FSH al unirse a su receptor acoplado a proteína Gs en las células de la granulosa, es ampliamente conocida. La unión hormona receptor estimula a la adenilato ciclasa (AC) induciendo la síntesis de AMPc para activar a la PKA para: i) facilitar el transporte de colesterol a la mitocondria y favorecer la esteroidogénesis, activa la vía de PI3K/AKT generando efectos de proliferación y sobrevivencia, ii) activar factores de transcripción en el núcleo para la síntesis de ARNm de enzimas de la esteroidogénesis, receptores para FSH y proteínas antiapoptóticas y iii) catalizar la activación de la vía de las MAPK generando también diferenciación y proliferación celular (Fuller et al., 2002; Alam et al., 2004; Bernard et al., 2009). De acuerdo con los resultados de esta investigación, la distribución de las células de la granulosa en las distintas etapas del ciclo celular fue igual entre las células del grupo control y las que fueron tratadas con FSH (1 ng/mL) más 0.1 μ M de S1P, mientras que esta distribución fue distinta cuando las células se trataron por separado con S1P ó FSH (Figura 21). La similitud en la

proporción de células en las fases del ciclo celular cuando se estimularon con S1P ó con FSH, indica que S1P no es solo un paso intermedio en la señalización de FSH, sino que este esfingolípido ejerce sus efectos a través de sus propios receptores y que tiene impactos tan efectivos en la proliferación de las células de la granulosa como los conocidos para la FSH. Los resultados también dejan claro que las células de la granulosa necesitan de la FSH para producir S1P, pero luego este esfingolípido sigue su propia ruta de señalización.

No obstante, el estímulo con altas dosis de S1P (10 μ M) redujeron el número de células de la granulosa viables y su proliferación probablemente por una regulación a la baja de los receptores de S1P. Como ya se ha mencionado, uno de los mecanismos de acción de S1P es a través de la unión con sus receptores, de los cuales se sabe que están presentes en células de la granulosa (Becker et al., 2011). No obstante, estudios en linfocitos han demostrado que altos niveles de S1P provocaron la internalización del receptor S1PR1 y con esto una reducción de la proliferación y migración celular (Schwab et al., 2005; Pappu et al., 2007; Rivera et al., 2008). Además, se ha sugerido que altas concentraciones de S1P (>1 μ M), pueden ser convertidos por varias reacciones a Cer (Allende et al., 2013) y con ello promover la apoptosis y reducir la proliferación (Jin et al., 2003; Spiegel and Kolesnick, 2002; Van Broclyn and Williams, 2012). O bien, S1P ser eliminada de la célula por la acción de una S1P liasa (Dai et al., 2014). En células cancerígenas, la inhibición de la enzima S1P liasa causó incremento de la proliferación celular y disminuyó la apoptosis por parte de S1P (Oskouian et al 2006; Brizuela et al., 2012). Otras evidencias en células T de humano en cultivo, muestran que la adición de 10 μ M de S1P redujo su proliferación (Jin et al., 2003). En células mesangiales de rata,

el estímulo con 10 μM de S1P detectó una evidente de proporción de células en las fase S, G2/M, pese a esto, los efectos apoptóticos (células hipodiploides) permanecieron significativos (Gennero et al., 2002) caso muy similar al de nuestros resultados donde con el uso de 10 μM de S1P incrementó la proporción de células en fase G2/M pero también las hipodiploides. Es importante recordar, que otro de los mecanismos de acción de S1P, es actuar como señalizador intracelular independiente de su receptor para favorecer la proliferación celular a través de la vía ERK principalmente (Maceyka et al., 2002). Sin embargo una hiperestimulación por parte de S1P exógeno ocasiona una prolongada activación de la vía ERK generando arresto del ciclo celular y muerte contrario a sus efectos más conocidos (Shin et al., 2007). Dependiendo del tipo celular y estímulo, ERK puede generar diferentes eventos antriproliferativos como apoptosis intrínseca o extrínseca *in vitro* e *in vivo* por la inducción de liberación de citocromo mitocondrial y por activación de caspasas (Cagnol y Chambard, 2009). Estas teorías sustentan los resultados obtenidos en células de la granulosa de bovino en cultivo, donde el tratamiento con 0.1 μM de S1P o más incrementó la proporción de células en la fase (G2/M) pero algo interesante fue que altas dosis de S1P (10 μM) además incrementaron la proporción de células de la granulosa de bovino en apoptosis (células hipodiploides).

Finalmente, además de los mecanismos mencionados por los cuales S1P favorece la sobrevivencia y proliferación, se ha postulado principalmente en células endoteliales que S1P al unirse a su receptor activa a VEGFR2 por un mecanismo conocido como transactivación (Tanimoto et al., 2002; Spiegel y Milstien, 2003). La transactivación es mecanismo mediante el cual al activarse los receptores

acoplados a proteínas G se da la activación de receptores tirosina cinasa en ausencia de su propio ligando. Este mecanismo depende de señales intracelulares en las que participan las subunidades de la proteína G, complejos de proteínas, y fenómenos de fosforilación (Sánchez y Arias, 2004). La unión de S1P con su receptor 1 (S1PR1) acoplado a proteína G activa a la G_i/o llevando a la activación de las proteínas Src lo cual resulta en la fosforilación y transactivación de VEGFR2 (Spiegel y Milstien, 2003). Esto lleva a la activación de diversas vías de señalización dentro de las cuales destaca la activación de proteínas Src, de las proteínas adaptadoras Crkl, de PI3K, de PKB/AKT y la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) necesaria para la síntesis de óxido nítrico. Estas vías son importantes para el movimiento celular y la remodelación vascular. Por otro lado, la activación de la vía PKB/AKT favorece la proliferación celular y la activación de PLC incrementa los niveles de calcio intracelular (Tanimoto et al., 2002; Spiegel y Milstien, 2003; Sánchez y Arias, 2004). En células ML-1 de carcinoma de tiroides se demostró una fosforilación del VEGFR2 por parte de S1P lo que favoreció la proliferación y migración de estas células (Balthasar et al., 2008). En células madre embrionarias de ratón en cultivo, la transactivación del VEGFR2 mediada por S1P (0.1-10 μ M) a través de la unión con sus receptores 1/3 es necesaria para la activación de la vía β -arrestinas/Src y el incremento de la proliferación celular (Ryu et al., 2014). En el presente trabajo, cuando en los cultivos usamos un inhibidor del VEGFR2 así como un inhibidor de las proteínas Src en presencia de S1P, se redujo la proliferación de las células de la granulosa, lo cual sugiere que los efectos de S1P en este tipo de células, pueden estar mediados por la transactivación de VEGFR2.

11. Conclusiones

Los resultados del presente trabajo muestran por primera vez que:

- VEGF y FSH incrementan la síntesis de S1P en cultivo de células de la granulosa de bovino a través de incrementar la concentración de la enzima SK1 fosforilada.
- La síntesis de S1P inducida por VEGF y FSH incrementa el número de células de la granulosa viables y la proporción de células en proliferación.
- Altas dosis de S1P (10 μ M) aumentan la proporción de células de la granulosa de bovino hipodiploides.
- Los efectos de S1P sobre la proliferación de células de la granulosa de bovino en cultivo, son mediados probablemente por la transactivación de VEGFR2.

En síntesis, este trabajo atribuye una función importante a S1P en la proliferación y sobrevivencia de las células de la granulosa de bovinos, también destaca que su síntesis es promovida por FSH y VEGF y que suma sus efectos a las de estas hormonas para provocar el desarrollo folicular y mantener la integridad de dichas células (Figura 23).

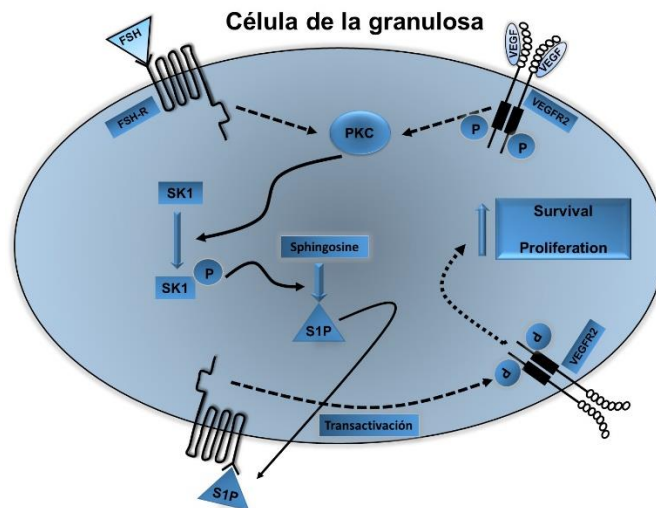


Figura 23. La Hormona foliculoestimulante (FSH) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como moduladores de la producción de esfingosina 1-fosfato (S1P) y efecto de este esfingolípido sobre la proliferación y supervivencia de células de la granulosa. Receptor de FSH (FSH-R), receptor 2 de VEGF (VEGFR2), proteína cinasa C (PKC), esfingosina cinasa 1 (SK1).

12. Bibliografía

1. Ader I., Malavaud B., Cuvillier O. 2009. When the sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate pathway meets hypoxia signaling: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 69(9):3723-6.
2. Aerts JMJ., Bols PEJ. 2010. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis of the bovine species. Part II: antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod DomAnim. Bélgica.* 45:180-187.

3. Alam PJ., Maizels ET., Park Y., Ghaey S., Feigers ZJ., Chandel NS., Hunzicker DM. 2004. Follicle-stimulating Hormone Activation of Hypoxia-inducible Factor-1 by the Phosphatidylinositol 3 Kinase/AKT/Ras Homolog Enriched in Brain (Rheb)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway Is Necessary for Induction of Select Protein Markers of Follicular Differentiation. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY USA. 279 (19): 19431–19440.
4. Alewijnse AE., Peters SLM. 2008. Sphingolipid signalling in the cardiovascular system: good, bad or both?. European Journal of Pharmacology, ELSEVIER. Amsterdam. 585:292-302.
5. Allende ML., Sipe LM., Tuymetova G., Wilson-Henjum KL., Chen W., Proia RL. 2013. Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 regulates keratinocyte differentiation and epidermal homeostasis. J Biol Chem. 288(25):18381-91.
6. Alvarez SE., Milstien S., Spiegel S. 2007. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. Trends Endocrinol Metab. 18:300–307.
7. Argraves, K.M., Wilkerson, B.A., Argraves, W.S., 2010. Sphingosine-1-phosphate signaling in vasculogenesis and angiogenesis. World J. Biol. Chem. 10, 291–297.
8. Balthasar S., Bergelin N., Löffler C., Vainio M., Andersson S., Tornquist K. 2008. Interactions between sphingosine-1-phosphate and vascular endothelial growth factor signalling in ML-1 follicular thyroid carcinoma cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 296: E1392–E1399.
9. Bartke N., Hannun YA. 2009. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. Journal of Lipid Research. USA. 50: 91-96.
10. Beato M., Klug J. 2000. Steroid hormone receptors: an update. Human reproduction. Alemania. 6(3): 225-236.
11. Becker S., von Otte S., Robenek H., Diedrich K., Nofer JR. 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 RAC1. Biol Reprod. 84(3):604-12.
12. Bernard DJ., Forton J., Wang Y., Lamba PMD. 2010. Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. Fertil Steril. Canadá. 93:2465–85.
 13. Bode C., Sensken SC., Peest U., Beutel G., Thol F., Levkau B., Li Z., Bittman R., Huang T., Tölle M., van der Giet M., Gräler MH. 2010. Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. J Cell Biochem. 109(6):1232-43.
 14. Bottino MC., Lanari C. 2010. Localización extranuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. Medicina. Buenos Aires. 70:173-184.
 15. Breslow DK., Weissman JS. 2010. Membranes in Balance: Mechanisms of Sphingolipid Homeostasis. Molecular cell. USA. 40:267-279.
 16. Brinkmann V. 2007. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. Pharmacol Ther. 115(1):84-105.
 17. Brizuela L., Ader I., Mazerolles C., Bocquet M., Malavaud B., Cu villier O. 2012. First evidence of sphingosine 1-phosphate lyase protein expression and activity downregulation in human neoplasm: implication for resistance to therapeutics in prostate cancer. Mol Cancer Ther. 11(9):1841-51.
 18. Brunkhorst R., Vutukuri R., Pfeilschifter W. 2014. Fingolimod for the treatment of neurological diseases—state of play and future perspectives Front Cell Neurosci. 8: 283.
 19. Byrne AM., Bouchier-Hayes DJ., Harmey JH. 2005. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). J Cell Mol Med. 9(4):777-94.

