



Sección de Biología
Universidad de La Laguna

**Estudio del estrés oxidativo en células de la granulosa
humanas.**

Study of the oxidative stress in human granulosa cells

Trabajo de Fin de Grado

Andrea Otazo Pérez

Tutorizado por Julio T. Ávila Marrero y Rita Marleny Martín Ramírez

Grado en Biología. Julio 2019

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Estructura y ciclo ovárico.....	1
1.2 El rol del estrés oxidativo en la pérdida de fertilidad.....	3
1.3 Origen del estrés oxidativo y mecanismos de defensa y reparación.....	6
1.4 La importancia del entorno folicular en el envejecimiento.....	8
1.5 Patologías en infertilidad.....	9
2. Objetivos.....	10
3. Material y métodos.....	11
3.1 Pacientes.....	11
3.2 Purificación de células de la granulosa humana a partir de líquido folicular.....	11
3.3 Cultivo y tratamiento de las células de la granulosa humana.....	12
3.4 Precipitación de ADN.....	13
3.5 Dot-Blot.....	13
3.6 Cuantificación de productos oxidantes.....	14
3.7 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario.....	15
3.8 PCR a tiempo real cuantitativa (q-RT-PCR).....	16
4. Resultados.....	18
4.1 Cuantificación de productos oxidantes.....	18
4.2 Dot-Blot.....	19
4.3 Análisis de la expresión genética de enzimas de respuesta al estrés oxidativo.....	21
5. Discusión.....	25
5.1 Cuantificación de productos oxidantes.....	25
5.2 Análisis del daño al ADN.....	25
5.3 Expresión genética de enzimas de respuesta al estrés oxidativo.....	26
6. Conclusiones.....	27

Resumen

Debido al aumento en la edad de la maternidad durante estas últimas décadas la infertilidad femenina ha aumentado de forma significativa y, para desarrollar terapias eficaces contra este problema es fundamental conocer primero los factores moleculares que producen el envejecimiento y la pérdida de funcionalidad en el ovario y su entorno. Gran parte de ellos, se deben al aumento del estrés oxidativo y la pérdida de capacidad para mantener el equilibrio oxidante a nivel celular, tanto en el ovocito como en las células de su entorno. Por ello, en este estudio se llevaron a cabo varios métodos en los que se trató de inducir estrés oxidativo a células de la granulosa humana, y tratar de observar y cuantificar los daños que esto produjo en el ADN, mediante Dot-blot, y la respuesta enzimática que se desarrolló en la célula, mediante PCR al tiempo real cuantitativa (qRT-PCR), estudiando así el nivel de eficacia de estas células en la defensa y reparación ante el estrés oxidativo. Los resultados obtenidos indican que el método para inducir oxidación en la célula fue efectivo, y que las células de la granulosa son incapaces de reparar el ADN ante cierta cantidad de estrés oxidativo. Además, se observó una respuesta enzimática efectiva cuando la exposición al oxidante no era demasiado elevada, mientras que a mayor exposición la respuesta defensiva disminuía.

Abstract

With to the motherhood age increase in last decades, the female infertility has been significantly increased and, to develop effective therapies against this problem, it is essential to know first the molecular factors that produce the aging and functionality loss in the ovary and its environment. Many of them are due to the cellular oxidative stress increase and the ability to maintain the oxidant balance at cellular level, both in the oocyte and in its environment. For that, in this research several methods were carried out, in which it was tried to induce oxidative stress at human granulose cells, and try to observe and quantify the damages that this caused in DNA, by means of Dot-Blot, and analyzed the enzymatic response that developed at cells, by means of quantitative real time PCR (qRT-PCR), studying the effectiveness of these cells to defend and repair the oxidative stress. The obtained results indicate that the method to induce cellular oxidation was effective, and that the granulosa cells are unable to repair DNA before a certain amount of oxidative stress. In addition, an effective enzymatic response was observed when the oxidant exposure was not too high, while at higher exposure the response decreased.

1.Introducción

El estilo de vida de las mujeres ha cambiado a lo largo de las últimas décadas, pasando a tener un rol más activo en la vida laboral y el desarrollo de una carrera profesional. Esta nueva situación ha traído como resultado que la maternidad sea una cuestión que se pospone en el tiempo, hasta que las condiciones de trabajo y estabilidad puedan ser compatibles con la crianza de un hijo. Es por ello que, en los últimos años, y como consecuencia del paso de importantes crisis económicas, la media de edad a la que las mujeres quedan embarazadas de su primer hijo ha aumentado de forma significativa [1]. En algunos países, como en España, esta edad se estima entre los 30 y los 31, la segunda más elevada de la Unión Europea [2]. Esta tendencia supone grandes inconvenientes a nivel biológico, puesto que, a partir de los 35 años la probabilidad de encontrar problemas durante la búsqueda del embarazo aumenta en más de un 30% [3]. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de conocer e investigar algunos factores de la fertilidad femenina que se han pasado por alto en numerosas investigaciones, como los fundamentos moleculares del microambiente ovárico, y el estudio de los factores que pueden aumentar la prevalencia de disfunciones y envejecimiento a nivel celular y metabólico.

1.1 Estructura y ciclo ovárico.

El ovario es una glándula situada a cada lado del útero, cuya función principal es la de producir las hormonas sexuales en el aparato reproductor femenino. Su capa más externa está formada por tejido conjuntivo y recibe el nombre de corteza. Es en ella donde se localizan los folículos, encargados de la producción de hormonas y la regulación y mantenimiento del ovocito. La parte más interna se conoce como médula y contiene los principales vasos sanguíneos y nervios que irrigan la glándula.

Los folículos son agrupaciones de células epiteliales que rodean a un oocito y que, a medida que maduran su morfología se va modificando. En la corteza se pueden encontrar los folículos en distinto estado de desarrollo. Durante su etapa más inmadura, el oocito se sitúa en el centro de la agrupación de células epiteliales, y a medida que se produce la maduración poco a poco va siendo desplazado hacia un lado debido al crecimiento de una cavidad o matriz interior llena de líquido llamada antral. En ese punto el folículo pasa a denominarse folículo de antral o de Graaf (*Figura 1*). En cuanto a las células que rodean al oocito, éstas van diferenciándose en distintos tipos celulares:

- Células de la teca: Encargadas de la producción de andrógenos.
- Células de la granulosa (CG): Encargadas de la activación de distintas enzimas necesarias para la esteroidogénesis (proceso de síntesis de hormonas esteroideas). Estas células se

diferenciarán en la etapa final de maduración en otros dos tipos, las células de la granulosa mural y las células cúmulo, que rodean al oocito y forman el complejo cúmulo-oocito [4]

Cada folículo está rodeado por una membrana basal, una lámina de matriz extracelular que separa el folículo interno de las células de la teca [4].

