

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

### PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

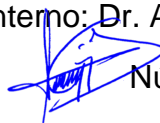
Importancia de Esfingosina 1-fosfato (S1P) en la viabilidad de células de la granulosa de bovino en cultivo.

Prestadora de servicio social: Lilia Delgado Garduño

Matricula: 2162031121

#### Asesores

Interno: Dr. Adrián Guzmán Sánchez



Número económico: 34155

Interno: Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado



Número económico: 41207

Lugar de realización: Laboratorio "Bioquímica de la Reproducción" de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Fecha de inicio y termino: 18 de julio del 2022 - 18 de enero del 2023

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1. Esfingolípidos .....	4
2.2. Esfingosina-1-fosfato (S1P).....	5
2.2.1. Síntesis y estructura de Esfingosina 1- fosfato.....	5
2.2.2. Inhibidores de la Esfingosina quinasa .....	6
2.2.3. Función de la Esfingosina 1 fosfato.....	7
2.3. Células de la granulosa y el desarrollo de folículos antrales .....	7
2.3.1 Proliferación y supervivencia de células de la granulosa.....	9
3. OBJETIVOS .....	10
Objetivo general .....	10
Objetivos particulares.....	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	10
4.3. Obtención de ovarios y aislamiento de células de la granulosa .....	10
4.4. Cultivos de células de la granulosa .....	11
4.5. Determinación del número de células viables mediante el ensayo MTT .....	12
4.6. Ensayo de ELISA.....	13
4.7. Análisis estadístico.....	13
5. ACTIVIDADES REALIZADAS .....	13
6. METAS ALCANZADAS .....	14
7. RESULTADOS Y CONCLUSIÓN.....	14
<i>La S1P favorece la viabilidad de células de la granulosa de bovino en cultivo.....</i>	14
<i>La FSH estimula la síntesis de S1P en células de la granulosa de bovino en cultivo.....</i>	14
8. DISCUSIÓN.....	16
9. RECOMENDACIONES .....	18
10. REFERENCIAS .....	18

## 1. INTRODUCCIÓN

Los fosfolípidos son los principales lípidos de la membrana plasmática debido a que conforman bicapas lipídicas. Esta estructura celular básica actúa como una barrera para proteger a la célula contra diversas agresiones ambientales y, lo que es más importante, permite que se produzcan múltiples procesos celulares en los compartimentos subcelulares (Dai *et al.*, 2021). Dentro de los principales grupos de fosfolípidos encontramos a los glicerofosfolípidos, esfingolípidos y los esteroides. Los fosfolípidos de membrana además de ser componentes estructurales modulan diversas cascadas de señalización implicadas en la proliferación, sobrevivencia y muerte celular (Udovin, 2017). Actualmente, se ha tomado un gran interés en los efectos de los esfingolípidos debido a que actúan como segundos mensajeros y son capaces de regular procesos como: apoptosis, diferenciación y ciclo celulares (Sterin-Speziale y Leocata, 2007; Sukocheva y Wadham, 2014).

La esfingosina 1-fosfato (S1P) es un metabolito de los esfingolípidos que está implicado en diversos procesos celulares como la proliferación, sobrevivencia, angiogénesis, migración, entre otros, en diversos tipos celulares (Calise *et al.*, 2012). Actúa como un mediador extracelular a través de la interacción con sus receptores acoplados a proteína G o como segundo mensajero (Hernández-Coronado *et al.*, 2019). La producción de S1P depende de la enzima esfingosina cinasa (SK) que fosforila a otro metabolito de esfingolípidos, la esfingosina, para convertirla en S1P (Palacios, 2009). La SK tiene dos isoformas principales, la SK1 y SK2, esta primera es la que principalmente está implicada en la conversión a S1P. La activación de SK1 depende de la estimulación por diversos factores tróficos en la célula tales como hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, neurotransmisores, entre otros (Leclercq y Pitson, 2008; González, 2021). Existen evidencias en células foliculares ováricas que muestran la participación de S1P. En células de la granulosa y teca de folículos dominantes sanos de bovino, se encontró una mayor concentración de S1P, respecto a folículos dominantes atrésicos (Hernández-Coronado *et al.*, 2015). Además, en células de la granulosa de bovino en cultivo, se mostró que la hormona folículo estimulante (FSH) incrementó las

concentraciones de S1P a través de la activación de la SK1 (Hernández-Coronado *et al.*, 2016). Adicionalmente, la adición de S1P, al medio de cultivo de células de la granulosa de bovino favoreció la proliferación de estas células (Hernández-Coronado *et al.*, 2016).

La manera más atinada de evaluar los efectos de S1P sobre la función celular, implica la inhibición de la SK1, actualmente existen en el mercado diversos inhibidores, sin embargo, hay controversia en la eficacia de inhibición de las concentraciones de S1P debido a que algunos han mostrado acción no sólo sobre la SK1 y por lo tanto enmascaran los resultados esperados. Con la finalidad de tener una veracidad sobre el efecto de S1P sobre la viabilidad de células de la granulosa, se emplearon dos inhibidores PF543 y SKI178. Por lo anterior y considerando que se tienen evidencias de la acción de S1P en células de la granulosa, con el presente servicio social se pretendió “Evaluar la importancia de S1P en la viabilidad de células de la granulosa de bovino en cultivo”, mediante la inhibición de la SK1.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Esfingolípidos**

Son lípidos localizados en la cara externa de la membrana plasmática, en el lumen de vesículas intracelulares y organelos como el aparato de Golgi y mitocondria; están conformados por bases esfingoides o esfingosinas. Son moléculas anfipáticas, ya que poseen una cabeza polar y dos radicales hidrofóbicos y debido a esto, brindan estructura y soporte celular, además de intervenir en procesos dinámicos y funcionales a través de la transducción de señales y del transporte intermembrana para regular procesos como muerte celular, proliferación celular, diferenciación celular, inflamación y ciclo celular (Udovin, 2017).