20. Cagnol S., Chambard JC. 2010. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* 277(1):2-21.
21. Cai L., Sun A., Li H., Tsinkgou A., Jianning Yu, Shijia Ying, Zhe Chen, and Zhendan Shi. 2015. Molecular mechanisms of enhancing porcine granulosa cell proliferation and function by treatment in vitro with anti-inhibin alpha subunit antibody. *Reprod Biol Endocrinol.* 13: 26
22. Calise S., Blescia S., Cencetti F., Bernacchioni C., Donati C., Bruni P. 2012. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of satellite cells: role of S1P receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 439–450
10.1016/j.bbamcr.2011.11.016.
23. Campbell BK., Scaramuzzi RJ., Webb R. 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Ferti.* 49(Suppl):335-350.
24. Cheng Y., Feng Y., Jansson L., Sato Y., Deguchi M., Kawamura K., Hsueh AJ. 2015. Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. *FASEB J.* 29(6):2423-30.
25. Christenson LK., Stouffer RL. 1997. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(7):2135-42.
26. Chun J., Hartung HP. 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* 33(2):91-101.
27. Clark LJ., Rodgers IHF., Dharmarajan AM., Rodgers JL. 2004. Theca interna: the other side of bovine follicular atresia. *Biol Reprod. Australia.* 71(4):1071-8
28. Craig ZR., Wang W., Flaws JA. 2011. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction.* 142(5):633-46.

29. Cross MJ., Dixelius J., Matsumoto T., Claesson-Welsh L. 2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 28(9):488-94.
30. Dai L., Xia P., Di W. 2014. Sphingosine 1-phosphate: a potential molecular target for ovarian cancer therapy?. *Cancer Invest.* 32(3):71-80.
31. Daum G., Grabski A., Reidy, M.A., 2009. Sphingosine 1-Phosphate: A regulator of arterial lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29,1439-1443.
32. DeMayo FJ., Zhao B., Takamoto N., Tsai SY. 2002. Mechanisms of action of estrogen and progesterone. *Ann N Y Acad Sci.* 86-8, 396-406.
33. Doyle LK., Walker CA., Donadeu FX. 2010. VEGF modulates the effects of gonadotropins in granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol.* 3, 127-37.
34. Driancourt MA. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology.* 55: 1211-1239.
35. Duan HF., Wu CT., Lu Y., Wang H., Liu HJ., Zhang QW., Jia XX., Lu ZZ., Wang LS. 2004. Sphingosine kinase activation regulates hepatocyte growth factor induced migration of endothelial cells. *Exp Cell Res.* 298:593–601.
36. Durán-Pastén ML., Fiordeliso T. 2013. GnRH-Induced Ca²⁺ Signaling Patterns and Gonadotropin Secretion in Pituitary Gonadotrophs. Functional Adaptations to Both Ordinary and Extraordinary Physiological Demands. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4: 127.
37. Eliyahu E., Shtraizent N., Shalgi R., Schuchman EH. (2012). Construction of conditional acid ceramidase knockout mice and in vivo effects on oocyte development and fertility. *Cell Physiol Biochem. USA.* 30(3):735-48.
38. Endo A., Nagashima K-I., Kurose H., Mochizuki S., Matsuda M., Mochizuki N. 2002. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J Biol Chem.* 277:23747–23754.

39. Evans ACO., Ireland JLH., Winn ME., Lonergan P., Smith GW., Coussens PM., Ireland JJ. (2004). Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biology of Reproduction*. Irlanda. 70: 1475–1484.
40. Ferreira L., Sánchez-Juanes F., Muñoz-Bellido JL., González-Buitrago JM. 2010. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect*. 17(7):1007-12.
41. Fieber CB., Eldridge J., Taha TA., Obeid LM., MuiseHelmericks RC. 2006. Modulation of total Akt kinase by increased expression of a single isoform: requirement of the sphingosine-1-phosphate receptor, Edg3/S1P3, for the VEGF-dependent expression of Akt3 in primary endothelial cells. *Experimental Cell Research*. 312 1164–1173.
42. Flores PFI., Rosas VC., Romano PMC., Pérez MM. 2005. Apoptosis y atresia folicular: un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Veterinaria México*. México. 36(001):87-103.
43. Fogui A., Ravandi A., Teerds KJ., Kuksis A., Dorrington J. 1998. Fas-induced apoptosis in rat thecal/interstitial Cells signals Through sphingomyelin-ceramide pathway. *Endocrinology*. 139(4):2041-2047.
44. François CM., Wargnier R., Petit F., Goulvent T., Rimokh R., Treilleux I., Ray-Coquard I., Zazzu V., Cohen-Tannoudji J., Guigon CJ. 2015. 17 β -estradiol inhibits spreading of metastatic cells from granulosa cell tumors through a non-genomic mechanism involving GPER1. *Carcinogenesis*. 36(5):564-73.
45. Fraser HM., Dickson SE., Lunn SF., Wulff C., Morris KD., Carroll VA., Bicknell R. 2000. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology*. 141(3):995-1000.

46. Friberg A. 2009. Granulosa cell apoptosis. Transcriptional regulation by the nuclear progesterone receptor. (Tesis de doctorado- Gothenburg, Sweden). [En línea].
47. Fuller PJ., Chu S., Fikret S., Burger HG. 2002. Molecular pathogenesis of granulosa cell tumours. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 191: 89-96.
48. Gennero I., Fauvel J., Nieto M., Cariven C., Gaits F., Briand-Mésange F., Chap H., Salles JP. 2002. Apoptotic effect of sphingosine 1-phosphate and increased sphingosine 1-phosphate hydrolysis on mesangial cells cultured at low cell density. *J Biol Chem*. 277(15):12724-34.
49. Ginther OJ., Beg MA., Bergfelt DR., Donadeu FX., Kot K. 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod*. 65:638-647.
50. Glister C., Tannetta DS., Groome NP., Knight PG. 2001. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 65:1020-1028.
51. Gonzalez-Cabrera PJ., Jo E., Sanna MG., Brown S., Leaf N., Marsolais D., Schaeffer MT., Chapman J., Cameron M., Guerrero M., Roberts E., Rosen H. 2008. Full pharmacological efficacy of a novel S1P1 agonist that does not require S1P-like headgroup interactions. *Mol Pharmacol*. 74(5):1308-18.
52. Gonzalez-Robayna IJ., Falender AE., Ochsner S., Firestone GL., Richards JS. 2000. Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol*. 14(8):1283-300.
53. Goodemote KA., Mattie ME., Berger A., Spiegel S. 1995. Involvement of a pertussis toxin sensitive G protein in the mitogenic signaling pathways of sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem.*; 270:10272–10277.

54. Grandoch M., Roscioni SS., Schmidt M. 2010. The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. *Br. J. Pharmacol.*, 159, 265–284.
55. Greenaway J., Connor K., Pedersen HG., Coomber BL., LaMarre J., Petrik J. 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*. 145(6):2896-2905.
56. Greenaway J., Gentry PA., Feige JJ., LaMarre J., Petrik JJ. 2005. Thrombospondin and vascular endothelial growth factor are cyclically expressed in an inverse pattern during bovine ovarian follicle development. *Biol Reprod*. 72(5):1071-8
57. Guo L., Ou X., Li H., Han Z. 2014. Roles of sphingosine-1-phosphate in reproduction. *Reprod Sci*. 21(5):550-4.
58. Gutiérrez CG., Campbell BK., 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. *Biol. Reprod*. 3, 608–616.
59. Hait NC., Bellamy A., Milstien S., Kordula T., Spiegel S. 2007. Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*. 282:12058–12065.
60. Hait NC., Sarkar S., Le Stunff H., Mikami A., Maceyka M., Milstien S., Spiegel S. 2005. Role of sphingosine kinase 2 in cell migration towards epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 280:29462–29469.
61. Heo K., Park KA., Kim YH., Kim SH., Oh YS., Kim IH., Ryu SH., Suh PG. 2009. Sphingosine 1-phosphate induces vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *BMB Rep*. 42(10):685-90.
62. Hernández-Coronado CG., Guzmán A., Espinosa-Cervantes R., Romano MC., Verde-Calvo JR., Rosales-Torres AM. 2015. Sphingosine-1-phosphate and

- ceramide are associated with health and atresia of bovine ovarian antral follicles. *Animal* 9, 308–312.
63. Hobson JP., Rosenfeldt HM., Barak LS., Olivera A., Poulton S., Caron MG., Milstien S., Spiegel S. 2001. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*. 291(5509):1800-3.
64. Hsu SY and Hsueh AJ (2000) Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm *Physiological Reviews* 80 593–614.
65. Hsueh AJW., LaPolc PS 1992 Molecular basis of gonadotropin receptor regulation. *Trends Endocrinol Metab* 3:164–170.
66. Hughes SK., Wacker BK., Kaneda MM., Elbert DL. 2005. Fluid shear stress modulates cell migration induced by sphingosine 1-phosphate and vascular endothelial growth factor. *Annals of Biomedical Engineering*. 33: 1003–1014.
67. Hunzicker-Dunn M., Maizels ET. 2006. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal*. 18(9):1351-9.
68. Igarashi J., Erwin PA., Dantas AP., Chen H., Michel T. 2003. VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 100(19):10664-9.
69. Jaillard C., Harrison S., Stankoff B., Aigrot MS., Calver AR., Duddy G., Walsh FS., Pangalos MN., Arimura N., Kaibuchi K., Zalc B., Lubetzki C. 2005. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci*. 25(6):1459-69.
70. Jarman KE., Moretti PA., Zebol JR., Pitson SM. 2010. Translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane is mediated by calcium- and integrin-binding protein 1. *J Biol Chem.*; 285:483–492.

71. Jiang JY., Cheung CJ., Wang Y., Tsang BK. 2003. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci. Canada*. 1(8): 222-37.
72. Jin Y., Knudsen E., Wang L., Bryceson Y., Damaj B., Gessani S., Maghazachi AA. 2003. Sphingosine 1-phosphate is a novel inhibitor of T-cell proliferation. *Blood*. 101, 4909–4915.
73. Johnson KR., Becker KP., Facchinetti MM., Hannun YA., Obeid LM. 2002. PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane: extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) *J Biol Chem*. 277:35257–35262.
74. Jurisicova A., Lee HJ., D'Estaing SG., Tilly JL., Perez GI. 2006. Molecular requirements for doxorubicin-mediated death in murine oocytes. *Cell Death Differ*. 13,1466–74.
75. Kaczmarek MM., Schams D., Ziecik AJ. 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Reprod Biol. Alemania*. 5:111-136.
76. Kanitz W. 2003. Follicular dynamic and ovulation in cattle – a review. *Arch. Tierz., Dummerstorf. Alemania*. 46 (2): 187-198.
77. Kaya H., Desdicioglu R., Sezik M., Ulukaya E., Ozkaya O., Yilmaztepe A. 2008. Does sphingosine-1-phosphate have a protective effect on cyclophosphamide-and irradiation-induced ovarian damage in the rat model? *Fertil Steril*. 89, 732–5.
78. Kester M., Kolesnick R., 2003. Sphingolipids as therapeutics. *Pharmacol Res*. 47, 365-71.
79. Kim JM., Yoon YD., Tsang BK. 1999. Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology*. 140(5):2307-17.