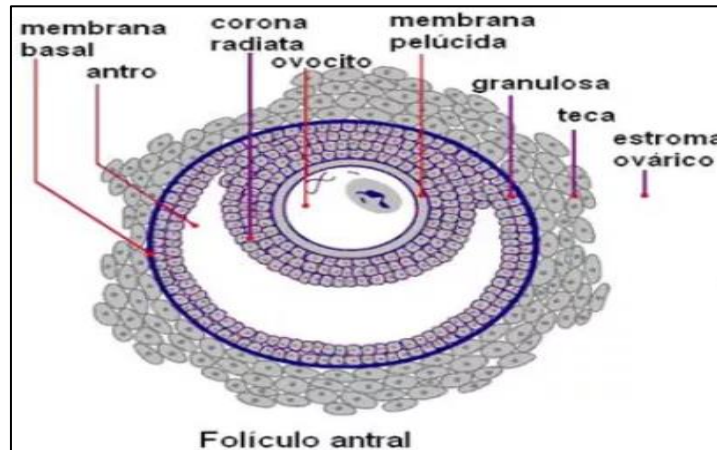


Figura 1. Morfología de un folículo maduro o de Graaf. A.F Tresguerres, Jesús, Castillo, Carmen. (2010). *Estructura microscópica del ovario*. [Figura]. Recuperado de: www.tes.com

El ciclo ovárico está comprendido por la fase folicular y la fase lútea. En la fase folicular las células de la teca de los folículos primarios se encuentran produciendo una gran cantidad de andrógenos, por influencia de elevados niveles de LH en la hipófisis, que van a ser liberados hacia el antro (*Figura 2*). Estas hormonas van a ser transportadas hacia el interior de las células de la granulosa, donde la enzima aromatasa va a transformar los andrógenos en estradiol. El aumento en la producción de estrógenos conlleva, a su vez, una mayor tasa de proliferación en las células de la granulosa y de la teca, por lo que los folículos primarios comienzan a crecer. También tiene lugar un proceso de retroalimentación positiva entre el ovario y la vía hipotálamo-hipofisaria, en la que la alta concentración de estrógeno favorece la producción de GnRH en el hipotálamo, hormona responsable de la generación de FSH y LH en la hipófisis, por lo que aumenta aún más la producción y conversión de testosterona en estrógenos. A medida que este proceso sucede, el folículo de mayor tamaño se diferencia como dominante. Este presenta el doble de vascularización que el resto y un mayor número de receptores de FSH, lo que supone un aumento de sensibilidad a esta hormona, favoreciendo una actividad aromatasa mantenida. Además, este folículo sintetiza una gran cantidad de inhibina, capaz de frenar la producción de FSH en la hipófisis, provocando que el resto de los folículos vean disminuida su actividad aromatasa y por tanto su tamaño, entrando en un proceso de degeneración conocido como atresia.

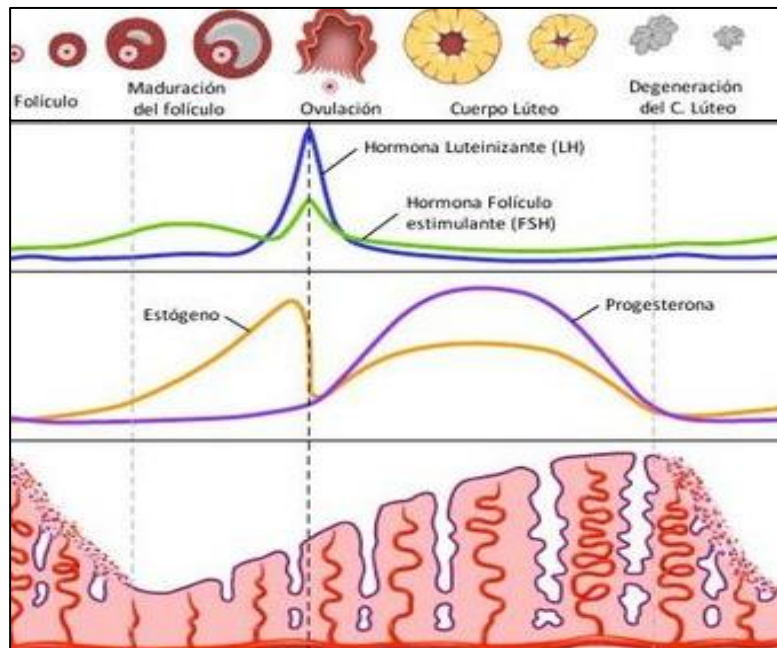


Figura 2. El ciclo ovárico. Representación de la variación en el nivel de hormonas hipofisarias y ováricas y los cambios a nivel estructural en los folículos durante el ciclo.

La fase lútea comienza cuando se ha liberado el oocito del folículo dominante y el nivel de hormonas hipofisarias cae bruscamente. El resto del folículo comienza a actuar como una glándula endocrina productora de progesterona, estrógenos e inhibina. Esta última va a mantener en el tiempo la inhibición de la FSH y la LH, impidiendo el desarrollo de nuevos folículos. Si no se produce la fecundación, el cuerpo lúteo degenera en el corpus albicans, que ya no es capaz de producir hormonas y el ciclo comienza de nuevo. Este proceso de competición de los folículos es determinante para asegurar la producción de un solo cigoto a la vez, favoreciendo tanto la supervivencia de la madre como un mejor cuidado del descendiente, además de servir a modo de proceso de selección, en el que el folículo mejor dotado será el único capaz de liberar su oocito durante la ovulación.

1.2 El rol del estrés oxidativo en la pérdida de fertilidad.

A medida que pasan los años, la reserva de folículos en los ovarios va decreciendo, y junto a ella las probabilidades de embarazo [5]. A partir de los 37 años, la fertilidad de las mujeres comienza a disminuir de forma acusada. Tras alcanzar los 40 años comienza el periodo infértil, que culmina a los 50 con la pérdida del ciclo menstrual en un periodo denominado menopausia (*Figura 3*).

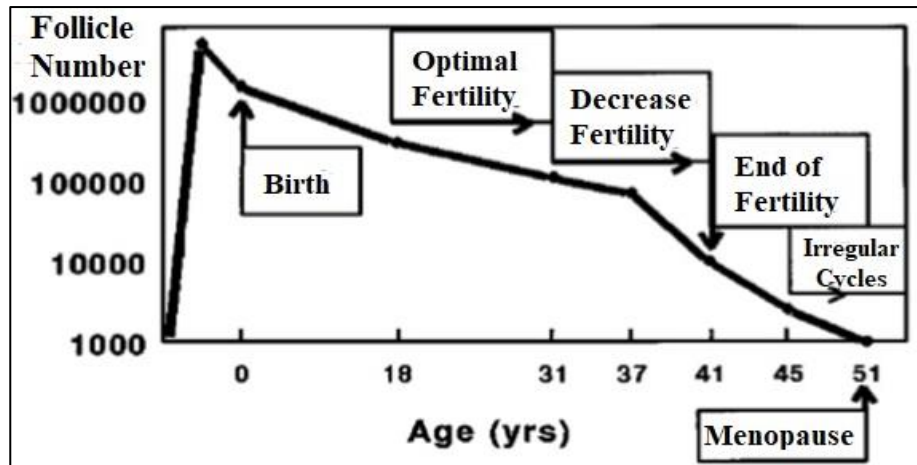


Figura 3. Decrecimiento del número de folículos en el tiempo y sus correspondientes eventos reproductivos.
 Velde, Egbert, L.Pearson, Peter. (2002). *The variability of female reproductive ageing* [Figura].