El metabolismo de los esfingolípidos ocurre por una serie de reacciones que son catalizadas por enzimas. La ceramida (CER) es la molécula principal en esta síntesis y es la precursora de los esfingolípidos complejos tales como: esfingosina (Sph), ceramida 1- fosfato (C1P) y la esfingosina 1- fosfato (S1P). Este proceso ocurre en el retículo endoplasmático donde se sintetiza la CER y posteriormente

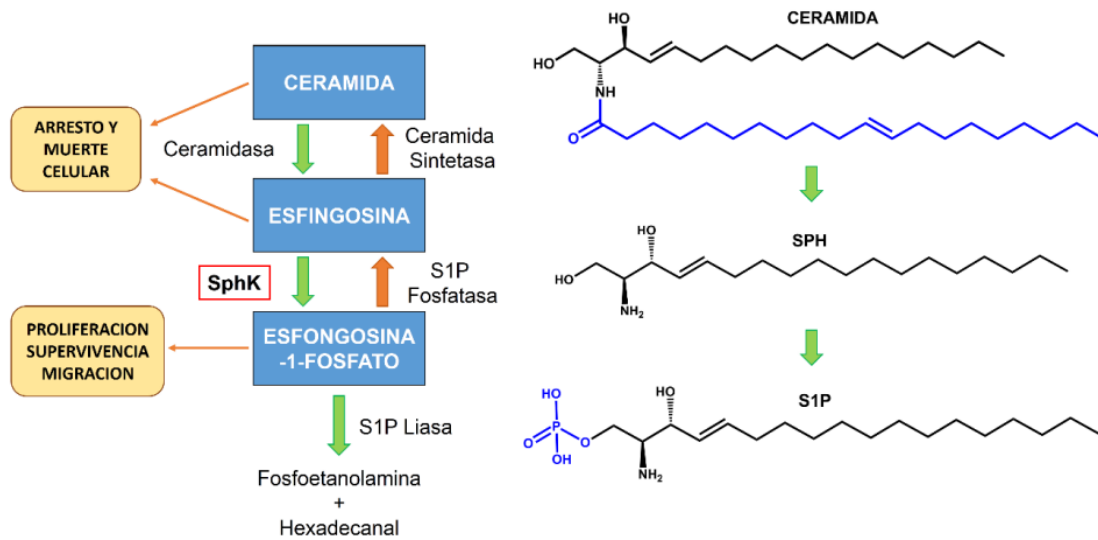
pasa al aparato de Golgi mediante vesículas o empleando una proteína transportadora de ceramida (CERT), donde la CER será el precursor para la síntesis y degradación de los esfingolípidos para formar la S1P. (Palacios, 2009; Hernández-Coronado, 2016).

## **2. 2. Esfingosina-1-fosfato (S1P)**

### **2.2.1. Síntesis y estructura de Esfingosina 1- fosfato.**

Su estructura inicial es una base esfingoide de 18 carbonos, unida a un aminoalcohol, compuesta por un grupo amino en el carbono dos y dos grupos alcohol en el carbono uno y tres, siendo esta, la estructura de la esfingosina, sin embargo, cuando interactúa con la unión de un grupo fosfato en el carbono uno, este se esterifica con el grupo alcohol, formando S1P (Figura 1) (Devlin, 2019; González, 2021)

Como se mencionó anteriormente, es un metabolito bioactivo de los esfingolípidos, se crea a partir de la fosforilación de la esfingosina. La conversión de esfingosina en S1P es catalizada por la esfingosina quinasa (SK) (**Figura 1**) (Sukocheva y Wadham, 2014; Hernández-Coronado, 2016). En los mamíferos se han caracterizado dos isoformas de la SK: SK1 y SK2. El SK1 se localiza en el citosol, posee un dominio hidrofóbico transmembranal y responde a la activación por citocinas, hormonas (estradiol, FSH y hormona del crecimiento), factores de crecimiento y de supervivencia (Factor de crecimiento del endotelio vascular, factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento epidérmico) (Hernández-Coronado, 2016; González, 2021). Una vez activada es transportada a la membrana plasmática donde se lleva a cabo la fosforilación de la esfingosina, promoviendo la síntesis de S1P, así mismo, la inhibición de su actividad se ha relacionado con un descenso en la proliferación e inducción de apoptosis (Palacios, 2009). Por otro lado, la SK2 presenta cuatro dominios hidrofóbicos transmembranales y tiene una actividad opuesta al SK1, inhibiendo el crecimiento, y es por esto, que ha sido ampliamente estudiada en el área de la oncología (Sukocheva y Wadham, 2014; Hernández-Coronado, 2016; González, 2021).



**Figura 1.** Síntesis y estructura de la ceramida, esfingosina y esfingosina 1-fosfato. Figura tomada de Vettorazzi, 2019.

### **2.2.2. Inhibidores de la Esfingosina quinasa**

Como se mencionó anteriormente, la S1P ha recibido gran atención en los últimos años, debido a esto, se desarrollaron inhibidores análogos a la esfingosina e inhibidores no lipídicos; los primeros, no son muy empleados debido a la poca especificidad y la gran potencia que poseen, algunos de estos son: 1) Safingol, que inhibe una variedad de formas de la proteína quinasa C y la fosforilación de algunas vías de crecimiento. 2) DMS, inhibe CERK, SK1 y 2 haciendo difícil evaluarla acción de SK. Los inhibidores no lipídicos incluyen SKI-II, RB-005, PF-543 y SKI-178. PF-543, es mencionado como el inhibidor mas potente y específico, siendo hasta 300 veces mas selectivo para SK1 que para SK2, este inhibidor no aumenta las céramidas endógenas, sin embargo en células tumorales se ha visto que podría desempeñar una situación en que la célula sea independiente de la SK1 y permita la supervivencia y crecimiento con el objetivo de eliminar la SK1; por otro lado SKI-178, induce apoptosis actuando sobre ambas isoformas de SK (SK1 y 2), posee actividad citotóxica y como agente disruptor de la red de microtúbulos, promoviendo el arresto mitótico (Hengst *et al.*, 2017; Vettorazzi, 2019).