80. Kimbrel EA., McDonnell DP. 2003. Function and mode of action of nuclear receptors: estrogen, progesterone, and vitamin D. *Pure and Applied Chemistry*. 75:1671–1683.
81. Kimura T., Watanabe T., Sato K., Kon J., Tomura H., Tamama K., Kuwabara A., Kanda T., Kobayashi I., Ohta H., Ui M., Okajima F. 2000. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J*. 348 Pt 1:71-6.
82. Kliche S., Waltenberger J. 2001. VEGF receptor signaling and endothelial function. *IUBMB Life*. 52(1-2):61-6.
83. Kosaka N., Sudo N., Miyamoto A., Shimizu T. 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(3), 733-737.
84. Kwintkiewicz J., Giudice LC. 2009. The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. *Semin Reprod*. 27(1):43-51.
85. Lamote I., Meyer E., Massart-Leen AM., Burvenich C. 2004. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids*. 69:145-159.
86. Lee MJ., Van Brocklyn JR., Thangada S., Liu CH., Hand AR., Menzeleev R., Spiegel S Hla T. 1998. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science*. 279:1552–1555.
87. LeRoith D., Yakar S. 2007. Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 3(3):302-10.
88. Levin ER. 2009. Plasma Membrane Estrogen Receptors. Published online. 10.1016/j.tem.2009.06.009

89. Lin JX., Jia YD., Zhang CQ. 2011. Effect of epidermal growth factor on follicle-stimulating hormone-induced proliferation of granulosa cells from chicken prehierarchical follicles. *J Zhejiang Univ Sci B*. 12(11):875-83.
90. Lucy MC. 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci*. 85(E. Suppl.):E89–E99.
91. Maceyka M., Payne SG., Milstien S., Spiegel S., 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 193–201.
92. Maceyka M., Sankala H., Hait NC., Le Stunff H., Liu H, Toman R., Collier C., Zhang M., Satin LS, Merrill AH Jr., Milstien S., Spiegel S. 2005. Sphk1 and Sphk2.. Sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem*. 280(44):37118-29.
93. Maceyka M., Spiegel S. 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*. 510(7503):58-67.
94. Mani AM., Fenwick MA., Cheng Z., Sharma MK., Singh D., Wathes DC. 2010. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction* 139, 139–151.
95. Masuko K., Murata M., Beppu M., Nakamura H., Kato T., Yudoh K. 2012. Sphingosine-1-phosphate modulates expression of vascular endothelial growth factor in human articular chondrocytes: a possible new role in arthritis. *Int J Rheum Dis*. 15(4):366-73.
96. Mendelson K., Evans T., Hla T., 2014. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* 141, 5–9.
97. Mendelson K., Evans, T., Hla T. 2014. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* 141, 5-9.

98. Merrill AH., Sandhoff K. 2002. Sphingolipids: metabolism and cell signaling. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Alemania. 4:1-35.
99. Merrill AH., Wang E., Mullins RE., Jamison WCL., Nimkar S., Liotta DC. (1988). Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatograph. Analytical Biochemistry. 171(2): 373–381.
100. Meyer zu Heringdorf D., Lass H., Kuchar I., Lipinski M., Alemany R, Rumenapp U., Jakobs KH. 2001. Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. Eur J Pharmacol. 414:145–154.
101. Mihm M., Evans AC. 2008. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. Reprod Domest Anim. 2:48-56.
102. Mihn M., Baker PJ., Fleming LM., Montero AM., Shaughnessy PJO., (2008). Diferentiation of the bovine dominant follicle from the cohort upregulates mRNA expression for new tissue development genes. Reproduction Research. UK. 135:253–265.
103. Milhas D., Clarke CL., Hannun YA. 2010. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: Implications for bioactive sphingolipids. ELSEVIER. USA. 584:1887-1893.
104. Mizugishi K., Yamashita T., Olivera A., Miller GF., Spiegel S., Proia RL. 2005. Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. Mol Cell Biol. 25(24):11113-21.
105. Monga R., Sharma I., Datta TK., Singh D. 2011. Characterization of serum-free buffalo granulosa cell culture and analysis of genes involved in terminal differentiation from FSH- to LH-responsive phenotype. Domest Anim Endocrinol. 41(4):195-206.

106. Monget P., Fabre S., Mulsant P., Lecerf F., Elsen JM., Mazerbourg S., Pisselet C., Monniaux D. 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 23(1-2):139-54.
107. Moore K., Thatcher W. 2006. Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science.* 89: 1254-1266.
108. Morita Y., Pérez GI., Paris F., Miranda S.R., Ehleiter D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Xie, Z., Reed, J.C., Schuchman, E.H., Kolesnick, R.N., Tilly, J.L., 2000. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med.* 6, 1109-1114.
109. Motta DPA., Ramos CN., González SCM., Castro RCE. 2011. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *vet.zootec.* 5(2): 88-99, 2011.
110. Nagahashi M., Takabe K., Krista P., Terracina., Soma D., Hirose Y., Kobayashi T., Matsuda Y., Wakai T. 2014. Sphingosine-1-Phosphate Transporters as Targets for Cancer Therapy. *Biomed Res Int.*; 2014: 651727.
111. 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. *Fertil Steril.* 98, 1001-8.
112. Navarrete SCL., Ibañez GC. 2008. Rol de la Apoptosis en la Fisiopatología del Lupus Eritematoso Sistémico. *Revista Chilena de Reumatología.* Chile. 24(1):30-38.
113. Nóbrega JE., Rossetto R., Matos MHT., Chaves RN., Magalhães DM., Lima-Verde IB., Bão SN., Campello CC., Figueiredo JR., Gonçalves PBD. Oliveira JFC . 2014. Sphingosine 1-phosphate promotes activation of caprine preantral follicle in vitro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66(4):977-985.

114. Ortega Serrano PV., Guzmán A., Hernández-Coronado CG., Castillo-Juárez H., Rosales-Torres AM. 2016. Reduction in the mRNA expression of sVEGFR1 and sVEGFR2 is associated with the selection of dominant follicle in cows. *Reprod Domest Anim.* doi: 10.1111/rda.12777.
115. Oskouian B., Sooriyakumaran P., Borowsky AD., Crans A., Dillard-Telm L., Tam YY., Bandhuvula P., Saba JD.
116. Palermo R. 2007. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reprod Biomed Online.* 15(3):326-37.
117. Pappu R., Schwab SR., Cornelissen I., Pereira JP., Regard JB., Xu Y., Camerer E., Zheng YW., Huang Y., Cyster JG., Coughlin SR. 2007. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science.* 316:295–298.
118. Pavlik R., Wypior G., Hecht S., Papadopoulos P., Kupka M., Thaler C., Wiest I., Pestka A., Friese K., Jeschke U. 2011. Induction of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) and nuclear steroid hormone receptors by gonadotropins in human granulosa cells. *Histochem Cell Biol.* 136(3):289-99.
119. Pettus BJ., Bielawski J., Porcelli AM., Reames DL., Johnson KR., Morrow J., Chalfant CE., Obeid LM., Hannun YA. 2003. The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. *FASEB J.* 17(11):1411-21.
120. Pitson SM., Xia P., Leclercq TM., Moretti PA., Zebol JR., Lynn HE., Wattenberg BW., Vadas MA. 2005. Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med.* 201:49–54.
121. Prieto GB., Velasquez PM. 2002. Fisiología de la reproducción. Hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev Fac Med. UNAM. México.* 45(8): 253-257.

122. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 14;103(46):17384-9. Epub 2006 Nov 7.
123. Ptaszynska M. 2008. Compendium de reproducción animal. Octava edición. Internet internacional.
124. Pyne S., Adams DR., Pyne NJ. 2016. Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinases in health and disease: Recent advances. Prog Lipid Res. 62:93-106.
125. Rangel., PL., Rodríguez A., Rojas S., Sharp PJ., Gutierrez CG., 2009. Testosterone stimulates progesterone production and steroidogenic acute regulatory protein (StAR), P450 cholesterol side-chain cleavage (P450scc) and luteinizing hormone receptor (LH-R) mRNAs expression in hen (*Gallus domesticus*) granulosa cells. Reproduction 138, 961–969.
126. Ravindranath N., Sheela Rani CS., Martin F., Moudgal NR. 1989. Effect of FSH deprivation at specific times on follicular maturation in the bonnet monkey (*Macaca radiata*). J Reprod Fertil. 87(1):231-41.
127. Rivera J., Proia RL., Olivera A. 2008. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. Nat Rev Immunol. 8(10):753-63.
128. Roche JF., Boland MP. 1991. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. Theriogenology, 35:81-90.
129. Rodgers RJ., Rodgers HFI. 2010. Morphological classification of bovine ovarian follicles. Reproduction Review. Australia. 139:309-318.
130. Rosales TAM., Alonso I., Vergara M., Romano MC., Castillo JH., Avalos A., Rosado A., Gutiérrez GS. 2010. Vascular endotelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. Animal Reproduction Science. 122(1-2):111-117.
131. Rosales TAM., Ávalos RA., Vergara OM., Hernández PO., Ballesteros CM., García MR., Ortiz NV., Rosado A. (2000). Multiparametric study of atresia in ewe

- antral follicles: histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod Dev. México.* 55:270-81.
132. Rosales TAM., Guzmán SA., Gutiérrez AC. 2001. Desarrollo folicular en rumiantes domésticos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems. México.* 1:147-160.
133. Rosales-Torres A M., Guzmán-Sánchez A. 2011. Follicular development in domestic ruminants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(S1).
134. Rosell PR. 2004. Regulación neuroendócrina del ciclo estral en los animales domésticos. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Cuba.* 5(7):1.25.
135. Rosen H., Goetzl EJ. (2005). Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat. Rev. Immunol. USA.* 5:560-570.
136. Rosenfeldt HM., Hobson JP., Milstien S., Spiegel S. 2001. The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 6):836-9.
137. Rosenfeldt HM., Hobson JP., Milstien S., Spiegel S. 2001. The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 6):836-9.
138. Roth Z., Hansen, P.J., 2004. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biol Reprod.* 71, 2072-8.
139. Ryu JM., Baek YB., Shin MS., Park JH., Park SH., Lee JH., Han HJ. 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 Res.* 12(1):69-85.

140. Salmazadeh A., Elvington ES., Roberts PC., Schmelz EM., Davalos RV. 2013. Sphingolipid metabolites modulate dielectric characteristics of cells in a mouse ovarian cancer progression model. *Integr Biol (Camb)*. 5(6):843-852.
141. Salvetti NR., Acosta JC., Gimeno EJ., Müller LA., Mazzini RA., Taboada AF., Ortega HH. 2007. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Vet Pathol*. 44(3):373-8.
142. Sánchez AM, Díaz LI. 2006. Papel de los esfingolípidos en la senalización celular. *Dianas. España*. 1(1): 1-10.
143. Sánchez LE., Arias MJA. 2004. Transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's) por receptores acoplados a proteína G. *Rev Biomed*. 15:33-48.
144. Sankala HM, Hait NC, Paugh SW, et al. Involvement of sphingosine kinase 2 in p53-independent induction of p21 by the chemotherapeutic drug doxorubicin. *Cancer Res*. 2007;67:10466–10474.
145. Sarkar S., Maceyka M., Hait NC., Paugh SW., Sankala H., Milstien S., Spiegel S. 2005. Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett*. 579(24):5313-7.
146. Schwab SR., Pereira JP., Matloubian M., Xu Y., Huang Y., Cyster JG. 2005. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*. 309:1735–1739.
147. Sensken SC., Bode C., Nagarajan M., Peest U., Pabst O., Gräler MH. 2010. Redistribution of sphingosine 1-phosphate by sphingosine kinase 2 contributes to lymphopenia. *J. Immunol*. 184, 4133–4142.
148. Shibuya M. 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis. A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies *Genes Cancer*. 2(12): 1097–1105.