Durante la cuarta década de vida de la mujer, la cantidad de folículos en el ovario aún es suficiente como para mantener los niveles hormonales normales y, por tanto, el ciclo menstrual [5]; por ello los factores que desencadenan el fin del periodo fértil son todavía foco de numerosas investigaciones. Algunas evidencias apuntan a que el acusado decrecimiento de la fertilidad a esa edad se debe sobre todo a defectos a nivel celular, en especial a la producción de ovocitos con aneuploidías, que originarían un cigoto con anomalías cariotípicas [6]. Este tipo de cigotos son eliminados por el organismo de la madre en fases tempranas en prácticamente la mayoría de los casos [3]. Una prueba de ello es el considerable aumento de la incidencia de síndrome de Down en hijos de mujeres mayores de 35 años, y en la alta proporción de abortos espontáneos (el 80%) de embriones con trisomía 21 [3]. Es posible que estos fallos estén causados no sólo por la disminución del número de folículos, sino por la pérdida de competencia entre folículos debido a una peor calidad del proceso de selección del folículo dominante mediante atresia [7]. A medida que aumenta la edad de las mujeres la tasa de supervivencia de los folículos aumenta, dando lugar a una peor calidad general de estos y a frecuentes ovulaciones múltiples [3,5].

Esta disminución del número de folículos que degeneran por atresia se debe, en gran medida al aumento en el nivel de FSH que se experimenta con la edad [3,8]. Esta elevación está muy relacionada con alteraciones de la producción de proteínas encargadas de la modulación de hormonas de la vía hipotálamo-hipófisis-ovario por parte de las células foliculares, en especial las de la granulosa. Los factores que más se han podido relacionar con este desajuste son la disminución de producción de inhibina A y B y el incremento de activina-A [3]. Todos estos datos apuntan a que una de las principales causas de la pérdida de fertilidad casi una década antes del agotamiento folicular son los daños y alteraciones a nivel celular tanto en las células foliculares como en el ovocito.

El envejecimiento celular conlleva fallos a nivel metabólico en la célula, y está ampliamente relacionados con la presencia de estrés oxidativo en el medio [7,9]. Éste está causado por la presencia excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), compuestos muy reactivos que contienen moléculas de oxígeno con uno o dos electrones desapareados en su orbital externo, por lo que se trata de compuestos muy inestables que tienden a oxidar o reducir otras macromoléculas como lípidos, ácidos nucleicos o proteínas [4]. El estrés oxidativo es también responsable de otros defectos celulares como la distribución anormal de las mitocondrias, fallos en los mecanismos de regulación redox, anomalías en la organización de los microtúbulos, alteraciones durante la formación del huso mitótico y la alineación de los cromosomas [4,8].

Algunas de las especies reactivas de oxígeno más conocidas son los radicales superóxidos aniónicos, los radicales hidroxilos y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último es el producto oxidante más estudiado puesto que se encuentra en la naturaleza con frecuencia, por ello es usado frecuentemente para reproducir modelos de estrés oxidativo en las células. Se trata de una molécula capaz de difundir libremente a través de las membranas celulares, interaccionando con radicales libres de oxígeno (O^\cdot) para formar radicales hidroxilos, que pueden extraer átomos del ADN y ARN, causando graves alteraciones como la modificación de las bases nitrogenadas a sus formas oxidadas. La base nitrogenada que se oxida con más facilidad es la guanina, que puede dar lugar a 8-oxoguanina [8,9]. Esta base modificada posee en su estructura un doble enlace con una molécula de oxígeno, lo que produce alteraciones durante la síntesis de ADN, apareándose con la adenina en lugar de con la citocina (*Figura 4*). Otras formas oxidadas de guanina son la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina y guanidina. H_2O_2 también es el producto oxidante más relacionado con alteraciones en la concentración de calcio intracelular [8].

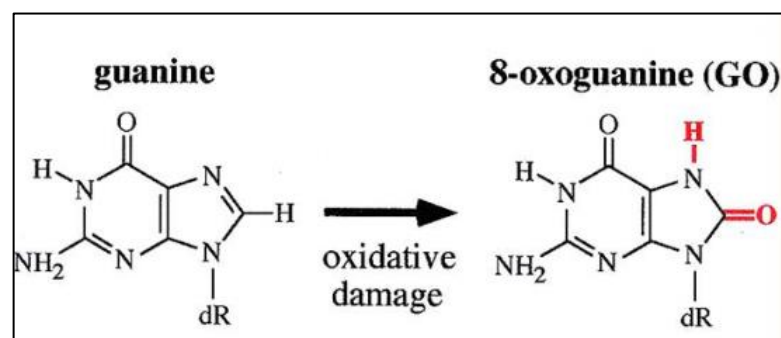


Figura 4. Oxidación de la guanina a 8-oxoguanina. Recuperado de: <http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org>

Por todo esto puede deducirse que la presencia excesiva de ROS en un medio tan activo metabólicamente como el ambiente folicular puede contribuir a procesos de mutación y alteraciones

del ADN mitocondrial y nuclear (mediante la alteración de ácidos nucleicos) en el oocito, así como a la oxidación de proteínas, que terminan por alterar sus funciones, e incluso puede desencadenar un cambio en la composición de los lípidos de membrana, originando desajustes en los canales transportadores y causando un incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} [8,10]. El exceso de este ión en el citoplasma representa un problema que puede poner en riesgo la viabilidad del oocito maduro, ya que la liberación de Ca^{2+} es la señal que permite la finalización de la meiosis y el comienzo del desarrollo embrionario tras la fecundación [10].

Aunque en otros tejidos los daños causados por el peróxido de hidrógeno no son notables hasta que se alcanzan concentraciones elevadas (aproximadamente $100 \mu\text{M}$), se ha observado que una exposición continuada a H_2O_2 , incluso a pequeñas cantidades, conlleva notables alteraciones funcionales y estructurales en el ambiente folicular [8]. Además, las alteraciones producidas durante la formación del huso mitótico podrían ser una de las causas de la mayor incidencia de oocitos con aneuploidías en ovarios envejecidos [4,8].

1.3 Origen del estrés oxidativo y mecanismos de defensa y reparación.

Las especies oxidantes se producen principalmente a partir de la fuga de electrones de la membrana mitocondrial durante la fosforilación oxidativa y la generación de ATP. Estos electrones producen radicales superóxidos (O^-) altamente inestables que terminan por formar H_2O_2 (Figura 5). ROS también pueden originarse en los sistemas NADPH oxidasa de la membrana celular y, en tejidos productores de estrógenos como el ovario, puesto que la enzima citocromo P450 (fundamental en la síntesis de estas hormonas) es una fuente común de ROS [8,10].