### **2.2.3. Función de la Esfingosina 1 fosfato**

La S1P, tiene un mecanismo de acción dual, por un lado, actúa como cofactor modificando las funciones intracelulares y, por otro lado, actúa extracelularmente, uniéndose a uno de sus 5 receptores acoplados a proteína G (Paradiso *et al.*, 2021). La S1P tiene un impacto en muchas condiciones fisiológicas y patológicas diferentes, incluidas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas función cardiovascular y reproductiva (Thuy *et al.*, 2014). En diversos tipos celulares se ha demostrado que es inductor del crecimiento y está implicado en procesos de resistencia a la apoptosis (Udovin, 2017). En el ovario, se ha observado que desempeña una acción protectora ante el estrés oxidativo y la radioterapia en las células de la granulosa y el ovocito (Hernández-Coronado *et al.*, 2016). Además, en cultivo primario de células de la granulosa, el receptor S1P1 y S1P3 se expresan en mayor medida (Paradiso *et al.*, 2021; González, 2021). Adicionalmente, se ha encontrado que los folículos atrésicos tienen una menor concentración de este a comparación de los folículos dominantes sanos (Hernández-Coronado *et al.*, 2015).

### **2.3. Células de la granulosa y el desarrollo de folículos antrales**

Los folículos, son la unidad fundamental del ovario, están implicados en procesos reproductivos y las fases del ciclo estral. El folículo ovárico antral, está formado por el ovocito, una cavidad llena de líquido compuesto por hormonas, minerales y proteínas y células foliculares (células de la granulosa y células de la teca) que son blanco de las gonadotropinas (Aerts y Bols, 2010<sup>a</sup>; Guzmán *et al.*, 2017). Las células de la granulosa son la estirpe celular que recubre la superficie interna de los folículos ováricos (CUN, 2022). Las células de la teca producen andrógenos (androstenediona y testosterona) a partir del colesterol al ser blanco principal de la Hormona Luteinizante (LH) y las células de la granulosa producen estrógenos (estradiol y estrona) a partir de la aromatización de los andrógenos en respuesta al estímulo generado por la Hormona folículo estimulante (FSH), Las células de la granulosa del folículo preovulatorio son el sitio principal de síntesis de estradiol (E2) donde estimula la división celular, induce la formación de uniones tipo GAP y la formación del antro folicular, la síntesis de receptores a estrógenos, y tiene un efecto antiatrético, además de provocar un efecto sinérgico entre las gonadotropinas,

promoviendo el crecimiento ovárico mediante la síntesis de receptores a FSH y LH, aumentando la actividad de la aromatasa, también inhibe la producción de andrógenos ováricos y con esto, la foliculogénesis (Barrios *et al.*, 2012; Guzmán *et al.*, 2017).

En términos generales, el crecimiento folicular consta básicamente de tres fases: reclutamiento inicial, reclutamiento cíclico, selección y dominancia (Galina y Valencia, 2008). El reclutamiento inicial, ocurre en folículos preantrales (folículos primordiales, primarios y secundarios), durante una etapa independiente de gonadotropinas, pero que depende de factores de crecimiento. Cuando el folículo secundario hace la transición a folículo terciario o antral, entra a la siguiente etapa donde las células foliculares son dependientes a gonadotropinas. (Peralta y Velázquez, 2013; Abramovich *et al.*, 2014; Motta *et al.*, 2011; Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007). Al alcanzar la madurez sexual e iniciar el ciclo estral, los folículos ováricos están en constante crecimiento y/o atresia (Galina y Valencia, 2008). El crecimiento folicular en esta etapa tiene tres fases: reclutamiento cíclico, selección y dominancia: 1) La fase de reclutamiento cíclico, tiene lugar en los folículos que tienen un tamaño de 2-4mm aproximadamente, y está regulada principalmente por el estímulo de FSH, Factores de crecimiento ligados a insulina (IGF), lo que promueve el crecimiento de los folículos por la esteroidogénesis ; 2) En la selección, los folículos de 5-6mm, comienzan a producir receptores a LH, así como su afinidad por esta hormona y a la progesterona (P4), lo que provoca que los folículos que no desarrollan esta respuesta sufran atresia y los que tienen una actividad y balance favorable continúen creciendo y 3) La fase de dominancia tiene lugar cuando los folículos que superaron la fase anterior tienen un tamaño aproximado de 10-18 mm, aquí el folículo dominante bloquea el soporte hormonal de los demás induciéndolos a atresia, debido que este propicia un feedback negativo de estradiol e inhibina provocando a la disminución de la FSH hipofisiaria, adicionalmente a los estímulos de la LH, en este proceso también intervienen los IGF I y II, que actúan como estimulantes de la esteroidogénesis junto con la inhibina y activina (Espinoza-Villavicencio *et al.*, 2007; Motta *et al.*, 2011; Smith, 2012; Quilaqueo, 2017; Duma, 2017).



### **2.3.1 Proliferación y supervivencia de células de la granulosa**

Tomando en cuenta lo anterior, los folículos primordiales rodeados por una capa de células de la granulosa están detenidos en la fase Go del ciclo celular, al dejar ese estado inician un crecimiento y proliferación lenta hasta que adquieren capacidad para responder a Gonadotropinas, esta exposición a FSH desencadena un aumento en la proliferación, promoviendo la mitosis (Monterde, 2014). Esto sucede cuando la FSH se une a un receptor asociado a proteína Gs activando la sub-unidad alfa para activar a la enzima adenilato ciclasa (AC), la cual, convertirá el ATP en AMPc que actúa como segundo mensajero para activar a la enzima cinasa A (PKA), es aquí donde parten diversos procesos intracelulares, ya que su regulación depende de múltiples factores como: la etapa del ciclo estral, concentración de receptores y ligandos, pero en general. 1) Inicia la vía ERK para fosforilar factores de transcripción y mediar la síntesis de ARNm para la posterior replicación de ADN. 2) Promueve el mantenimiento y regulación de la cromatina por la fosforilación de las histonas H3. 3) Activa la proteína quinasa Akt que promueve la expresión de ARNm para codificar un factor de transcripción que regula la síntesis del factor de crecimiento del endotelio vascular (Guzmán *et al.*, 2017; Ulloa-Aguirre, 2018; González, 2021). Por otro lado, las células de la granulosa pueden proliferar *in vitro* con la adición de diferentes factores de crecimiento y hormonas logrando ingresar a la fase S del ciclo celular (Amweng *et al.*, 2015); en cuanto a la supervivencia, se ha observado en diversos estudios que el selenio y la transferrina estimulan la supervivencia de CG en medios de cultivo adicionados con tratamientos hormonales incluso en tiempos prolongados (Rodríguez *et al.*, 2014). La prolactina, oxitocina e IFG (Factor de crecimiento similar a la insulina) son otros factores asociados al aumento de la supervivencia celular y al mejoramiento de la señalización intracelular por la transducción de señales; además la FSH al unirse su receptor acoplado a proteína G, promueve la activación de la PKA, la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3 quinasa (PI3K), Akt y quinasas extracelulares reguladas (ERK1/2), que regulan la supervivencia, apoptosis, crecimiento y diferenciación de las CG (Casillas, 2014; Ludwig *et al.*, 2023)

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Evaluar la importancia de S1P en la viabilidad de células de la granulosa de bovino en cultivo

#### **Objetivos particulares**

- Comprobar si la inhibición de SK1 afecta la producción de S1P en células de la granulosa de bovino en cultivo.
- Determinar si la inhibición de S1P reduce la viabilidad de células de la granulosa de bovino en cultivo.

### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4.3. Obtención de ovarios y aislamiento de células de la granulosa**

##### Obtención de ovarios

Se obtuvieron ovarios de bovino en un rastro privado ubicado en el municipio de Temamatla, Estado de México. Inmediatamente después del sacrificio fueron recolectados y colocados en solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% a 37°C, donde posteriormente se realizaron dos lavados con SSF limpia y fueron trasladados al Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, manteniendo la misma temperatura y en un periodo menor a 2 horas. Una vez en las instalaciones, se lavaron 5 veces con SSF limpia y se realizó un lavado rápido en etanol al 75%, para nuevamente colocarlos en SSF al 0.9% y medio McCoy's 5A modificado previamente temperado a 37°C en una estufa de cultivo (González, 2021; Hernández-Coronado, 2016).

##### Aislamiento de células de la granulosa

La disección se realizó en una campana de flujo laminar esterilizada y empleando cajas Petri estériles sobre placas de calentamiento, manteniendo así el medio y los ovarios a diseccionar a 37°C; se seleccionaron folículos no atrésicos de 4-7mm para posteriormente separarlos del estroma ovárico. Los folículos colectados se mantuvieron en medio McCoy's 5A modificado con bicarbonato de sodio (in vitro-ME-043) previamente gaseado y 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 (Gropen), 100 µL de testosterona (50µg/mL), 2.5 ug/ml transferrina (T8158-sigma) y 4 ng/mL de selenito (S5261-sigma), en ausencia de suero. A cada folículo se le retiro el líquido folicular y se expuso la cara interna del saco folicular, seguido de esto se hizo un ligero raspado para separar las células de la granulosa de la lámina basal. Todas las células obtenidas se colocaron en cajas Petri con medio McCoy's 5A modificado y suplementado para formar Pooles. Cada pool se colocó en un tubo 50mL pasando por un filtro de 70µm (Cell strainer FALCON a Corning Brand, 352350) para centrifugarse a 1800rpm durante 10 minutos con la intención de obtener el pellet de células; se adicionó DPBS 1X para eliminar la mayor cantidad de eritrocitos y nuevamente fue centrifugado como se describió anteriormente, finalmente se añadió al pellet medio McCoy's 5A modificado (López *et al.*, 2014; Hernández-Coronado, 2016; González, 2021).

#### Conteo celular

Se mezclaron 90µL de la suspensión celular con 10µL de Azul de tripán al 4%; esto se colocó sobre la cámara de Neubauer, para hacer el conteo de las células sin teñir en 5 cuadrantes de ambas cámaras. El cálculo de las células viables se realizó empleando la siguiente ecuación (González, 2021; Hernández-Coronado, 2016).

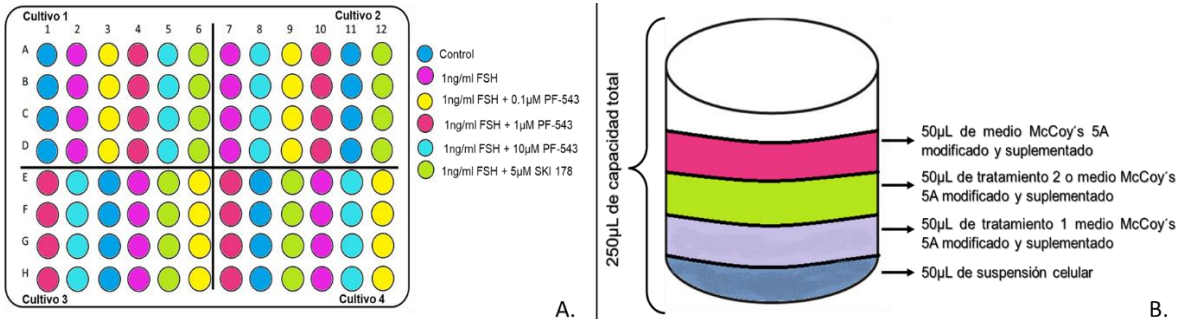
$$\text{Células viables} = \text{Promedio de las cámaras} \times 10,000 \times 5 \text{ cuadrantes} \times \text{Dilución}$$

#### **4.4. Cultivos de células de la granulosa**

Se realizaron 6 cultivos con 4 repeticiones por tratamiento. Antes de realizar el sembrado, se añadió a la placa de 96 pozos medio McCoy's 5A modificado y suplementado para ser pre-incubada durante tres horas a una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C y humedad de 90%. Se sembraron en cada pozo 75,000 células y se mantuvieron durante 24h en incubación para establecer las células al mismo ambiente y condiciones de cultivo.

Transcurrido este tiempo, se adicionaron los tratamientos: Control, 1ng/ml FSH, 5µM de SKI178 (Calbiochem; 567732) y 0.1, 1 y 10µM de PF543 (SIGMA; 20234)

ambos en presencia de 1ng/ml FSH, estos dos últimos actúan como inhibidor de la enzima SK1 (Figura 1). Al finalizar, la placa fue incubada en las condiciones anteriormente mencionadas durante 48 horas.



**Figura 1.** Esquematización de la organización de los tratamientos y cultivos en la placa de 96 pozos (A), así como la composición de los tratamientos y la cantidad medio McCoy's 5A modificado y suplementado en cada pozo (B), donde cada uno tiene capacidad de 300µL, sin embargo, se ajustaron a 200µL.