149. Shimada M., Yamashita Y. 2011. The Key Signaling Cascades in Granulosa Cells during Follicular Development and Ovulation Process. *Journal of Mammalian Ova Research*. 28(1): 25-31
150. Shimizu T., Jayawardana BC., Tetsuk M., Miyamoto A. 2007. Differential effect of follicle-stimulating hormone and estradiol on expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120, VEGF 164 and their receptors in bovine granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*. Japan. 53(1):105-112.
151. Shin JH., Choi GS., Kang WH., Myung KB., 2007. Sphingosine 1-phosphate triggers apoptotic signal for B16 melanoma cells via ERK and caspase activation. *J. Korean Med. Sci.* 22, 298–304.
152. Shoham B., Malkinson A., Krief G., Shwartz S., Ely Y., Ferrara Y., Yaniv, K., Zelzer E. 2012. S1P1 inhibits sprouting angiogenesis during vascular development. *Development* 139, 3859-3869.
153. Shoham Z., Jacobs HS. Insler V. 1993. Luteinizing hormone: its role, mechanism of action, and detrimental effects when hypersecreted during the follicular phase. *Fertil Steril*. Israel. 59(6):1153-61.
154. Shu X., Wu W., Mosteller RD., Broek D. 2002. Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogenactivated protein kinases. *Mol Cell Biol*. 22, 7758-68.
155. Simoni M., Gromoll J., Nieschlag E., 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr. Rev.* 18, 739–773.
156. Sirard MA. 2016. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: The effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. *Theriogenology*. 86(1):54-61.

157. Skoura A., Hla T. 2009. Regulation of vascular physiology and pathology by the S1P2 receptor subtype. *Cardiovasc Res.* 82(2):221-8.
158. Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer.
159. Spicer LJ. 2004. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol Reprod.* 70:1223-1230.
160. Spiegel S., Milstien S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol. USA.* 4:397–407.
161. Spiegel, S., Kolesnick, R., 2002. Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia* 16, 1596-602.
162. Sterin SN., Leocata NF. 2007. Los esfingolipidos en la muerte y proliferación celular. *Química viva. Argentina.* 3(6):112-138.
163. Strub GM., Maceyka M., Hait NC., Milstien S., Spiegel S. 2010. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol.* 688:141-55.
164. Stuttfeld E., Ballmer-Hofer K. 2009. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life.* 61(9):915-22.
165. Sukocheva O., Wadham C., Holmes A., Albanese N., Verrier E., Feng F., Bernal A., Derian CK., Ullrich A., Vadas MA., Xia P. 2006. Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J. Cell. Biol.* 173, 301-310.
166. Sun HY., Wei SP., Xu RC., Xu PX., Zhang WC. 2010. Sphingosine-1-phosphate induces human endothelial VEGF and MMP-2 production via transcription

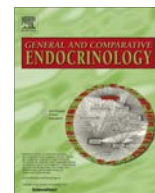
- factor ZNF580: novel insights into angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 395(3):361-6.
167. Sunderland SJ., Crowe MA., Boland MP., Roche JF., Ireland JJ. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil.* 101(3):547-55.
168. Taha TA., Hannun YA., Obeid LM. 2006. Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *J Biochem Mol Biol.* 39:113–131.
169. Takabe K., Paugh SW., Milstien S., Spiegel S. 2008. “Inside-out” signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* 60, 181–195.
170. Takahashi H., Shibuya M. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 109(3):227-41.
171. Takuwa N., Du W., Kaneko E., Okamoto Y., Yoshioka K., Takuwa Y. 2011. Tumor-suppressive sphingosine-1-phosphate receptor-2 counteracting tumor-promoting sphingosine-1-phosphate receptor-1 and sphingosine kinase 1 - Jekyll Hidden behind Hyde. *Am J Cancer Res.* 1(4):460-81.
172. Tamashiro PM., Furuya H., Shimizu Y., Iino K., Kawamori T. 2013. The impact of Sphingosine kinase-1 in head and neck cancer. *Biomolecules* 3: 481-513.
173. Tanimoto T., Jin ZG., Berk BC. 2002. Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J Biol Chem.* 277(45):42997-3001.
174. Tanos T, Rojo L, Echeverria P, Briskin C. 2012. ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Res.* 14(4):210.

175. Tavira MCA., Ortega GA., Dávila GI., Estrada MS., Meneses AA. 2009. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de ciencias Farmacéuticas*. 40(4):35-46.
176. Trojan J., Cloix JF., Ardourel MY., Chatel M., Anthony DD. 2007. Insulin-like growth factor type I biology and targeting in malignant gliomas. *Neuroscience*. 145(3):795-811.
177. Tsutsumi R., Webster NJG. 2009. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocrine Journal*. USA. 56(6): 729-737.
178. Ulloa-Aguirre A., Timossi C. 1998. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update*. 4(3):260-83.
179. Valdez KE., Cuneo SP., Gorden PJ., Turzillo AM. 2005. The role of thecal androgen production in the regulation of estradiol biosynthesis by dominant bovine follicles during the first follicular wave. *J Anim Sci*. 83(3):597-603.
180. Van Brocklyn JR., Williams JB. 2012. The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comparative Biochemistry and Physiology* 163, 26-36.
181. van Koppen CJ., Meyer zu., Heringdorf D., Alemany R., Jakobs KH. 2001. Sphingosine kinase-mediated calcium signaling by muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci*;68:2535–2540.
182. Vázquez CJF., Olivera AM. 2010. Señalización celular en el folículo antral bovino. *Orinoquia*. Redalyc. Colombia. 14(2): 178-187.
183. Venkataraman K., Lee YM., Michaud J., Thangada S., Ai Y., Bonkovsky HL., Parikh NS., Habrukowich C., Hla T. (2008). Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1 phosphate. *Circ Res*. Corea. 102(6): 669–676.

184. Villa NY., Kupchak BR., Garitaonandia, I., Smith JL., Alonso E., Alford C., Cowart LA., Hannun YA., Lyons TJ. 2009. Sphingolipids function as downstream effectors of a fungal PAQR. *Mol. Pharmacol.* 75, 866–875.
185. Von Otte S., Paletta JR., Becker S., Konig S., Fobker M., Greb RR., Kiesel L., Assman G., Diedrich K., Nofer JR. 2006. *J Biol Chem. Alemania.* 281(9): 5398-5405.
186. Walker WH, Cheng J. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction.* 130(1):15-28.
187. Wang L., Adegboyega PA. 2002. Down-regulation of Fas expression in the lymph nodes of patients infected with human immunodeficiency virus. *Arch Pathol Lab Med.* 126(1):28-32.
188. Wayne CM., Fan HY., Cheng X., Richards JS. 2007. Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol. Endocrinol.* 21, 1940–1957.
189. Webb R., Armstrong DG. 1998. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock production science.* 53: 95-112.
190. Wulff C., Wilson H., Wiegand SJ., Rudge JS., Fraser HM. 2002. Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology.* 143:2797-2807.
191. Xia P., Wadham C. 2011. Sphingosine 1-phosphate, a key mediator of the cytokine network: juxtacrine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22(1):45-53.

192. Xia P., Wang L., Moretti PA., Albanese N., Chai F., Pitson SM., D'Andrea RJ., Gamble JR., Vadas MA. 2002. Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor- α signaling. *J Biol Chem.* 277(10):7996-8003.
193. Yamashita Y., Okamoto M., Ikeda M., Okamoto A., Sakai M., Gunji Y., Nishimura R., Hishinuma M., Shimada M., 2014. Protein kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa cell luteinization and oocyte maturation. *Endocrinology* 155, 1080–1090.
194. Zelinski MB., Murphy MK., Lawson MS., Jurisicova Pau KY., Toscano NP., Jacob DS., Fanton JK., Casper RF., Dertinger SD., Tilly JL., 2011. In vivo delivery of FTY720 prevents radiation-induced ovarian failure and infertility in adult female nonhuman primates. *Fertil Steril.* 95, 1440-5.
195. Zha J., Lackner MR. 2010. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 16(9):2512-7.
196. Zheng X., Boerboom D., Carrière PD. 2009. Transforming growth factor- β 1 inhibits luteinization and promotes apoptosis in bovine granulosa cells. *Reproduction* 137, 969–977.
197. Zhou J., Kumar TR., Matzuk MM., Bondy C. 1997. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol.* 11(13):1924-33.
198. Zhou K., Blom T. 2015. Trafficking and Functions of Bioactive Sphingolipids: Lessons from Cells and Model Membranes. *Lipid Insights.* 8(Suppl 1): 11–20.
199. Zimmermann RC., Hartman T., Kavic S., Pauli SA., Bohlen P., Sauer MV., Kitajewski J. (2003). Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J. Clin. Invest.* 112, 659–69.

200. Zimmermann RC., Xiao E., Husami N., Sauer MV., Lobo R., Kitajewski J., Ferin M. 2001. Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 768–72.



Sphingosine-1-phosphate, regulated by FSH and VEGF, stimulates granulosa cell proliferation



C.G. Hernández-Coronado^a, A. Guzmán^b, A. Rodríguez^c, J.A. Mondragón^d, M.C. Romano^d, C.G. Gutiérrez^c, A.M. Rosales-Torres^{b,*}

^a Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Mexico

^b Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento Producción Agrícola y Animal, Calzada del Hueso 1100, CP 04960 México City, Mexico

^c Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria, Av. Universidad 3000, CP 04510 México City, Mexico

^d CINVESTAV, I.P.N. Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Código Postal 07360 México City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 January 2016

Revised 15 June 2016

Accepted 20 June 2016

Available online 21 June 2016

Keywords:

Sphingosine 1-phosphate

Sphingosine kinase 1

Granulosa cell culture

FSH

VEGF

Bovine

ABSTRACT

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive polar sphingolipid which stimulates proliferation, growth and survival in various cell types. In the ovary S1P has been shown protect the granulosa cells and oocytes from insults such as oxidative stress and radiotherapy, and S1P concentrations are greater in healthy than atretic large follicles. Hence, we postulate that S1P is fundamental in follicle development and that it is activated in ovarian granulosa cells in response to FSH and VEGF. To test this hypothesis we set out: i) to evaluate the effect of FSH and VEGF on S1P synthesis in cultured bovine granulosa cells and ii) to analyse the effect of S1P on proliferation and survival of bovine granulosa cells *in vitro*. Seventy five thousand bovine granulosa cells from healthy medium-sized (4–7 mm) follicles were cultured in 96-well plates in McCoy's 5a medium containing 10 ng/mL of insulin and 1 ng/mL of LR-IGF-I at 37 °C in a 5% CO₂/air atmosphere at 37 °C. Granulosa cell production of S1P was tested in response to treatment with FSH (0, 0.1, 1 and 10 ng/mL) and VEGF (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ng/mL) and measured by HPLC. Granulosa cells produced S1P at 48 and 96 h, with the maximum production observed with 1 ng/mL of FSH. Likewise, 0.01 ng/mL of VEGF stimulated S1P production at 48, but not 96 h of culture. Further, the granulosa cell expression of sphingosine kinase-1 (SK1), responsible for S1P synthesis, was demonstrated by Western blot after 48 h of culture. FSH increased the expression of phosphorylated SK1 ($P < 0.05$) and the addition of a SK1 inhibitor reduced the constitutive and FSH-stimulated S1P synthesis ($P < 0.05$). Sphingosine-1-phosphate had a biphasic effect on granulosa cell number after culture. At low concentration S1P (0.1 μM) increased granulosa cell number after 48 h of culture ($P < 0.05$) and the proportion of cells in the G2 and M phase of the cell cycle ($P < 0.05$), whereas higher concentrations decreased cell number (10 μM; $P < 0.05$) by an increase ($P < 0.05$) in the proportion of cells in apoptosis (hypodiploid cells). In addition, treatment with SK-178 suppressed the FSH- and VEGF-stimulated rise of the granulosa cells number ($P < 0.05$). Interestingly, the effect of 0.1 μM S1P on granulosa cell number and their proportion in G2/M phases is similar to that observed with 1 ng/mL FSH. The results of this study are the first to demonstrate sphingosine-1-phosphate (S1P) synthesis in granulosa cells under the control of FSH and VEGF. The later achieved through the regulation of sphingosine kinase 1 expression. This S1P augments the proportion of cells in the G2/M phase of the cell cycle that translates in increased granulosa cell proliferation.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive polar sphingolipid which acts as an extracellular ligand, binding to specific G-protein

linked receptors, as well as ensuing intracellular signal transduction (Bartke and Hannun, 2009). It has been shown to stimulate proliferation, growth, survival, cell migration, inflammation, and angiogenesis in various cell types (Daum et al., 2009; Bartke and Hannun, 2009; Mendelson et al., 2014).