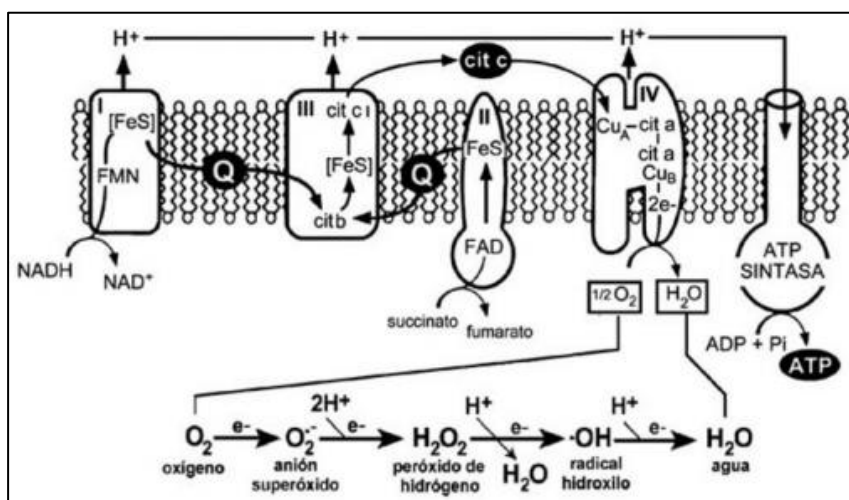


Figura 5. Fuga de electrones de la cadena transportadora mitocondrial y posterior generación de ROS. Recuperado de: http://portal.uned.es/portal/page?_pageid=93,25140344&_dad=portal&_schema=PORTAL

Aunque la presencia de estas especies es inevitable y natural, puesto que actúan como señal del inicio de la maduración folicular, es su superproducción lo que conlleva los riesgos mencionados en el apartado anterior [4].

Otro factor fundamental en el desbalance de ROS es la alteración de las defensas antioxidantes a nivel celular.

Los antioxidantes pueden clasificarse como enzimáticos y no enzimáticos. Los primeros suelen ser moléculas de bajo peso entre las que tienen especial relevancia la vitamina C o ácido ascórbico, la vitamina E (tocoferol) y algunos carotenoides como el β -caroteno y el glutatión (GSH) [11]. Entre los antioxidantes enzimáticos se encuentra la enzima superóxido dismutasa (SOD), que reacciona con radicales superóxidos aniónicos formando H_2O_2 . También existen enzimas como la catalasa, que reducen el peróxido a agua [8,11]. Otras tienen funciones más específicas y relacionadas con la reparación de las estructuras celulares cuando éstas ya han resultado dañadas, como la familia aldehído deshidrogenasa (ALDH) que cataliza, en ácidos grasos, la oxidación de grupos aldehído resultantes de la peroxidación de los lípidos [12]. Mientras que el déficit de antioxidantes no enzimáticos está estrechamente relacionado con la dieta, para el desbalance en la síntesis de enzimas antioxidantes las causas no se conocen con exactitud [11].

Cuando se produce el aumento de ROS en la célula, se pone en marcha el mecanismo de defensa, que consiste en el aumento de la transcripción de enzimas antioxidantes (SOD, CAT) que reducirán estos productos a moléculas menos reactivas. La reacción que llevan a cabo cada una de estas enzimas se muestra en la *Figura 6*. Cuando el estrés oxidativo es excesivo, y se han producido daños por oxidación en algunas estructuras celulares aumenta la expresión de enzimas reparadoras como ALDH. Los lípidos son, junto con el ADN, una de las macromoléculas que más se ven afectados por la peroxidación.

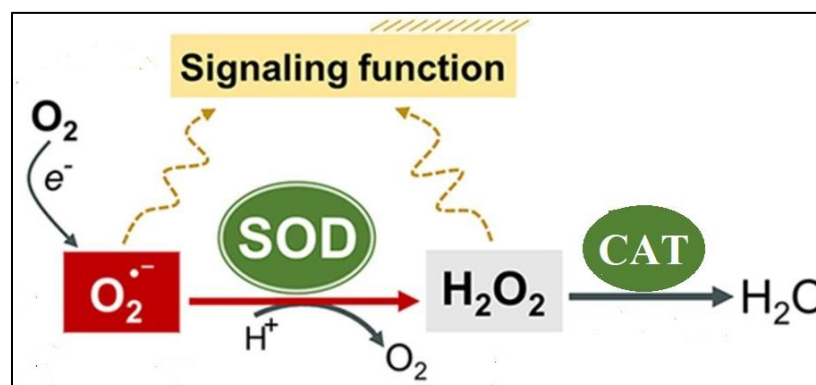


Figura 6. Degradación de ROS mediada por las enzimas SOD y CAT. Ying, Wang, Branicky, Robyn, Noë, Alycia. (2018). *Reactions and transformations of the superoxide anion*. [Figura]

1.4 La importancia del entorno folicular en el envejecimiento.

Las células foliculares presentan una estrecha relación tanto física como metabólica con los ovocitos a lo largo de todo su proceso de maduración, y al contrario que éste, son capaces de regenerarse por lo que se encuentran en una proporción mucho mayor en los ovarios femeninos. El ambiente folicular tiene como función proteger y regular el proceso de oogénesis, manteniendo la integridad de los mecanismos hormonales y protegiendo al oocito de moléculas perjudiciales como ROS, puesto que actúa como una barrera física y aporta defensas antioxidantes. Por ello, el envejecimiento del ovario no sólo está relacionado con el aumento de producción de ROS, sino también con la pérdida de la viabilidad y funcionabilidad de las células foliculares [10]. Uno de los principales reguladores del equilibrio antioxidantes/ROS es el líquido folicular, que incluso modifica su concentración de ciertas enzimas como SOD, disminuyendo a medida que aumenta la talla folicular [4].

Sin embargo, de todas las estructuras foliculares, probablemente la que guarda una relación más directa con el oocito son las células de la granulosa especializadas o células cúmulo, ya que están íntimamente conectadas con él mediante uniones Gap y adherentes en el complejo cúmulo-oocito (*Figura 7*), y le proveen de metabolitos esenciales, además de participar en la regulación del progreso de meiosis mediante señales paracrinas [4,13]. Las células cúmulo además modulan la transcripción genética en el oocito y son responsables de la síntesis de inhibina y activina, proteínas que como ya se mencionó juegan un papel de gran importancia en la regulación hormonal durante la ovulación y en la selección del folículo dominante, y cuya alteración da lugar al desarrollo de folículos de peor calidad [3,4].

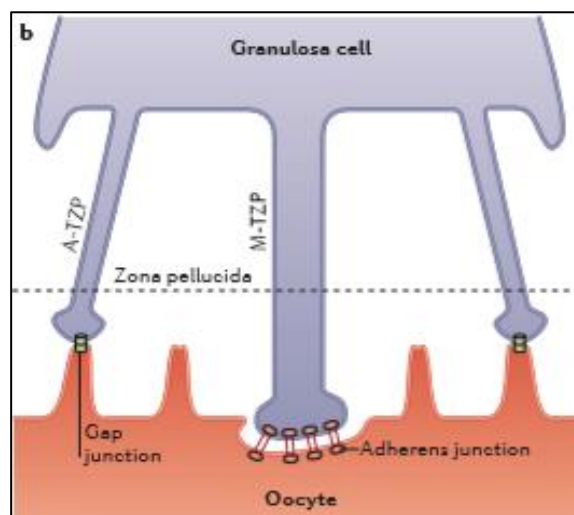


Figura 7. Mecanismos de unión y comunicación entre las células de la granulosa y el oocito. Li, Rong, F.Albertini, David. (2013). *Follicle development and interaction of the oocyte with somatic cells*. [Figura]

El estudio de las células y matriz folicular es tan importante como el del propio oocito, puesto que los fallos en los mecanismos de protección, comunicación y regulación hormonal de las células y matriz

están estrechamente relacionados con defectos y alteraciones en el ovocito, que conducen a su envejecimiento celular y finalmente la pérdida de fertilidad en la mujer. Por ello, las células de la granulosa, presentes en abundancia en el fluido folicular extraído a mujeres durante procesos de reproducción asistida, y que son desechadas en la mayoría de los casos, pueden resultar un gran modelo de estudio en análisis de cuestiones fisiológicas y metabólicas generales del ovario.