#### 4.5. Determinación del número de células viables mediante el ensayo MTT

Este ensayo está basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa transformándolo en formazán, lo que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas; donde la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido en la actividad metabólica (Acosta-Torres *et al.*, 2019).

Una vez transcurridas las 48h posteriores al cultivo, se retiró a cada pozo 180µL del medio y se adicionaron 20µL de la solución MTT (5 mg/mL de Tetrazolio-Sigma M5655), posteriormente se incubó en las mismas condiciones durante veinticuatro horas; pasado el tiempo, se agregó a cada pozo 100µL de buffer de lisis utilizando 5mL de agua destilada, 5mL de N-Dimetilformamida (D4551-sigma), 2 gramos de SDS (161-0301-50Biorad), 500 µL de ácido acético 1 N (9507-02- J. T. baker) y 500 µL de ácido clorhídrico 1 N; posteriormente las células se mantuvieron 4 horas en oscuridad a temperatura ambiente, al finalizar este periodo la placa se procesó en un espectrofotómetro a 595nm para obtener los datos de absorbancia, los cuales

fueron ordenados en una base de datos de Excel para determinar el número de células utilizando el programa Assay Zap 3.0.

#### **4.6. Ensayo de ELISA**

Los 180µL de medio retirados de la placa durante el ensayo MTT se añadieron a una nueva placa de 96 pozos manteniendo la organización de los tratamientos y cultivos, posteriormente se mantuvo en congelación a -80°C (Ultracongelador Revco ElitePlus). Las concentraciones de S1P se cuantificaron mediante la técnica de ELISA con el estuche comercial: Bovine Sphingosine 1-Phosphate ELISA Kit (S1P) (Mybiosource-San Diego, CA, MBS7264097). En la placa del ensayo se colocaron 100µL de los tratamientos por duplicado, para posteriormente agregar 10µL de la solución de balance, enseguida se añadieron 50µL de la solución de conjugado y se incubó a 37°C durante una hora; pasado este tiempo, se realizó el lavado de la placa añadiendo la solución de lavado y dando golpes a la placa contra una toalla de papel, hasta que quedara totalmente seca; al terminar el lavado se añadieron 50µL de sustrato A y Sustrato B para nuevamente mantenerla incubada a 37°C durante 15-20 minutos; al terminar el tiempo se añadieron 50µL de solución Stop. Finalmente se leyó la placa en un espectrofotómetro a 450nm.

#### **4.7. Análisis estadístico**

El efecto de los inhibidores de SK1 (SKI178 y PF543) y la gonadotropina FSH sobre la viabilidad y concentraciones de S1P en células de la granulosa de bovino se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando los tratamientos como efecto fijo y los pozos anidados en los cultivos como efecto aleatorio, mientras que las diferencias entre cada tratamiento se determinaron mediante pruebas de contraste octagonal.

### **5. ACTIVIDADES REALIZADAS**

Durante los seis meses de servicio social, apoyé en diversas actividades relacionadas con el funcionamiento del laboratorio; realicé prácticas de pipeteo y disección de folículos, simuladores de cultivo celular y recambio de medio utilizando agarosa, agua potable y medio; participé en visitas al rastro para obtener los ovarios y trasladarlos a la universidad, también apoyé durante los ensayos ELISA para

determinar las concentraciones de S1P e hice ensayos MTT, de estos últimos obtuve los resultados para determinar el número de células viables y la concentración de S1P que ordené para tener una base de datos en Excel. Por otro lado, pero sin restarle importancia, participé en actividades relacionadas con la limpieza, orden y administración del laboratorio.

## **6. METAS ALCANZADAS**

En este periodo se alcanzaron las metas propuestas: Realicé 4 visitas al rastro para obtener las muestras biológicas, participé en 20 cultivos de células de la granulosa y teca de bovino, realicé dos ensayos MTT y apoyé en 30 para estimar el número de células de la granulosa viables, se hicieron dos ensayos ELISA para determinar S1P; además, para este informe y para mi formación durante el servicio social consulté aproximadamente 30 fuentes, entre artículos, libros y videos.

## **7. RESULTADOS Y CONCLUSIÓN**

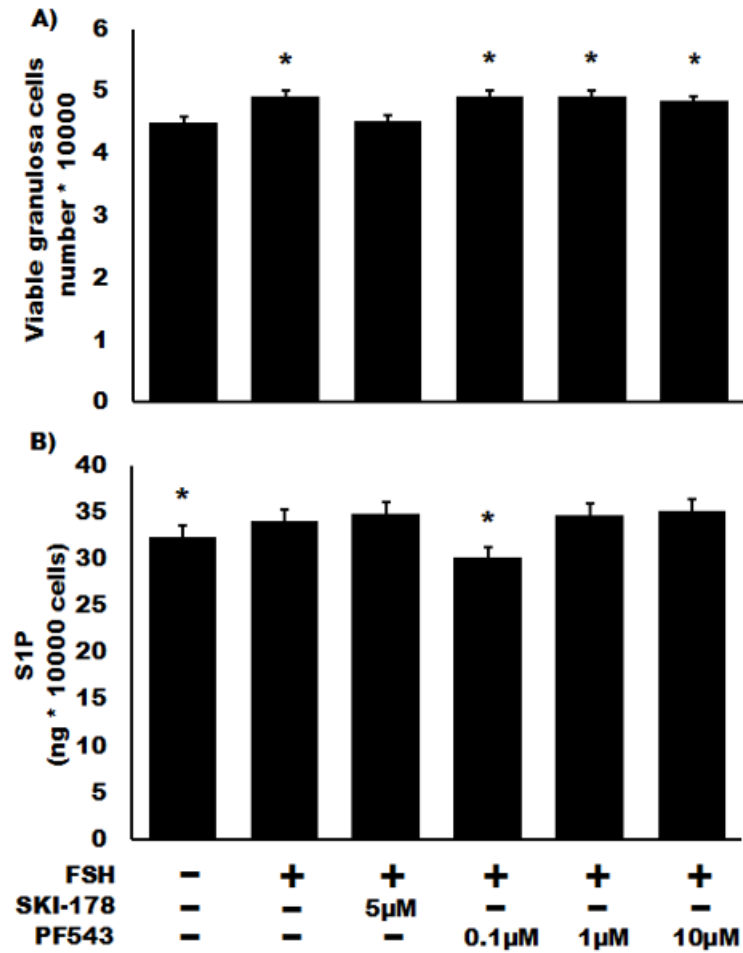
### ***La S1P favorece la viabilidad de células de la granulosa de bovino en cultivo***