The synthesis of S1P occurs by phosphorylation of sphingosine by sphingosine kinases (SKs), activated in response to growth factors such as platelet-derived growth factor (PDGF), tumour

* Corresponding author at: Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán 04960, México City, Mexico.

E-mail address: anamaria@correo.xoc.uam.mx (A.M. Rosales-Torres).

necrosis factor α (TNF- α), epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor, basic fibroblast growth factor (bFGF; Liu et al., 2012), vascular endothelial growth factor (VEGF; Shu et al., 2002), as well as oestradiol (Sukocheva et al., 2006) and S1P itself (Spiegel and Milstien, 2003).

Within the cells, S1P has *anti*-apoptotic and cell survival functions, in direct contrast with its precursors ceramide and sphingosine that are associated with cell cycle arrest and death (Spiegel and Kolesnick, 2002; Van Brocklyn and Williams, 2012). The concentration of S1P in cells is low and strictly kept under control by a tightly regulated balance between its synthesis and its degradation. In fact, the dynamic balance between the intracellular levels of S1P and its metabolic precursors, ceramide and sphingosine, is proposed to form a biological sphingolipid rheostat that could determine whether a cell proliferates or dies (Kester and Kolesnick, 2003).

Recently we showed that bovine healthy follicles (8–17 mm) have almost 3 and 1.5 times more S1P in the granulosa and theca cells than atretic follicles (Hernández-Coronado et al., 2015). In addition, S1P protected luteinised human granulosa cells from the apoptotic effect of a hydrogen peroxide induced oxidative stress (Nakahara et al., 2012). Oocytes treated with S1P had higher rates of cleavage and blastocyst development than control oocytes when they were exposed to a heat shock *in vitro* (Roth and Hansen, 2004). Likewise, S1P treatment into the bursal sac surrounding the ovary prevent the massive loss of oocytes caused by radiation therapy in mice (Morita et al., 2000; Jurisicova et al., 2006; Kaya et al., 2008). Non-human primates treated with S1P, or its analogue FTY720, for 1 week prior to ovarian irradiation retained ovarian follicles and resumed menstrual cycles post treatment (Zelinski et al., 2011).

The role of VEGF and FSH on the stimulation of follicular development has been extensively reported. Follicle growth and granulosa cell steroidogenesis is supported by FSH from early stages of development through to selection (Aerts and Bols, 2010; Rosales-Torres et al., 2012). In addition, blocking the action of FSH with an antiserum injected on day 1 of the oestrus cycle caused an arrest of follicle maturation and reduced serum oestrogen concentration (Ravindranath et al., 1989). However, apart from FSH other trophic factors, such as VEGF, concomitantly stimulate the growth of antral follicles. Treatment with VEGF-trap (a specific VEGF ligand antibody) suppressed follicle antrum formation in the marmoset (Taylor et al., 2007). *In vitro*, VEGF stimulated granulosa cell proliferation acting through the ERK pathway (Doyle et al., 2010) and reduced the expression of active caspase-3 and the percentage of apoptotic cells (Greenaway et al., 2004). Most notably, a study on bladder tumour cells revealed that the addition of VEGF induced proliferation through activation of sphingosine kinase 1 (SK1), which increases S1P and this stimulated the Ras, MEK and ERK pathways (Shu et al., 2002).

Therefore, these evidences suggest that S1P adds to the action of FSH and VEGF to stimulate ovarian granulosa cell survival, proliferation and differentiation. We hypothesize that S1P is activated in granulosa cells by FSH and VEGF. To test this hypothesis, we set out: i) to evaluate the effect of FSH and VEGF on S1P synthesis in cultured bovine granulosa cells and ii) to analyse the effect of S1P on proliferation and survival of bovine granulosa cells *in vitro*.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

Cell culture media (McCoy's 5a-ME-043) was purchased from *In Vitro* (México). HEPES (H6147), Penstrep (P4333), L-glutamine (G8540), BSA (A7030), insulin (I3769), transferrin (T8158), sodium

selenite (S5261), FSH (F8174), VEGF (V7259), S1P (S 9666), O-phthalaldehyde (P0657), Nonidet P40 (213277), Tween 20 (P9416), MTT (M5655), 2-mercaptoethanol (M6250), chloroform (34854), N-Dimethylformamide (D4551), protease (P2714) and phosphatase inhibitors (S6508) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). LR3 IGF-1 was purchased from Gropep (Australia). Androstenedione was donated by the Department of reproduction, Veterinary School, UNAM. Sodium chloride (2490) was purchased from Monterrey (México), ethanol (64-17-15), EDTA (8993-01), glycerol (56815), acetic acid (9507-02), hydrochloric Acid (7647-01-0) were purchased from J.T. Baker. Tris (161-0719), SDS (161-0301), Anti-Rabbit (1706515) and Anti-Mouse (1706516) antibodies were purchased from Bio-Rad (USA). SK1-Ser-225 antibody (SP1641) was from ECM Bioscience (USA). GAPDH antibody (sc-59540) was bought from Santa Cruz Biotechnology. Phosphoprotein Blocker (WBAVDP001), the Luminata Forte reagent (WBLUF0500) and the SK1 inhibitor (SK-178 Calbiochem; 567732) were purchased from Millipore (Billerica, MA). Cycle Test Plus DNA reagent kit (340242) was purchased from Becton Dickinson and Company, (San Jose, CA, USA). Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates (167008) was acquired from Thermo scientific (USA).

2.2. Granulosa cell culture

Bovine ovaries were obtained from the local abattoir and kept at 37 °C during transport. The follicles were dissected out and classified morphologically as healthy, and those atretic or grossly atretic were discarded. Granulosa cells from medium-sized (4–7 mm) follicles were isolated and pooled. Seventy-five thousand cells were cultured in 200 μ L of McCoy 5a medium containing 10 ng/ml of insulin and 1 ng/mL of IGF-I, in a 96-well plate for 48 and 96 h as previously described (Gutiérrez et al., 1997).

2.3. Effect of FSH and VEGF on sphingosine-1-phosphate granulosa cell production

The effect of FSH (0, 0.1, 1 and 10 ng/mL) and VEGF (0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ng/mL) on granulosa cell S1P production at 48 and 96 h of *in vitro* culture was evaluated in four replicate cultures. The spent culture media of 4 culture wells for each treatment was pooled for sphingolipid extraction as follows: A 400 μ L aliquot of spent media was mixed with 400 μ L of 1 M NaCl, 800 μ L of HCl (37%) and stirred for 1 min. Subsequently 1.6 mL of chloroform (99.8%) were added and the sample vortex for 2 min and spun at 1900 g for 5 min. The top layer was recovered and mixed again with one mL of chloroform for a second extraction. The bottom layer, containing the chloroform with the sphingolipids of both extractions was pooled together and the chloroform evaporated under nitrogen gas. The sphingolipid extract was stored at –20 °C until assay for S1P (Villa et al., 2009; Sensken et al., 2010; Hernández-Coronado et al., 2015). The S1P standard and the extracted culture media samples were analysed by HPLC (Hitachi Elite Lachrom L-2200) with a XTerra RP18 (5 μ m, 3.0 \times 150 mm) column and a 2PK, XTerra RP18 (3.0 \times 20 mm) precolumn. The S1P elution was detected with a Hitachi Elite Lachrom L-2485 fluorescent detector at 340 nm excitation and 435 nm emission wavelengths.

A total of 30 μ L of the S1P standard and of extracted culture media samples were labelled with O-phthalaldehyde reagent (5 mg OPA, 0.1 mL of C₂H₆O, 10 μ L 2-mercaptoethanol and 9.9 mL of H₃BO₃ 3% (p/v) pH 10.5) for 20 min. An isocratic run using HPLC column buffer (methanol and a phosphate buffer (K₂HPO₄) 5 mM (80:20 v/v), pH 7) with a flow rate of 0.6 ml/min was used.

2.4. Phosphorylated sphingosine kinase 1 (SK1) identification in granulosa cell lysates

The presence of phosphorylated SK1 was investigated by western blot using a specific primary antibody (SK1-Ser-225). Granulosa cells were cultured with 1 ng/mL of FSH and 0.01 ng/mL of VEGF. After 48 h of culture cells were lysed in a buffer containing 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, protease inhibitor cocktail (0.20 mM of aprotinin, 5.25 mM of leupeptin and 1.8 mM of pepstatin A) and 1 mM of sodium orthovanadate as phosphatase inhibitor. Cell lysates were spun at 13,000 g for 10 min at 4 °C. Fifty micrograms of protein were loaded to a SDS-PAGE gel for electrophoresis including GAPDH as loading control. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using transfer buffer (Base-TRIS; 0.05 M, glycine; 0.04 M, SDS; 0.001 M and methanol; 20%) at 20 V for one hour at 4 °C. The membrane was incubated with Phosphoprotein Blocker buffer for 24 h at 4 °C, followed by an overnight incubation in the same buffer containing the specific primary antibody directed against SK1 at 1:250, or against GAPDH at 1:500 dilution. The membrane was then washed thrice in PBS-Tween-20 and incubated with secondary antibody (Anti-Rabbit and Anti-Mouse for SK1 and GAPDH respectively) in PBS-Tween-20 buffer for 24 h at 4 °C. Secondary antibodies were both labelled with Luminata Forte.

2.5. Effect of sphingosine kinase 1 inhibitor on the production of S1P by granulosa cells

To determine whether the effect of FSH on S1P synthesis was dependent on the activation of SK1, granulosa cells were cultured with the SK1 inhibitor SK-178 at 0, 5 and 10 μ M, in the absence or presence of 1 ng/mL of FSH. Four cultures were performed and in each occasion each treatment contained 4 wells. After 48 h of culture, spent media from the 4 wells of the same treatment was pooled together. Sphingolipids extraction and S1P quantification by HPLC was performed as described previously.

2.6. Effect of sphingosine-1-phosphate on granulosa cell number

The effect of 0, 0.1, 1 and 10 μ M of S1P on granulosa cell number after 48 h and 96 h of culture was studied in three separate cultures with 3 culture wells per treatment. After defining the S1P concentration that yielded the greater number of granulosa cells the effect of S1P (0.1 μ M) was compared to that of FSH (1 ng/mL) and S1P plus FSH (0.1 μ M/1 ng/mL) or neither (control) at 48 and 96 h. For this determination three separate cultures were performed and each contained 3 wells per treatment.