1.5 Patologías en infertilidad.

Aunque la edad es la principal causa de problemas de infertilidad femenina hay ciertas patologías que no están necesariamente relacionadas con este factor y que cada vez son más comunes, por ejemplo, la denominada baja respuesta ovárica (PR) [14]. Esta condición se caracteriza por la obtención de un reducido número de ovocitos tras la estimulación ovárica hormonal, y presenta una incidencia de entre el 9 y el 25% [14]. Esta patología está asociada con una disminución de la reserva folicular y un envejecimiento prematuro que conlleva una mala calidad ovocitaria. Las causas aún no se conocen con exactitud, pero se asocia con determinadas anomalías durante el desarrollo fetal y con una peor calidad en las células de la granulosa [15].

Otra patología muy frecuente es el síndrome de ovarios poliquísticos (PCOS), que se caracteriza por un desajuste en los niveles hormonales del ovario, dando como resultado anomalías en el ciclo ovárico e incluso la ausencia de ovulación. Esta patología se ha relacionado tanto con factores ambientales y genéticos como con la presencia de estrés oxidativo excesivo, además de con la producción elevada de hormona antimulleriana (inhibidora del desarrollo folicular) en las células de la granulosa [16].

Además de las patologías ováricas otros factores pueden causar infertilidad en mujeres, por ejemplo, la endometriosis, que consiste en la producción de tejido endometrial fuera del útero. Sin embargo, la relación que existe entre esta condición y la infertilidad aún no se ha logrado explicar [17].

2. Objetivos

Se han hallado numerosas evidencias de la relación entre el estrés oxidativo y los daños celulares en el entorno ovárico, que podrían elevar el riesgo de infertilidad. Además, se ha puesto de manifiesto la eficacia de las células foliculares como reflejo de la calidad ovocitaria. Por ello, los objetivos planteados para este trabajo son los siguientes:

- Desarrollar una metodología capaz de inducir cuantitativamente distintos niveles de estrés oxidativo en cultivos de células de la granulosa humana.
- Analizar y cuantificar los daños producidos en el ADN tras la inducción de estrés oxidativo.
- Estudiar la eficacia de los mecanismos de defensa y reparación enzimáticos ante la presencia de estrés oxidativo.
- Comparar el estado oxidativo de las células de la granulosa de pacientes con distintas patologías relacionadas con la infertilidad.

3. Material y Métodos.

3.1 Pacientes.

El presente estudio se llevó a cabo usando células de la granulosa humana (CGH) obtenidas a partir de líquido folicular extraído a tres mujeres donantes de ovocitos, cuyo rango de edad se encuentra entre 18 y 29 años. La ovulación fue inducida empleando una combinación de FSH recombinante (rFSH Gonal F) y LH recombinante (rLH Luveris), con una dosis que varió en función de la respuesta de cada paciente, y posteriormente, los ovocitos fueron recuperados por aspiración transvaginal en una intervención realizada por personal cualificado del Centro de Asistencia a la Reproducción Humana de Canarias, que colaboró con esta investigación. De la misma forma, se obtuvieron células de la granulosa de una paciente diagnosticada con Baja Respuesta Ovárica (PR), de una paciente en la que no se ha encontrado ningún factor ovárico relacionado con infertilidad (NOF), cuyo rango de edad está comprendido entre los 29 y los 39 años, y una paciente mayor de 40 años. El tratamiento que recibieron las muestras extraídas siguió un protocolo que cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de La Laguna. Además, se contó con el consentimiento firmado de las pacientes, cuyos datos permanecieron codificados en todo momento.

3.2 Purificación de células de la granulosa humana a partir de líquido folicular.

Con cada muestra de líquido folicular se llevó a cabo un protocolo de purificación de células de la granulosa. Fue necesario realizar este procedimiento puesto que en el líquido folicular abundan otros tipos celulares, principalmente eritrocitos, leucocitos y células epiteliales, que suponen un obstáculo para establecer cultivos celulares, ya pueden impedir la adherencia de las CGH a la placa de cultivo.

El protocolo de purificación se basa principalmente en la separación por densidad, empleando Percoll, en las muestras, que previamente han sido sometidas a lavados mediante centrifugaciones sucesivas de 10 minutos a 1500 rpm, haciendo uso de Isolatium Medium (10% Medium 199 (Sigma); 3,7g/L Bicarbonato sódico; 59mg/L Penicilina; 0,1g/L Estreptomina; 5,6mg/L Anfotericina B; 0,29 g/L L-Glutamina; 1% Albumina de suero bovino).

Posteriormente se añadió a las muestras un volumen de Percoll al 45% (GE Healthcare), y se centrifugó durante 30 minutos a 1700 rpm, para separar los hematíes (que precipitan) de los leucocitos y las células de la granulosa (que quedan suspendidas en una interfase). Tras la centrifugación recupera la interfase y se resuspende en Tampón Fosfato Salino (PBS) 1x 0,1% BSA.

Posteriormente los leucocitos fueron eliminados mediante la incubación con Dynabeads M-450 CD45 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los Dynabeads contienen un anticuerpo contra el antígeno CD45, expresado en todas las células sanguíneas con núcleo, por lo que los leucocitos quedan unidos a estas partículas de forma específica. Además, los Dynabeads son compuestos magnéticos, que precipitan en presencia de un imán, arrastrando con ellos a los leucocitos.

Por último, se llevó a cabo el recuento de CGH viables obtenidas tras el protocolo de purificación mediante tinción con Trypan Blue (Sigma), que sólo es capaz de atravesar la membrana porosa de las células muertas, y se llevó a cabo el conteo de las CG viables haciendo uso de una Cámara de Neubauer y un microscopio óptico (Olympus).

3.3 Cultivo y tratamiento de las células de la granulosa humana (CGH).

Se pretende estudiar el efecto que causan distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las células de la granulosa humana, tanto de forma inmediata como transcurridas 24 horas tras la exposición, y evaluar si los daños celulares se acumulan y potencian con el tiempo, o si por el contrario las células son capaces de repararse.

Para este ensayo se emplearon CGH purificadas de una donante. Se cultivaron tres pocillos en cuatro placas multipocillos, con 150000 células en cada uno, empleando como medio de cultivo MCoy5A Complementado (Sigma). Posteriormente se incubaron todas las placas a $37^\circ C$ y 5% de CO_2 durante 24 horas con el fin de establecer el cultivo.