Los resultados del presente servicio social mostraron que la FSH (1ng/ml) incrementa el número de células de la granulosa viables en cultivo respecto al grupo control ( $P < 0.05$ ) (Figura 2A). Mientras que, el uso del inhibidor SKI178 (5 $\mu$ M) + 1ng/ml FSH redujo la viabilidad de células de la granulosa comparado con FSH ( $P > 0.05$ ) (Figura 2A). En contraste, el uso del inhibidor PF543 (0.1, 1 y 10 $\mu$ M) en presencia de 1ng/ml FSH también incrementó la viabilidad de células de la granulosa. Estos resultados sugieren que S1P favorece la viabilidad de células de la granulosa de bovino en cultivo sin embargo hay contradicciones entre el inhibidor SKI178 y el PF543.

### ***La FSH estimula la síntesis de S1P en células de la granulosa de bovino en cultivo.***

Los resultados indican que el uso de 1ng/ml FSH incrementó la producción de S1P en células de la granulosa respecto al grupo control similar al tratamiento SKI178 (5 $\mu$ M) + 1ng/ml FSH ( $P < 0.05$ ) (Figura 2B). En contraste, el inhibidor PF543 (0.1 $\mu$ M) en presencia de 1ng/ml FSH redujo la producción de S1P comparado con el tratamiento 1ng/ml FSH y 1 y 10 $\mu$ M de PF543. En este experimento, el uso de 1 y

10 $\mu$ M de PF543 + 1ng/ml FSH incrementaron la concentración de S1P en células de la granulosa comparado con el control (P>0.05) (Figura 2B).



**Figura 2.** Número de células de la granulosa viables en los distintos tratamientos a 48h de incubación **(A)** concentración de S1P en el medio de cultivo de células de la granulosa en presencia de FSH sola o con inhibidores de la SK1, donde \* representa diferencias significativas (P<0.05) entre los tratamientos **(B)**.

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados de este informe de servicio social indicaron que la FSH estimula la síntesis de S1P en células de la granulosa de bovino en cultivo, sin embargo, únicamente el inhibidor PF543 fue efectivo para inhibir la síntesis de S1P. Adicionalmente, S1P favorece la viabilidad de células de la granulosa de bovino en cultivo, pero estos efectos sólo fueron evidentes con el uso del inhibidor SKI-178.

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 (Guzmán *et al.*, 2017; Ludwig *et al.*, 2023). 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. En la actualidad, existen otras moléculas encargadas de favorecer estos mismos efectos biológicos, tal es el caso de los esfingolípidos bioactivos como esfingosina, ceramida, ceramida 1-fosfato y S1P (Udovin, 2017). Este último esfingolípido ha despertado mucho interés en la investigación por ser una molécula que actúa como segundo mensajero para regular procesos biológicos como la proliferación, sobrevivencia y esteroidogénesis de manera intracelular y extracelular en diversos tejidos (Guo *et al.*, 2014). Hernández-Coronado *et al.* (2016) demostraron que cuando se adiciona FSH y en menor medida al medio de células de la granulosa en cultivo, incrementa la SK1 fosforilada y la concentración de S1P respecto a los niveles detectados en el grupo control. Además, en folículos de ratón se observó que la adición de 1UI/mL FSH disminuyó el número de folículos atrésicos e incrementó la concentración de S1P (Tian-Yuan, 2020). De manera similar, nuestros resultados mostraron que FSH incrementa la producción de S1P en células de la granulosa de bovino en cultivo, lo cual parece indicar que S1P es un mediador para los efectos tróficos de esta gonadotropina.

El mecanismo de acción de S1P implica que por un lado, se une a su receptor acoplado a proteína G y de forma intracelular actúa como segundo mensajero activando enzimas, proteínas u otras moléculas, como E3 ubiquitina ligasa TRAF2, donde la S1P actúa como cofactor activando la transcripción de NK- $\kappa$ B, un factor nuclear que desencadena distintas vías de señalización implicadas procesos de



supervivencia, favoreciendo el aumento de la transcripción de enzimas antioxidantes, inhibiendo la apoptosis y promoviendo la viabilidad celular (Echeverri y Mockus, 2008; González, 2021). Con estas evidencias y con los resultados mencionados, consideramos que de esta manera FSH, estimula la síntesis de S1P y de manera intracelular actúa este esfingolípido para favorecer la viabilidad de células de la granulosa en cultivo.

La formación de S1P depende del catabolismo de Cer ya sea a partir de la síntesis de novo o por la vía de esfingomielina (Martínez-Morales *et al.*, 2021). El punto crucial en su producción depende de la fosforilación de la esfingosina. Existen 2 isoenzimas de SK (esfingosina cinasa 1 y 2, SK1 y SK2) encargadas de llevar a cabo este proceso. La SK1 por su localización en el citosol, es la principal enzima implicada en la síntesis de S1P, a diferencia de la SK2, tiene afinidad únicamente por esfingosinas D-erythro como sustrato (Cannavo *et al.*, 2017; Díaz *et al.*, 2021). Por esta razón y por las funciones que orquesta S1P en las células, hoy en día existen una gran cantidad de inhibidores en el mercado que tienen como propósito reducir la concentración de este esfingolípido.