Granulosa cells number was determined at the end of culture as described by Rangel et al. (2009). The cells were added 20 μ L MTT solution (5 mg MTT per 1 mL of culture medium) and incubated for 24 h. Formazan was released from the cells by lysing them with 100 μ L lysis buffer (5 mL distilled water, 5 mL N-N-dimethylformamide, 250 μ L HCl 1 N, 250 μ L acetic acid 0.25 M, and 1 g SDS, pH 4.7) at room temperature for 4 h. Cell number was directly related to the absorbance of the medium when read on a spectrophotometer at 595 nm. A regression equation was fitted to calculate the relationship between absorbance and cell number.

2.7. The effect of FSH and VEGF on cell number is dependent of S1P synthesis

To evaluate if the effects of FSH and VEGF on granulosa cell proliferation depends of S1P production, 75×10^3 granulosa cells were cultured with the SK1 inhibitor SK-178 at 0 and 5 μ M concentration, in the presence or absence of 1 ng/mL of FSH or 0.01 ng/mL of VEGF. Four separate cultures were performed with four replicate

wells within each treatment. After 48 and 96 h of culture, spent media was removed and cell number was quantified by MTT as described above.

2.8. Effect of sphingosine-1-phosphate on the cell cycle and the proportion of hypodiploid granulosa cells

The effect of S1P and FSH on granulosa cell proliferation and death was analysed by the determination of the proportion of proliferate cells in G2 and M phase of the cell cycle or hypodiploid cells by flow cytometry. For this study, four separate cultures were made with 8 wells per treatment. After 48 h cells from the 8 well in each treatment were pooled and diluted at a final concentration of 1.0×10^6 cells/ml. The cells were permeabilised with 125 μ L per well of BD Cycletest Plus Buffer Solution and their nuclear DNA was labelled with propidium iodide (PI) using Cycle Test Plus DNA reagent kit (catalogue No. 340242 Becton Dickinson and Company, San Jose, CA, USA). The proportion of granulosa cells in the different phases of the cell cycle was determined by its nuclear DNA on FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with an argon laser (488 nm). Data of 25 000 events were collected for each sample. Based on their DNA content, the percentage of cells in each stage of the cell cycle (G0/G1, S and G2/M phases) was calculated using ModFit Lt. 4.1.

2.9. Statistical analyses

The effects of FSH and VEGF and their interaction with time on granulosa S1P production were evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA). Differences between means for the different ligand concentrations against the control treatment were determined by Dunnett's test. Similarly, the effect of FSH and S1P and their interaction with time on granulosa cell number were evaluated by two way analysis of variance and differences among treatments were determined with Tukey's test. For both prior analyses cell number data was transformed to its logarithmic to correct for heteroscedasticity of the variances. The effect of the S1P inhibitor SK-178 on S1P production and granulosa cell number whether in presence or absence of FSH and VEGF was evaluated by ANOVA followed by Tukey's test. In all cases the replicate cultures were considered as a random effect. The effect of S1P and FSH on the distribution of granulosa cells in the different stages of the cell cycle was analysed by ordinal regression after logit transformation of the data. The results were then back transformed to obtain the proportions of cells at each stage of the cell cycle.

3. Results

3.1. FSH and VEGF increased sphingosine-1-phosphate production and phosphorylated sphingosine kinase-1 (SK1) protein expression by granulosa cells

Granulosa cells produced S1P *in vitro* (Fig. 1). The addition of 1 ng/mL FSH increased S1P production and 96 h (Fig. 1b) of culture. Greater FSH concentrations (10 ng/mL) had no effect on S1P production at either time point ($P > 0.05$). Similarly, at 48 h VEGF stimulated S1P production by granulosa cells when added at 0.01 ng/mL ($P < 0.05$; Fig. 1C), but greater doses did not affect S1P production. However, the effect of VEGF was not observed at 96 h. Time in culture increased granulosa cell S1P production when cells were cultured with FSH ($P < 0.05$), but not when cultured with VEGF ($P > 0.05$).

Protein expression (analysed by western blot) of phosphorylated SK-1, the enzyme responsible for the synthesis of S1P, was negligible (Fig. 2A) in non-stimulated granulosa cells. However,

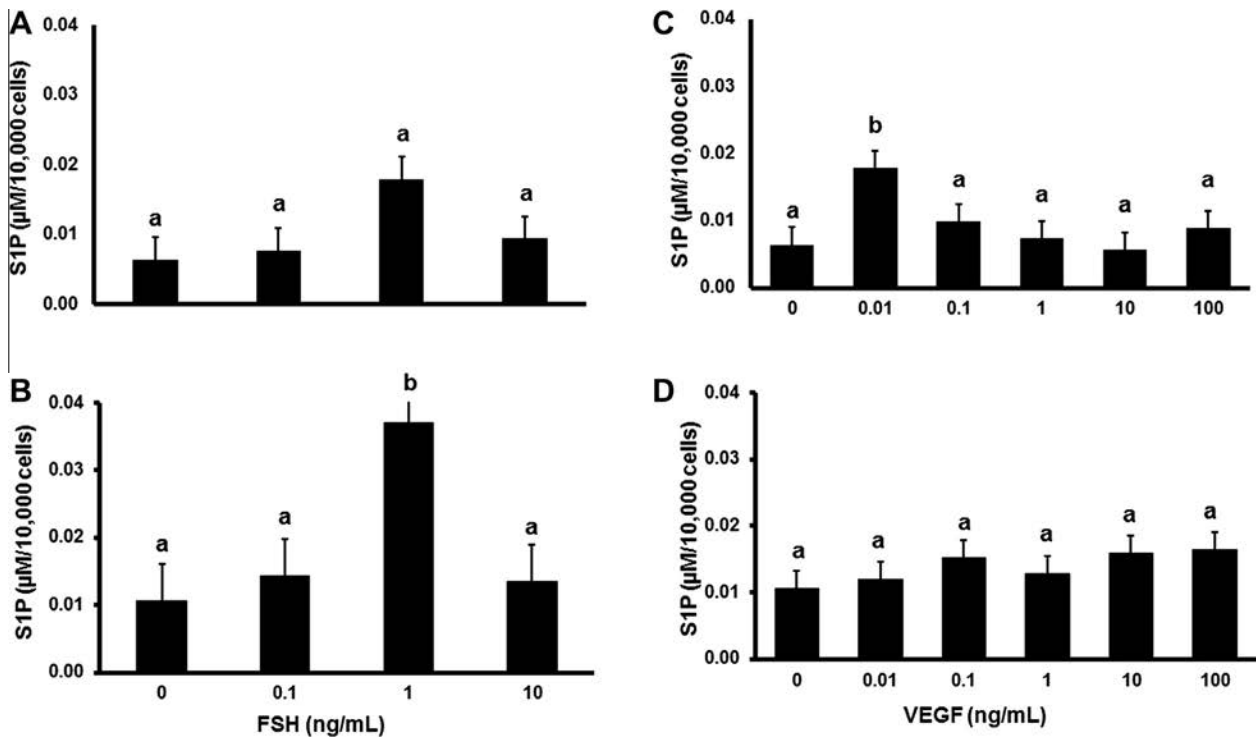


Fig. 1. Sphingosine-1-phosphate production by bovine granulosa cells from follicles 4–7 mm in diameter cultured *in vitro* for 48 (top panel) or 96 h (bottom panel) and treated with FSH or VEGF. The graphic represents the mean of 4 replicates per treatment in 4 different cultures, a and b show statistical differences at $P < 0.05$. Concentrations of S1P are presented relative to 10,000 cells at the end of culture.

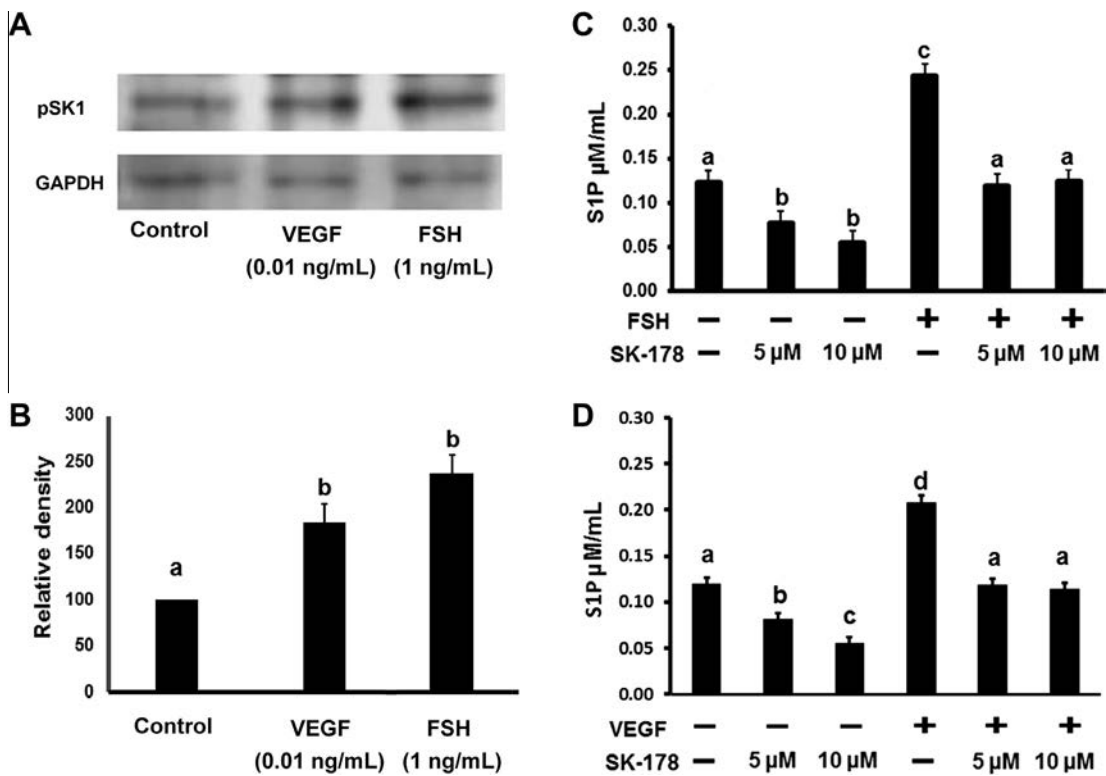


Fig. 2. Western blot analysis (A) and band density relative quantification (B) of Phosphorylated Sphingosine Kinase-1 (pSK1) protein expression of granulosa cells after stimulation with follicle stimulating hormone (FSH) and vascular endothelial growth factor (VEGF). The effect of the sphingosine kinase-1 inhibitor (SK-178) on sphingosine-1-phosphate (S1P) production by bovine granulosa cells from follicles 4–7 mm in diameter after 48 h of culture with or without 1 ng/ml of FSH (C) or 0.01 ng/mL of VEGF (D). Data are means \pm SEM of four independent experiments. a, b, c and d indicate significant differences between treatments, $P < 0.05$.

in agreement with S1P production, phosphorylation of SK1 was double ($P < 0.05$) in granulosa cells treated with FSH (1 ng/mL) and VEGF (0.01 ng/mL) compared with the control (Fig. 2B).

As shown above, the granulosa cells cultured with 1 ng/mL FSH and 0.01 ng/mL of VEGF increased S1P production, whereas the addition of SK-178 (a specific inhibitor of SK1), decreased S1P production in a dose dependent manner in cells cultured without FSH or VEGF. Similarly, when cells were cultured with FSH and VEGF the addition of SK-178 at 5 and 10 μM suppressed the FSH- and VEGF-stimulated rise of S1P concentration in culture media (Fig. 2C and D).