Tras el tiempo de incubación se trataron las células con H_2O_2 para inducir estrés oxidativo en ellas. En cada placa dos de los cultivos fueron sometidos durante 20 minutos a una concentración de 25 y $50\mu M$ de H_2O_2 , mientras que los controles fueron tratados con H_2O_{mq} .

En los cultivos de dos de las multiplacas se pretendía observar el daño celular sufrido de forma inmediata a la exposición a H_2O_2 por lo que, pasados los 20 minutos de incubación, las células se levantaron por rascado, se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos y se almacenaron a $-80^\circ C$. Estos fueron nombrados como cultivos de 24 horas de incubación. Las alícuotas obtenidas de una de las dos placas fueron empleadas posteriormente para llevar a cabo la detección del daño al ADN mediante dot-blot, que permitiría estudiar los posibles daños a nivel de ADN, y con los de la segunda placa se trató de medir el nivel de transcripción de enzimas relacionadas con la defensa y reparación ante estrés oxidativo mediante una qRT-PCR.

En las dos multiplacas restantes se llevó a cabo un cambio de medio para eliminar el H_2O_2 y se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación durante 24 horas más, para poder estudiar, la

capacidad de recuperación celular a nivel de daño al ADN y transcripción de enzimas, pasadas 24 horas tras la exposición al estrés oxidante. Estos fueron nombrados como cultivos de 48 horas de incubación.

También se llevaron a cabo cultivos celulares en una placa multipocillo de 96, añadiendo 100.000 células por pocillo. Se incubaron durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ y oscuridad, para posteriormente llevar a cabo el protocolo recogido en el apartado 3.6.

3.4 Precipitación de ADN.

Para poder estudiar los posibles daños al ADN causados durante la incubación con peróxido se llevó a cabo un método de precipitación con etanol del ADN extraído de las células del ensayo anterior, tanto las que se recogieron inmediatamente como las que permanecieron 24 horas en cultivo tras el tratamiento.

Para llevar a cabo la extracción de ADN se dejaron descongelar las alícuotas de CGH y se les añadió buffer de lisis (10mM Tris pH8.0; 10mM EDTA pH 8.0; 0,1M NaCl; 2% SDS) y proteinasa K (0,4 mg/ml), permaneciendo en incubación durante 15 minutos a 56°C. Tras este proceso las membranas celulares quedan lisadas y las proteínas degradadas.

Posteriormente se añade NaCl hasta llegar a una concentración de 0,2M, se añaden dos volúmenes de EtOH 100% a 0°C y se dejan incubar las muestras a -80°C durante 20 minutos.

Pasado ese tiempo se recupera el ADN por centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm. Por último, se añaden dos volúmenes de EtOH 70% frío, se centrifuga de nuevo, se elimina el sobrenadante y se mantienen las muestras a temperatura ambiente hasta que se evaporen los restos de etanol que puedan haber quedado en los tubos junto con el pellet de ADN. Finalmente, éste se resuspende en H₂O_{mq} y se mantiene a 4°C durante aproximadamente 24 horas para que el ADN termine de resuspender.

3.5 Dot-Blot.

Para estudiar los posibles daños en el ADN causados por el tratamiento con H₂O₂ se llevó a cabo un Dot-blot con el ADN extraído de los cultivos celulares de una de las multiplacas de 24 y 48 horas de incubación. En el Dot-blot se empleó como primario al anticuerpo monoclonal de ratón 8-OHdG 15A3 (Santa Cruz Biotechnology), que reconoce específicamente a las moléculas 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, 8-hidroxi-guanina y 8-hidroxi-guanosina, formas oxidadas de guanina.

Para asegurar que el ensayo fuera llevado a cabo por encima de los niveles de sensibilidad durante el revelado, las muestras cargadas debían tener un mínimo de 1 µg de ADN. Por ello, primero se

cuantificó el ADN empleando un espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), y se prepararon diluciones en las que todas las muestras tuvieran la misma cantidad de ADN, y que esta fuera igual o superior a 1 µg. Posteriormente éstas se cargaron en una membrana de nylon con carga positiva (Roche), previamente humedecida con una solución 2X de Buffer SSC (3M NaCl; 0,3M Citrato de sodio), empleando para ello un sistema colector de hibridación Dot-blot (Thermo Fisher Scientific) conectado a una bomba de vacío.

La membrana fue sometida a Crosslink UV mediante un crosslinker (UVP CL-1000 ultraviolet crosslinker) a 120000 microjulios para fijar la unión del ADN. Posteriormente la membrana fue bloqueada para evitar la unión de otros elementos a los cationes libres, para ello se mantuvo durante una hora en agitación en una solución de TBST (2,4g Tris base; 8,8g NaCl en 1L de agua a pH 7,6 obtenido con 12N HCl; 0,1% Tween20) + 5% Leche desnatada en polvo (NDFM).

Tras el tiempo de bloqueo se añadió el anticuerpo primario (8-OHdG) a una concentración de 1:200 en TBST+NDFM y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche en agitación.

Posteriormente se llevaron a cabo sucesivos lavados de la membrana con TBST y se añadió el anticuerpo secundario (Antimouse IgG peroxidasa, Sigma) a una concentración de 1:5000 en 10%TBST+NDFM, y se incubó en agitación, a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 45 minutos. Por último, se llevaron a cabo de nuevo 3 lavados de 10 minutos con TBST.

La membrana fue revelada con el kit Immobilon Western (Chemiluminiscent HRP Substrate, Milipore), mezclando Luminol Reagen y Peroxidase Solution 1:1 y siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se obtuvo una imagen del revelado en el Chemidoc XRS (BioRad).

3.6 Cuantificación de productos oxidantes.

Se llevó a cabo la cuantificación de productos oxidantes a nivel citoplasmático en células de la granulosa humanas para estudiar la eficacia del tratamiento con H₂O₂ produciendo estrés oxidativo, puesto que el resto de las metodologías seguidas consistieron en el análisis de daños y respuestas celulares producidos ante este estrés oxidativo inducido. Este ensayo se llevó a cabo con células de la granulosa de una donante, empleando el Kit DCFDA/ H₂DCFDA – Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay (Abcam) como indica el fabricante.

En la placa multipocillo se trató al dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo, puesto que es la solución en la que se encuentra disuelto el marcador 2,7-diclorofluorescina diacetato (DCFDA) en el momento de la lectura de la fluorescencia. Por otro lado, el control se llevó a cabo con células a las que no se aplicó ningún tratamiento. También se añadió hidroperóxido de terc-butilo (TBHP) a algunos pocillos,

un oxidante empleado por recomendación del fabricante para verificar la eficacia del ensayo, que se usó a 50 y 250 μM . El tratamiento con H_2O_2 consistió en la adición de una concentración creciente de éste (0, 10, 25 y 50 μM) a diferentes pocillos. Por cada una de estas condiciones se llevaron a cabo tres repeticiones que se marcaron con una concentración de 25 μM de 2,7-diclorofluorescina diacetato (DCFDA), y otras tres que se marcaron con una de 45 μM .