En este servicio social, se emplearon 2 inhibidores, el PF543, un inhibidor competitivo de la esfingosina evitando la acción con 100 veces mayor afinidad a SK1 que a SK2 y no tiene acción dual, es por esto, que actualmente es considerado como el inhibidor más potente de la SK1 (Schnute *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Hamada *et al.*, 2017). Y el inhibidor SKI-178, que a diferencia del otro inhibidor tiene una acción dual, por un lado, evita la acción de SK1 y por el otro actúa como disruptor de la red de microtúbulos. La apoptosis inducida por SKI-178 surge de una interacción sinérgica de la inhibición de S1P y de los microtúbulos y con ello lleva a la célula a arresto mitótico (Hengst *et al.*, 2017). Los resultados de este servicio social indicaron que el uso del inhibidor SKI178 (5 $\mu$ M) + 1ng/ml FSH redujo la viabilidad de células de la granulosa comparado con FSH. En contraste, el uso del inhibidor PF543 (0.1, 1 y 10 $\mu$ M) en presencia de 1ng/ml FSH también incrementó la viabilidad de células de la granulosa. Interesantemente, el inhibidor PF543 (0.1 $\mu$ M) en presencia de 1ng/ml FSH redujo la producción de S1P comparado con el

tratamiento 1ng/ml FSH y 1 y 10 $\mu$ M de PF543. Las evidencias remarcadas con los inhibidores y los resultados, coinciden en el hecho de que muy probablemente, el inhibidor PF543, actúa exclusivamente sobre la reducción en la síntesis de S1P, mientras que al afectarse la viabilidad únicamente con el inhibidor SK1-178, hace referencia a la acción dual antes mencionada. Sin embargo, es necesario continuar investigando estos efectos para elegir el inhibidor que sea más adecuado para las necesidades del investigador.

## 9. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar más cultivos, sobre todo porque aun cuando el análisis estadístico indica que FSH estimula la síntesis de S1P y la viabilidad de células de la granulosa, debería ser más evidente, probablemente la potencia de la hormona haya disminuido y por eso se enmascare el efecto esperado. Sumado a lo mencionado, para evaluar el efecto del inhibidor, consideramos que adicionar ambos inhibidores solos sin la presencia de FSH podría ayudar a evaluar de manera más precisa la inhibición de SK1 y con ello la producción de S1P y la viabilidad de células de la granulosa en cultivo.

## 10. REFERENCIAS

- Abramovich, D. N., Irusta, G., Parborell, M. F. A. (2014). Foliculogénesis. El ovulo como paciente. *Ascune*. 23-36.
- Acosta-Torres, L., Arenas-Arocena, M.C., García-Contreras, R., Rodríguez-Torres, M.P. (2019). Manual para la enseñanza práctica del ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas. Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Aerts, J. M. J., Bols, P. E. J. (2010a). Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(1), 180–187.

- Amweg, A. N., Rodriguez, F. M., Marelli, B. E., Gareis, N. C., Salvetti, N. R., Ortega, H. H., Rey, F. (2015). Optimización de cultivos de células de la granulosa a partir de folículos ováricos bovinos. III Jornada de difusión de la investigación y extensión. *Salud Animal*. 5: 12-18.
- Barrios, D. J., Aguirre, C. A., Crespo, A. F. (2012). Desarrollo folicular en el ovario. *Revista salud Quintana Roo*.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1823(2), 439-450.
- Clínica Universidad de Navarra. (2022). Célula de la granulosa. Diccionario médico.
- Cannavo, A., Liccardo, D., Komici, K., Corbi, G., De Lucia, C., Femminella, G. D., Elía, A., Bencivenga, L., Ferrara, N., Koch, W. J., Paolocci, N., Rengo, G. (2017). Sphingosine Kinases and Sphingosine 1-Phosphate Receptors: Signaling and Actions in the Cardiovascular System. *Frontiers in Pharmacology*, 8
- Casillas, A. M. (2014). Efecto de las células del cúmulo en la viabilidad, maduración, fertilización y desarrollo embrionario después de la vitrificación de ovocitos inmaduros porcinos in vitro. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Dai, L., Wang, C., Song, K., Wang, W., Di, W. (2021). Activation of SphK1 by adipocytes mediates epithelial ovarian cancer cell proliferation. *Journal of Ovarian Research*, 14(1), 1-8.
- Devlin, T. M. (2019). Bioquímica con aplicaciones clínicas. Reverté
- Díaz, E. R., McCullough, L. D., Tsvetkov, S. A. (2021). The Functional role of Sphingosine Kinase 2. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8.

- Duma Pauta José Mauricio. (2017). Dinámica folicular y cambios ováricos y hormonales durante el ciclo estral de la vaca. [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=lgIRIBeVxtg>
- Echeverri, N. P., Mockus, I. (2008). Factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B): Signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer. *Revista de la Facultad de Medicina*, 56(2), 133-146.
- Espinoza-Vilavicencio, J. L., Ortega, P. R., Palacios, E. A., Valencia., M. J., Aréchiga, F. C. (2007) Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos: Una revisión. *Interciencia*, 32(2), 93–99.
- Galina, C., Valencia, J. (2008). Reproducción de animales domésticos. Tercera edición. Limusa. México.
- González, A. D. (2021). La esfingosina 1-fosfato (s1p) como mediador de los efectos biológicos de la hormona folículoestimulante (FSH) en células de la granulosa de bovino. Maestría en biología de la reproducción animal. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Guo, L., Ou, X., Li, H., Han, Z. (2014). Roles of sphingosine-1-phosphate in reproduction. *Reproductive Sciences*, 21(5), 550-554.
- Guzmán, S. A., Rosales, A. M., Hernández, C. G. (2017). Hormonas que regulan la reproducción, mecanismo de acción. Editorial académica española.
- Hamada, M., Kameyama, H., Iwai, S., Yura, Y. (2017). Induction of autophagy by sphingosine kinase 1 inhibitor PF-543 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cell Death Discovery*. 3(17047).
- Hengst, J. A., Dick, T. E., Sharma, A., Doi, K., Hegde, S., Tan S., Geffert, L. M., Fox, T. E., Sharma, A. K., Desai, D., Amin, S., Kester, M., Loughran, T. P., Paulson, R. F., Claxton, D. F., Wang, H., Yun, J. K. (2017). SKI-178: A Multitargeted Inhibitor of Sphingosine Kinase

and Microtubule Dynamics Demonstrating Therapeutic Efficacy in Acute Myeloid Leukemia Models. *Cancer Transl Med.* 3(4): 109-121.

Hernández-Coronado, C. G., Guzmán, A., Castillo-Juárez, H., Zamora-Gutiérrez, D., Rosales-Torres, A. M. (2019). Sphingosine-1-phosphate (S1P) in ovarian physiology and disease. *Annales d'Endocrinologie*, 80(5), 263–272.