3.2. Sphingosine-1-phosphate increased granulosa cell number in vitro

Treatment with S1P showed a biphasic effect on the number of granulosa cells present after 48 and 96 h of culture. Low concentration of S1P (0.1 μM) in culture media was stimulatory to cell number. However, the greatest concentration of S1P tested (10 μM) reduced the number of cells (Fig. 3).

The effect of S1P on granulosa cell number was tested again at 48 and 96 h of culture and compared to the effect of FSH alone or in combination with the former. Follicle stimulating hormone and S1P increased cell number at 48 and 96 h ($P < 0.05$) compared with the control (Fig. 4A and B). The combination of both factors added together (1 ng/mL FSH and 0.1 μM of S1P) increased granulosa cell number when compared to the control, but did not differ from that observed for each factor separately (Fig. 4A and B).

3.3. The effect of FSH and VEGF on granulosa cell number is dependent on S1P synthesis

Treatment with 1 ng/mL of FSH and 0.01 ng/mL of VEGF increased ($P < 0.05$) granulosa cell number in both 48 and 96 h of culture (Fig. 5A and B). The addition of SK-178 (5 μM) without

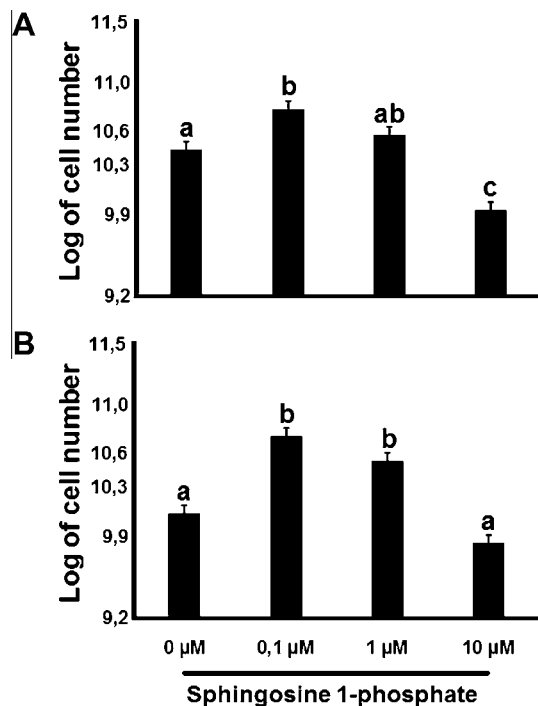


Fig. 3. Effect of sphingosine-1-phosphate at 0, 0.1, 1 or 10 μM on bovine granulosa cell number from follicles 4–7 mm in diameter after 48 (A) and 96 h (B) of culture. a, b and c indicate significant differences between treatments $P < 0.05$.

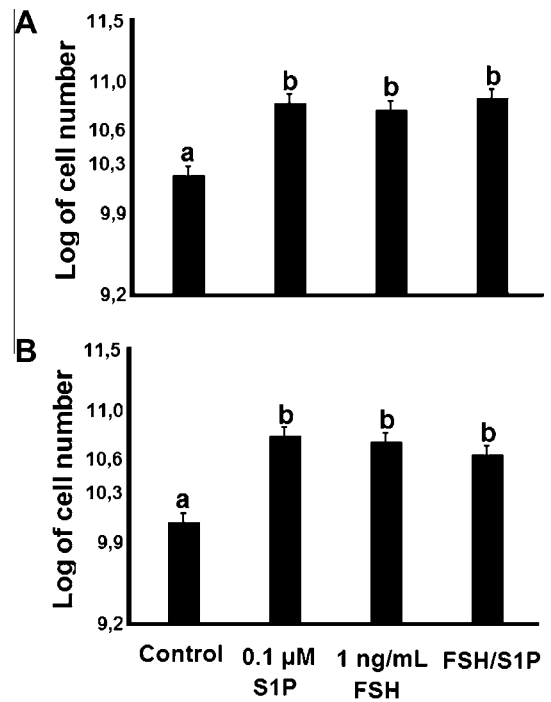


Fig. 4. Bovine granulosa cell number after 48 h (top panel) and 96 h (bottom panel) of culture with sphingosine-1-phosphate (S1P: 0.1 μM), FSH (1 ng/mL) or the combination of both S1P and FSH. a and b indicate significant difference between treatments $P < 0.05$.

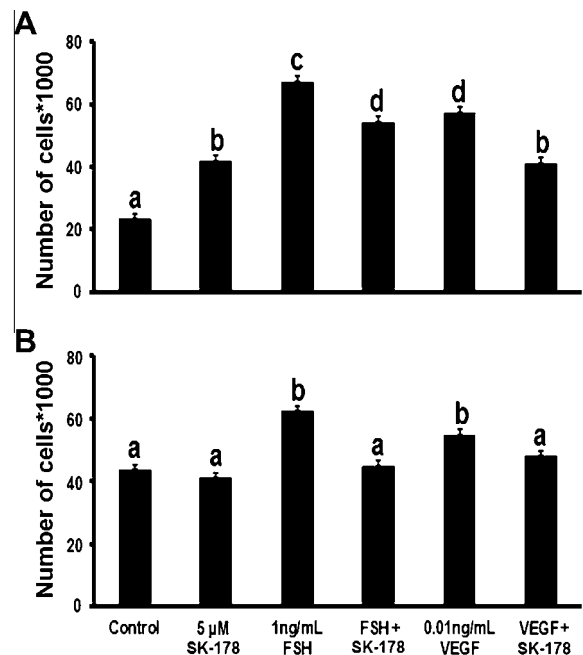


Fig. 5. Effect of the sphingosine kinase-1 inhibitor (SK-178) on granulosa cell number from follicles 4–7 mm in diameter after 48 (A) and 96 h (B) of culture with or without 1 ng/mL of FSH or 0.01 ng/mL of VEGF. a, b and c indicate significant difference between treatments $P < 0.05$.

FSH and VEGF did not affect cells number. However, treatment with SK-178 at both 48 (Fig. 5A) and 96 h (Fig. 5B) of culture suppressed the FSH- and VEGF-stimulated rise of the granulosa cells number ($P < 0.05$).

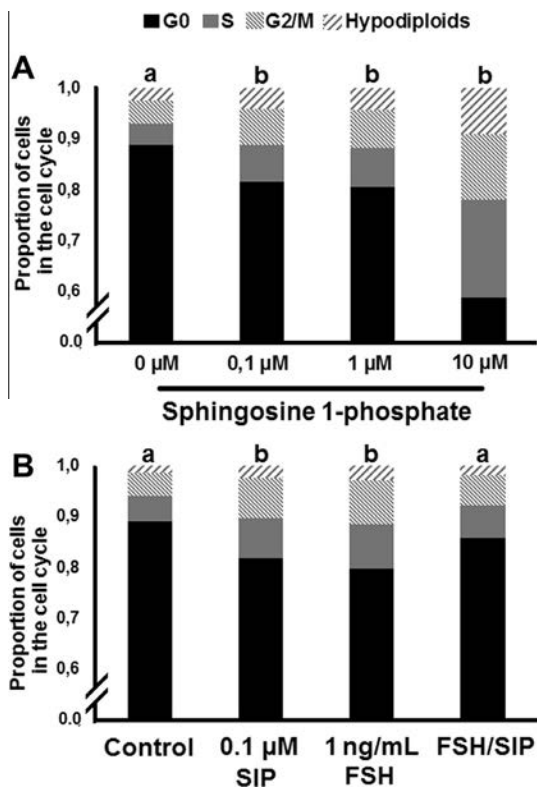


Fig. 6. Distribution of granulosa cells in the different stages of the cell cycle and the effect of sphingosine-1-phosphate (S1P; 0.1, 1 y 10 µM; panel A), or 1 µM of sphingosine-1-phosphate (S1P), 1 ng/mL of FSH or its combination (0.1 µM S1P, 1 ng/mL FSH) (panel B). Granulosa cells were collected from bovine ovarian follicles 4–7 mm in diameter and culture for 48 h. a and b indicate significant difference in the cell cycle distribution against the control treatment $P < 0.01$.

3.4. Sphingosine-1-phosphate increase the proportion of proliferating granulosa cells

The proportion of granulosa cells in the S and G2/M phases of the cell cycle augment ($P < 0.05$) with increased S1P treatment concentration (Fig. 6A). Similarly, the proportion of cells with reduced amount of DNA (hypodiploid cells) increased with S1P treatment. However, for the highest S1P treatment concentrations (10 µM) the proportion of hypodiploid cells was 3.6 and 2.1 times greater ($P < 0.05$) than that observed for control, 0.1 or 1 µM of S1P treatments (Fig. 6A).

The stimulatory effect of S1P (0.1 µM) on the proportion of cells in S and the G2/M phase of the cycle was similar to that seen in cells treated with FSH (Fig. 6B). The combination of FSH and S1P (1 ng/mL FSH and 0.1 µM S1P) did not affect the distribution of cells in the S and G2/M phases of the cell cycle. Similarly, the proportion of hypodiploid cells increased with FSH (1 ng/mL) and S1P (0.1 µM) treatment, but did not change when FSH and S1P were used in combination (Fig. 6B).

4. Discussion

In this study it is shown that FSH and VEGF stimulate S1P production in ovarian granulosa cells. This is achieved by promoting the synthesis of S1P via phosphorylation of SK1. In addition, similar to the effect that FSH exerts on the granulosa cells, our results show that S1P stimulates proliferation and/or survival of granulosa cells. These results suggest that FSH and VEGF promote the synthesis of S1P, and this sphingolipid either acting in an autocrine

manner or in intracellular signal transduction enhances the survival and proliferation of granulosa cells.

Recently we demonstrated that large bovine ovarian follicles (>8 mm) contain almost 3 fold greater concentrations of S1P in granulosa cells than their atretic counterparts (Hernández-Coronado et al., 2015). In the present study FSH, and to a lesser extent VEGF, increased the concentration of S1P in granulosa cells. In addition, both FSH and VEGF augment phosphorylated SK1 while the inhibition of this enzyme, through a specific antagonist, reduced the concentration of S1P in the culture media in the presence or absence of FSH (46% and 70% respectively) and VEGF (47% and 61% respectively). Synthesis of S1P depends on the activation of SKs, which is primarily mediated by protein kinase C (PKC) (Johnson et al., 2002). Vascular endothelial growth factor activates PKC that in turn phosphorylates SK1 to increase sphingosine conversion into S1P in a myriad of cell types (endothelial, neurons, embryonic, cancer, oocytes and pneumocytes) (Shu et al., 2002; Spiegel and Milstien, 2003; Bryan et al., 2008; Giussani et al., 2014). Although, FSH is traditionally thought to act via PKA (Bernard et al., 2010), it may also activate PKC through $G\alpha q11$ pathway as has been shown in porcine granulosa cells (Yamashita et al., 2014). Hence, our results together with published literature support the activation of SK1 and the production of S1P in granulosa cells after FSH and VEGF stimulation.