DCFDA es un compuesto que se oxida en presencia de ROS, perdiendo dos grupos acetato para dar lugar a 2,7-diclorofluorescina (DCF), una molécula de alta fluorescencia detectable a 495 nm mediante espectrofotometría. Al añadir una segunda concentración de este marcador se pretendía comprobar si con 25 μM se sobrepasaba la saturación, impidiendo el revelado de la totalidad de ROS. Además, se rellenaron pocillos extra con células que no fueron teñidas con DCFDA para distinguir la señal de fondo que éstas producen por defecto. La distribución exacta de las condiciones del ensayo en la placa multipocillo se muestran en la *Tabla 1*.

25 μM DCFDA	DMSO	Control	TBHP 50 μM	TBHP 250 μM
	0 μM H_2O_2	10 μM H_2O_2	25 μM H_2O_2	50 μM H_2O_2
50 μM DCFDA	DMSO	Control	TBHP 50 μM	TBHP 250 μM
	0 μM H_2O_2	10 μM H_2O_2	25 μM H_2O_2	50 μM H_2O_2
No teñidas	C.NT	C.NT	C.NT	C.NT
	C.NT	C.NT	C.NT	C.NT

Tabla 1. Distribución de las condiciones del ensayo en la placa multipocillo. DMSO: dimetilsulfóxido. Control: células sin ningún tratamiento. TBHP: hidroperóxido de terc-butilo. El color azul muestra la primera réplica del ensayo, marcada con 25 μM de DCFDA, y el rojo la segunda, marcada con 50 μM DCFDA. C.NT: células que no fueron teñidas con DCFDA.

La emisión de fluorescencia fue medida a 495 nm con un espectrofotómetro lector de multiplacas.

3.7 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc).

Se extrajo el ARN mensajero (ARNm) total presente en células de la granulosa de una donante, previamente tratadas con H_2O_2 , y en células sin tratar de una paciente con baja respuesta ovárica (PR), una paciente sin factor ovárico (NOF), una paciente mayor de 40 años (>40) y una donante.

Para realizar la extracción se empleó el AurumTM Total RNA Mini Kit (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se llevó a cabo la síntesis de ADNc a partir del ARN extraído, empleando el iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad).

La obtención de ADNc fue necesaria puesto que con estas muestras se pretendía detectar y medir la expresión de genes relacionados con enzimas de protección y reparación ante el estrés oxidativo mediante PCR.

3.8 PCR a tiempo real semi-cuantitativa (qRT-PCR).

Se llevó a cabo una qRT-PCR puesto que se trata de un método más sensible que la PCR convencional. Con esto se trató de observar la expresión de genes que codifican para enzimas relacionadas con la respuesta a ROS, sino también tratar de cuantificar el nivel de transcripción. De esta forma se pretende comparar la respuesta celular, a nivel de síntesis enzimática, que se desarrolla en las células de la granulosa humana inmediatamente después de ser tratadas con H₂O₂ y tras un periodo de 24 horas de incubación después del estrés. Además, también se trató de comparar cuantitativamente la expresión de estos genes en células de la granulosa no sometidas a estrés oxidativo, tanto en pacientes como en donantes, para estudiar la actividad reparadora y protectora ante ROS que estas células presentan de forma natural y observar si hay relación con la edad de las pacientes y con su tipo de patología.

Los genes que se analizaron fueron los que codifican para la catalasa (CAT), superóxido dismutasa 1 (SOD1), aldehído deshidrogenasa 3A2 (ALDH3A2) y la β-actina (empleado como control para cuantificar la expresión del resto). La qRT-PCR se llevó a cabo empleando ADNc molde de cada muestra, EVA GREEN, la mezcla de primers reverse y forward para cada gen y H₂O_{mq}. Los primers empleados se muestran en la *Tabla 2*.

Gen	Primer	Secuencia (5' → 3')	T _m (°C)
β-actina	Act -F	CTTCCTTCCTGGGCATGG	61,6
	Act-R	GCCGCCAGACAGCACTGT	63,7
ALDH	GDV-27F	GCCTATATTCAGCCACAGC	57,4
	GDV-27R	ATAATCACAGCATTTCCTGC	55,5
SOD1	HSOD1-F	GATCTCACTCTCAGGAGACC	53,6
	HSOD1-R	CCCAATTACACCACAAGC	54,8
CAT	HCAT-F	TTAATCCATTCGATCTCACC	55,0
	HCAT-R	GCTATCTGTTCAACCTCAGC	55,1

Tabla 2. Secuencia y T_m de los primers empleados para cada gen durante la qRT-PCR. Los primers fueron diseñados con el software Omiga.

Para la amplificación se empleó el termociclador y el software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad), el perfil térmico empleado consistió en la desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de PCR a 95°C durante 10 segundos, a 59°C durante 20 segundos y a 72°C durante 15 segundos.

Por último, se llevó a cabo un aumento de 65°C hasta 95°C con una rampa de 0,1°C por segundo, tomando una lectura cada 0,5°C.

Por último, se obtuvo la expresión relativa de cada gen mediante la fórmula: $2^{\Delta Ct} * 1000$, siendo ΔCt la diferencia entre el umbral de ciclo (Ct) de la actina y de la del gen estudiado [18].

4. Resultados

4.1 Cuantificación de productos oxidantes.

Como muestran los valores de fluorescencia recogidos en la *Tabla 3* y representados en la *Figura 8*, cuanto mayor es la concentración de H₂O₂ con la que se trataron las células, mayor presencia de ROS a nivel intracelular se observa, puesto que se oxida más cantidad de DCFDA a DCF. Sin embargo, esto solo se pone de manifiesto en la réplica que fue marcada con 45 µM del fluorescente ya que, en la que se empleó una concentración menor, no se observa ninguna tendencia concreta. Además, entre las muestras sin tratar y las que se incubaron con 10 µM H₂O₂ no se aprecian diferencias en los valores de absorbancia.

	Fluorescencia (nm)			
25 µM DCFDA	DMSO	Control	TBHP 50 µM	TBHP 250 µM
	29721	77387	83293	75993
	0 µM H ₂ O ₂	10 µM H ₂ O ₂	25 µM H ₂ O ₂	50 µM H ₂ O ₂
	57540	57290	81536	72554
45 µM DCFDA	DMSO	Control	TBHP 50 µM	TBHP 250 µM
	27340	27340	338125	599141
	0 µM H ₂ O ₂	10 µM H ₂ O ₂	25 µM H ₂ O ₂	50 µM H ₂ O ₂
	75740	74392	99142	117332
Células no teñidas	31445			

Tabla 3. Valores de emisión de fluorescencia obtenidos para cada condición en el ensayo de cuantificación de productos oxidantes. TBHP es el control positivo recomendado por el fabricante, DMSO el vehículo y el control células sin tratamiento.

En la *Figura 9* se muestra que, ante el mismo tratamiento con TBHP, la señal obtenida si se emplean 45µM de DCFDA es mucho más elevada que con 25µM. Por otro lado, tanto en las muestras tratadas con H₂O₂ como con TBHP se obtuvieron unos valores de fluorescencia superiores a los que produjeron las propias células y el vehículo por defecto, lo que indica que estas sustancias logran causar un aumento de productos oxidantes a nivel intracelular.