Hernández-Coronado, C. G. (2016). Moduladores de la producción de S1P y efectos de este esfingolípido sobre la proliferación y sobrevivencia de células de la granulosa de bovino. Doctorado en ciencias agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana.

Hernández-Coronado, C. G., Guzmán, A., Rodríguez, A., Mondragón, J. A., Romano, M. C., Gutiérrez C. G., Rosales-Torres, A. M. (2016). Sphingosine-1-phosphate, regulated by FSH and VEGF, stimulates granulosa cell proliferation. *General and Comparative Endocrinology*. 236: 1-8.

Hernández-Coronado, 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: An International Journal of Animal Bioscience*, 9(2), 308–312.

Leclercq, T. M., & Pitson, S. M. (2006). Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate. *IUBMB life*, 58(8), 467-472.

Lin, J. X., Jia, Y. D., Zhang, C. Q. (2011). Effect of epidermal growth factor on follicle-stimulating hormone-induced proliferation of granulosa cells from chicken prehierarchical follicles. *Journal of Zhejiang University Science B*, 12(11), 875.

López C. A., Tarazona, M. A., Giraldo, E. C., Lenis, S. Y., Mesa, P. C., Olivera, A. M. (2014). Capítulo 3. Cultivo de células del tracto reproductivo de la hembra bovina. Cultivo de tejidos reproductivos

y producción y manipulación de embriones bovinos. Universidad de Antioquía. Primera edición.

Ludwig, C. L. M., Bohleber, S., Lapp, R., Rebl, A., Wirth, E. K., Langhammer, M., Michaelis, M. (2023). Alterations in gonadotropin, apoptotic and metabolic pathways in granulosa cells warrant superior fertility of the Dummerstorf high fertility mouse line 1. *Journal of Ovarian Research*, 16(1), 1-16.

Martínez-Morales, J. C., García-Sáinz, J. A., Romero-Ávila, M. T. (2022). The S1P1 receptor for sphingosine 1-phosphate: advances in the understanding of its structure, function and biological importance. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24(1).

Monterde, E. M. (2014). Modulación de expresión génica y proteica de los receptores de FSH y de andrógenos en las células foliculares en pacientes con baja respuesta ovárica debida a la preparación folicular. Universidad de Valencia.

Motta, D. P. A., Ramos, C. N., González, S. C., Castro, R. C. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *vet.zootec.* 5(2): 88-99, 2011.

MyBioSorce. Bovine Sphingosine 1 phosphate (SGP1).

Palacios, E. (2009). Función de los esfingolípidos en la señalización celular. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.

Paradiso, E., Lazzaretti, C., Sperduti, S., Antoniani, F., Fornari, G., Brigante, G., Rocco, G. D., Tagliavini, S., Trenti, T., Morini, D., Immacolata, A., Villani, M. T., Nofer, J., Simoni, M., Poti, F., Casarini, L. (2021). Sphingosine-1 phosphate induces cAMP/PKA-independent phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) in granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 520, 111082.

- Peralta, D. I., Velázquez, P. N. (2013). Foliculogénesis: Camino hacia la sobrevivencia o la muerte celular. *Revista de educación bioquímica*. 32 (4): 128-136.
- Quilaqueo, L. L. (2017). Efecto de FSH sobre las células de la granulosa humana cultivadas en condiciones hiperinsulínicas e hiperandrogénicas. Maestría en biología de la reproducción. Universidad de Chile.
- Rodríguez, F. M., Salvetti, N. R., Ortega, H. H., Rey, F. (2014) Evaluación de diferentes suplementos en un sistema de cultivo de células de la granulosa bovinas.
- Schnute, M. E., McReynolds, M. D., Kasten, T., Yates, M., Jerome, G., Rains, J. W., Hall, T., Chrencik, J., Kraus, M., Cronin, C. N., Saabye, M., Highkin, M. K., Broadus, R., Ogawa, S., Cukyne, K., Zawadzke, L. E., Peterkin, V., Iyanar, K., Scholten, J. A., Wendling, J., Fujiwara, H., Nemirovskiy, O., Wittwer, A. J., Nagiec, M. M. (2012) Modulation of cellular S1P levels with a novel, potent and specific inhibitor of sphingosine kinase-1. *Biochem*. 444 (1): 79–88.
- Smith, O. F., Ogunsola, A. A., Ladokun, A. O., Ajadi, T. A., Onagbesan, O. M. (2012). Synergistic effects of insulin-like growth factor (igf-ii) and fsh on bovine granulosa cells. *Archivos de zootecnia*. 61(234):305-308.
- Sterin-Speziale, N., Leocata, N. F. (2007). Los esfingolípidos en la muerte y proliferación celular. *Química Viva*. 6 (3): 112-138.
- Sukocheva, O., Wadham, C. (2014). Role of sphingolipids in oestrogen signalling in breast cancer cells: an update. *Journal of Endocrinology*, 220(3), 25-35.
- Thuy, A. V., Reimann, C. M., Hemdan, N. Y. A., Gräler, M. H. (2014). Esfingosina 1-fosfato en la sangre: función, metabolismo y destino. *Fisiología celular y bioquímica*. 34: 158-171.

- Tian-Yuan, Yang Yanzhou., Qin Tian., Yu Xiaoli., Wang Yanrong., Pei Xiuying (2020). Efectos de la FSH combinada con la intervención de S1P en la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y la conexina durante la vitrificación de ovarios de ratón. *Journal of Ningxia Universidad Médica*, 42(4), 325-331.
- Udovin L. D. (2017). Participación del metabolismo de los esfingolípidos en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Doctorado en Biología celular y molecular. Universidad de Buenos Aires.
- Ulloa-Aguirre, A., Reiter, E., & Crepieux, P. (2018). FSH receptor signaling: complexity of interactions and signal diversity. *Endocrinology*, 159(8), 3020-3035.
- Vettorazzi, M. C. (2019). Estudio Teorico-Experimental en la búsqueda de nuevos inhibidores de pequeño tamaño molecular de Esfingosina Quinasa 1 (sphk1). Universidad Nacional de San Luis.
- Wang, J., Knapp, S., Pyne, N. J., Pyne, S., Elkins, J. M. (2014). Crystal Structure of Sphingosine Kinase 1 with PF-543. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 5(12): 1329-1333.