The stimulatory effect of FSH and VEGF on granulosa cells proliferation are extensively documented (for review see Hunzicker-Dunn and Maizels, 2006; Rosales-Torres et al., 2012). Follicle stimulating hormone at high concentrations (50 ng/mL) reduced mRNA expression of the apoptotic inducer BAX (Mani et al., 2010) in bovine granulosa cells *in vitro*. Further, FSH (1 ng/mL) treatment reduced the TGF β 1 induced protein expression of cleaved caspase-3 and increased the percentage of cells in the S+G2/M phases of the cell cycle (Zheng et al., 2009). Similarly, VEGF (50 ng/mL) reduced the expression of active caspase 3 in bovine granulosa cells, protecting them from apoptosis (Greenaway et al., 2004), and promoted granulosa cell proliferation (1 ng/mL; Doyle et al., 2010). In our hands, 0.1 µM of S1P resulted in greater cell number and greater proportion of proliferating granulosa cells. *In vivo*, treatment of mice with S1P prior to radiation therapy spared the oocytes from apoptosis (Morita et al., 2000). In addition, S1P (2 mM) injected into the ovarian bursa protected the primordial follicles from chemotherapy in rats. Similarly, *in vitro* S1P treatment of human luteinized granulosa cells decreased apoptosis after induced oxidative stress caused by hydrogen peroxide (Nakahara et al., 2012). The S1P could be acting as a ligand linking to its specific membrane receptor (Takabe et al., 2008), activating PI3K, AKT, Ras, MEK and Erk-1 pathways and hence stimulate cell proliferation and survival (Argaves et al., 2010). Further, S1P could also act intracellularly, directly triggering the ERK pathway, and inhibiting c Jun N-terminal kinases (JNK) thus blocking intrinsic apoptosis (Maceyka et al., 2002). Therefore, the increased cell number seen in S1P treated wells could have been the consequence of an increase in cell division, a reduction of cell death or both. Moreover, in the present experiment the specific inhibition of S1P synthesis reduced the number of granulosa cells confirming the need of S1P synthesis to mediate the effects of FSH and VEGF on granulosa cell proliferation and survival.

It is worth noting that the greater concentrations of FSH and VEGF tested herein caused a reduction in S1P production. This phenomenon has been observed before. In bovine granulosa cells cultured in a serum free system, FSH was found to have an optimal stimulatory concentration for cell proliferation (1 ng/mL), beyond which cells did not increase but actually decreased in number when the concentration of FSH increased (Gutiérrez et al., 1997). Similarly, an optimum dose was found for the effect of VEGF on bovine granulosa cell proliferation where 1 ng/mL was stimulatory

and doses of 10 and 100 ng/mL blunted the response (Doyle et al., 2010). It has been proposed that the greater concentrations of ligand affects its receptor. In the rat, increased FSH down-regulated both protein and mRNA levels for the FSH receptor suggesting a suppression of gene expression and protein synthesis concomitant to the increased receptor occupancy and internalization (Simoni et al., 1997). This partially explains why increased concentrations of FSH and VEGF did not stimulate or even reduced S1P synthesis. Moreover, in the case of S1P these results are of particular interest as S1P concentrations and its relation to its active metabolites, sphingosine and ceramide which have apoptotic actions, would determine the fate of the cells.

As mentioned above, the effects of S1P are dependent on its concentration (Davaile et al., 2002). It has being suggested that high concentrations (>1 μ M), S1P may be converted to sphingosine by sphingosine-1-phosphate phosphatase, which in turn is converted to ceramide by ceramidase (Allende et al., 2013). Ceramide has antiproliferative and apoptotic activity in several cell types (Jin et al., 2003; Spiegel and Kolesnick, 2002; Van Brocklyn and Williams, 2012). In human T cells in culture, 10 μ M of S1P reduced their proliferation (Jin et al., 2003). There is also evidence that high doses of S1P induce apoptosis by a mechanism independent of its receptor through the ERK pathway. Although this pathway is typically associated with cell survival, high stimulation with S1P, causes a prolonged activation of the ERK pathway generating cell cycle arrest (Shin et al., 2007). Our results support this dual nature of the S1P effect on granulosa cells. Treatment with S1P (0.1 and above) increased the proportion of dividing cells (G2/M). However, at greater concentrations (10 μ M) S1P also increased the proportion of cells in apoptosis (hypodiploid cells).

In conclusion, our results show for the first time that VEGF and FSH increase S1P synthesis in granulosa cells through the phosphorylation of SK1. The increase in S1P synthesis regulates cell cycle progression increasing the proportion of proliferating cells. However, at greater concentrations, S1P increases the proportion of hypodiploid cells.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgements

Financial support for this study was provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant number CB 158248 and by Secretaría de Educación Pública grant number UAM-X-CA-107. Hernández-Coronado thanks CONACYT for the Doctorate student grant (373194). The authors thank Ms. Ortega-Serrano for her help in the collection of ovaries and cell culture.

References

Aerts, J.M.J., Bols, P.E.J., 2010. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis of the bovine species. Part II: antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 180–187.

Allende, M.L., Sipe, L.M., Tuymetova, G., Wilson-Henjum, K.L., Chen, W., Proia, R.L., 2013. Sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 regulates keratinocyte differentiation and epidermal homeostasis. *J. Biol. Chem.* 288, 18381–18391.

Argaves, K.M., Wilkerson, B.A., Argaves, W.S., 2010. Sphingosine-1-phosphate signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *World J. Biol. Chem.* 10, 291–297.

Bartke, N., Hannun, Y.A., 2009. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* 50, 91–96.

Bernard, D.J., Forton, J., Wang, Y., Lamba, P.M.D., 2010. Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertil. Steril.* 93, 2465–2485.

Bryan, L., Kordula, T., Spiegel, S., Milstien, S., 2008. Regulation and functions of sphingosine kinases in the brain. *Biochim. Biophys. Acta* 9, 459–466.

Daum, G., Grabski, A., Reidy, M.A., 2009. Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1439–1443.

Davaile, J., Li, L., Mallat, A., Lotersztajn, S., 2002. Sphingosine 1-phosphate triggers both apoptotic and survival signals for human hepatic myofibroblasts. *J. Biol. Chem.* 40, 37323–37330.

Doyle, L.K., Walker, C.A., Donadeu, F.X., 2010. VEGF modulates the effects of gonadotropins in granulosa cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* 3, 127–137.

Giussani, P., Tringali, C., Riboni, L., Viani, P., Venerando, B., 2014. Sphingolipids: key regulators of apoptosis and pivotal players in cancer drug resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 3, 4356–4392.

Greenaway, J., Connor, K., Pedersen, H.G., Coomber, B.L., LaMarre, J., Petrik, J., 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology* 6, 2896–2905.

Gutiérrez, 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. *Biol. Reprod.* 3, 608–616.

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

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. *Cell. Signal.* 18, 1351–1359.

Jin, Y., Knudsen, E., Wang, L., Bryceson, Y., Damaj, B., Gessani, S., Maghazachi, A.A., 2003. Sphingosine 1-phosphate is a novel inhibitor of T-cell proliferation. *Blood* 101, 4909–4915.

Johnson, K.R., Becker, K.P., Facchinetti, M.M., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2002. PKC dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane: extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J. Biol. Chem.* 277, 35257–35262.

Juriscova, A., Lee, H.J., D'Estaing, S.G., Tilly, J.L., Perez, G.L., 2006. Molecular requirements for doxorubicin mediated death in murine oocytes. *Cell Death Differ.* 13, 1466–1474.

Kaya, H., Desdicoglu, R., Sezik, M., Ulukaya, E., Ozkaya, O., Yilmaztepe, A., 2008. Does sphingosine-1-phosphate have a protective effect on cyclophosphamide- and irradiation-induced ovarian damage in the rat model? *Fertil. Steril.* 89, 732–735.

Kester, M., Kolesnick, R., 2003. Sphingolipids as therapeutics. *Pharmacol. Res.* 47, 365–371.

Liu, X., Zhang, Q.H., Yi, G.H., 2012. Regulation of metabolism and transport of sphingosine-1-phosphate in mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem.* 363, 21–33.

Maceyka, M., Payne, S.G., Milstien, S., Spiegel, S., 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 193–201.

Mani, A.M., Fenwick, M.A., Cheng, Z., Sharma, M.K., Singh, D., Wathes, D.C., 2010. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction* 139, 139–151.

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

Morita, Y., Pérez, G.L., Paris, F., Miranda, S.R., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Xie, Z., Reed, J.C., Schuchman, E.H., Kolesnick, R.N., Tilly, J.L., 2000. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat. Med.* 6, 1109–1114.

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. *Fertil. Steril.* 98, 1001–1008.

Rangel, P.L., Rodríguez, A., Rojas, S., Sharp, P.J., Gutiérrez, C.G., 2009. Testosterone stimulates progesterone production and steroidogenic acute regulatory protein (StAR), P450 cholesterol side-chain cleavage (P450_{sc}) and luteinizing hormone receptor (LH-R) mRNAs expression in hen (*Gallus domesticus*) granulosa cells. *Reproduction* 138, 961–969.

Ravindranath, N., Sheela Rani, C.S., Martin, F., Moudgal, N.R., 1989. Effect of FSH deprivation at specific times on follicular maturation in the bonnet monkey (*Macaca radiata*). *J. Reprod. Fertil.* 87, 231–241.

Rosales-Torres, A.M., Guzmán, A., Gutiérrez, A.C., 2012. Desarrollo folicular en rumiantes domésticos. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 1, 147–160.

Roth, Z., Hansen, P.J., 2004. Sphingosine 1-phosphate protects bovine oocytes from heat shock during maturation. *Biol. Reprod.* 71, 2072–2078.

Sensken, S.C., Bode, C., Nagarajan, M., Peest, U., Pabst, O., Gräler, M.H., 2010. Redistribution of sphingosine 1-phosphate by sphingosine kinase 2 contributes to lymphopenia. *J. Immunol.* 184, 4133–4142.

Shin, J.H., Choi, G.S., Kang, W.H., Myung, K.B., 2007. Sphingosine 1-phosphate triggers apoptotic signal for B16 melanoma cells via ERK and caspase activation. *J. Korean Med. Sci.* 22, 298–304.

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. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7758–7768.

Simoni, M., Gromoll, J., Nieschlag, E., 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr. Rev.* 18, 739–773.

Spiegel, S., Kolesnick, R., 2002. Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent. *Leukemia* 16, 1596–1602.

- Spiegel, S., Milstien, S., 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 397–407.
- Sukocheva, O., Wadham, C., Holmes, A., Albanese, N., Verrier, E., Feng, F., Bernal, A., Derian, C.K., Ullrich, A., Vadas, M.A., Xia, P., 2006. Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J. Cell Biol.* 173, 301–310.
- Takabe, K., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S., 2008. “Inside-out” signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* 60, 181–195.
- Taylor, P.D., Wilson, H., Hillier, S.G., Wiegand, S.J., Fraser, H.M., 2007. Effects of inhibition of vascular endothelial growth factor at time of selection on follicular angiogenesis, expansion, development and atresia in the marmoset. *Mol. Hum. Reprod.* 13, 729–736.
- Van Brocklyn, J.R., Williams, J.B., 2012. The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 163, 26–36.
- Villa, N.Y., Kupchak, B.R., Garitaonandia, I., Smith, J.L., Alonso, E., Alford, C., Cowart, L.A., Hannun, Y.A., Lyons, T.J., 2009. Sphingolipids function as downstream effectors of a fungal PAQR. *Mol. Pharmacol.* 75, 866–875.
- Yamashita, Y., Okamoto, M., Ikeda, M., Okamoto, A., Sakai, M., Gunji, Y., Nishimura, R., Hishinuma, M., Shimada, M., 2014. Protein kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa cell luteinization and oocyte maturation. *Endocrinology* 155, 1080–1090.
- Zelinski, M.B., Murphy, M.K., Lawson, M.S., Jurisicova, A., Pau, K.Y., Toscano, N.P., Jacob, D.S., Fanton, J.K., Casper, R.F., Dertinger, S.D., Tilly, J.L., 2011. In vivo delivery of FTY720 prevents radiation-induced ovarian failure and infertility in adult female nonhuman primates. *Fertil. Steril.* 95, 1440–1445.
- Zheng, X., Boerboom, D., Carrière, P.D., 2009. Transforming growth factor-beta1 inhibits luteinization and promotes apoptosis in bovine granulosa cells. *Reproduction* 137, 969–977.