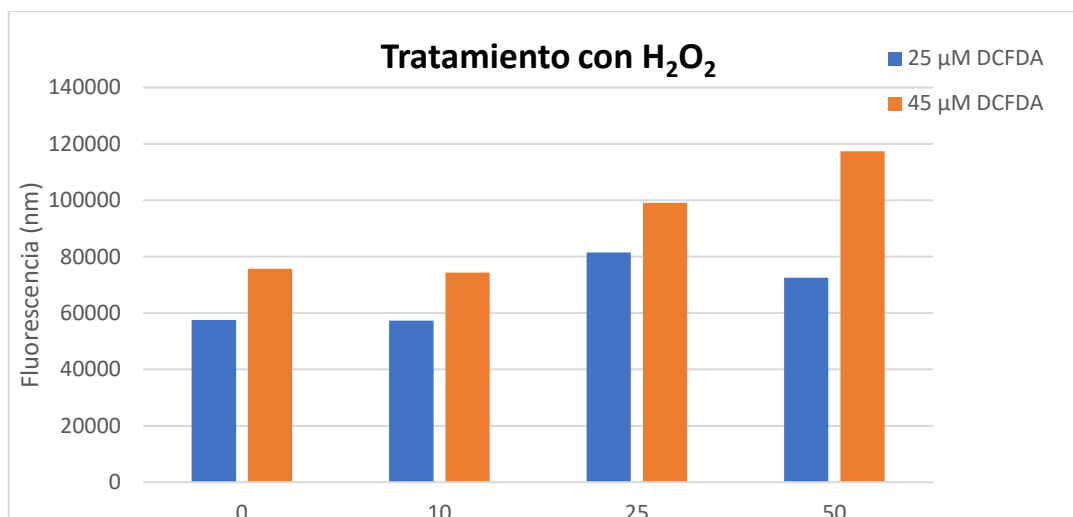


Figura 8. Representación gráfica de la emisión de fluorescencia obtenida para el tratamiento con H₂O₂. Las barras azules muestran los valores de la réplica que fue marcada con 25μM DCFDA y las naranjas los de la réplica marcada con 45μM DCFDA

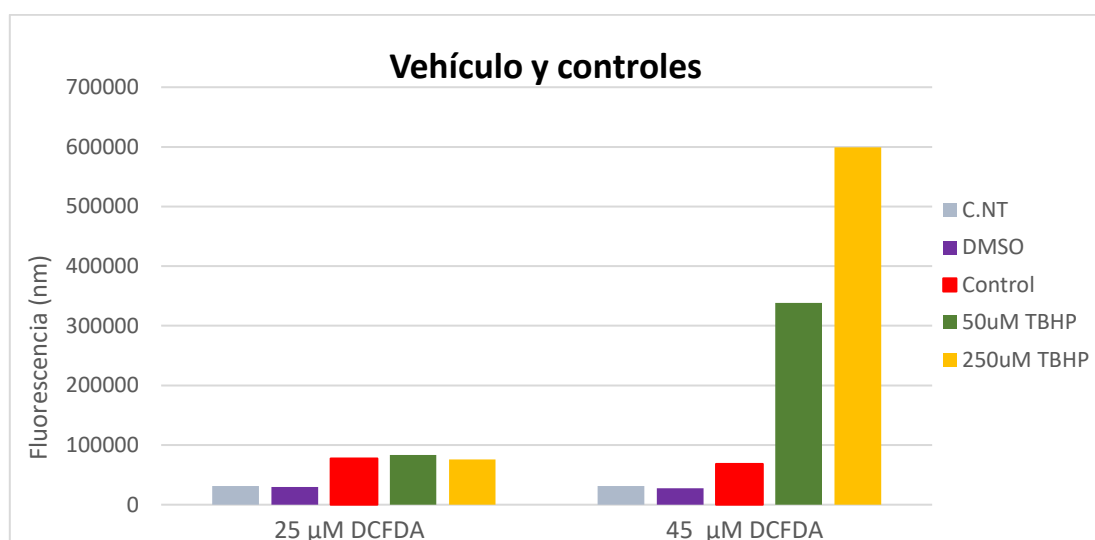


Figura 9. Representación gráfica de la emisión de fluorescencia obtenida para el vehículo y los controles. Las barras grises representan la absorbancia de las células sin marcar, las violetas el vehículo (DMSO), las rojas el control con células que no fueron sometidas a tratamiento, el verde el control con TBHO a 50μM, y el amarillo a 250μM. Excepto para las células no marcadas, los valores representados a la izquierda fueron los marcados con 25 μM DCFDA, y los de la derecha con 45 μM DCFDA.

4.2 Dot-Blot

En la imagen obtenida mediante Chemidoc XRS (BioRad) se observa que la señal que se produjo durante el revelado fue muy débil. El primer grupo de pocillos (muestras de 24 horas) fueron cargados con 2 μg de ADN, mientras que en el segundo grupo se cargó 1 μg. La señal obtenida se muestra en la *Figura 10*.

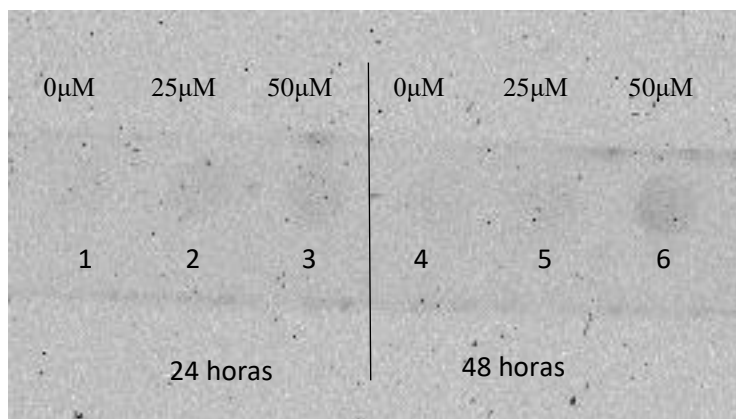


Figura 10. Imagen obtenida del revelado de la membrana empleada en el Dot-blot e incubada con el anticuerpo 8-OHdG. Los números señalan los distintos pocillos cargados con las muestras de ADN. En el grupo de la izquierda se encuentran los pocillos cargados con el ADN extraído de CG nombradas como muestras de 24 horas de incubación. En la parte superior se indica la concentración a la que fueron sometidos. En estos pocillos se cargó 2µg de ADN en cada uno. En el grupo de la derecha se encuentran los pocillos cargados con el ADN de las CG extraído de las muestras de 48 horas de incubación. En esos la cantidad empleada fue de 1µg de ADN.

La intensidad de la señal indica la cantidad de formas oxidadas de guanina presentes en el ADN de las muestras. Ésta fue cuantificada empleando el software Image J, con el que se obtuvo el área relativa a la intensidad de cada señal (*Tabla 4*) mediante el gráfico generado (*Figura 11*).

	Etiqueta	Área	Porcentaje (%)
24 horas.	0µM	3.861	9,32
	25µM	7.329	17,69
	50µM	6.217	15,00
48 horas.	0µM	2.957	7,13
	25µM	5.787	13,96
	50µM	10.111	24,40

Tabla 4. Área relativa y porcentaje de la intensidad de señal de cada muestra durante el Dot-blot. Datos obtenidos mediante el software Image J.

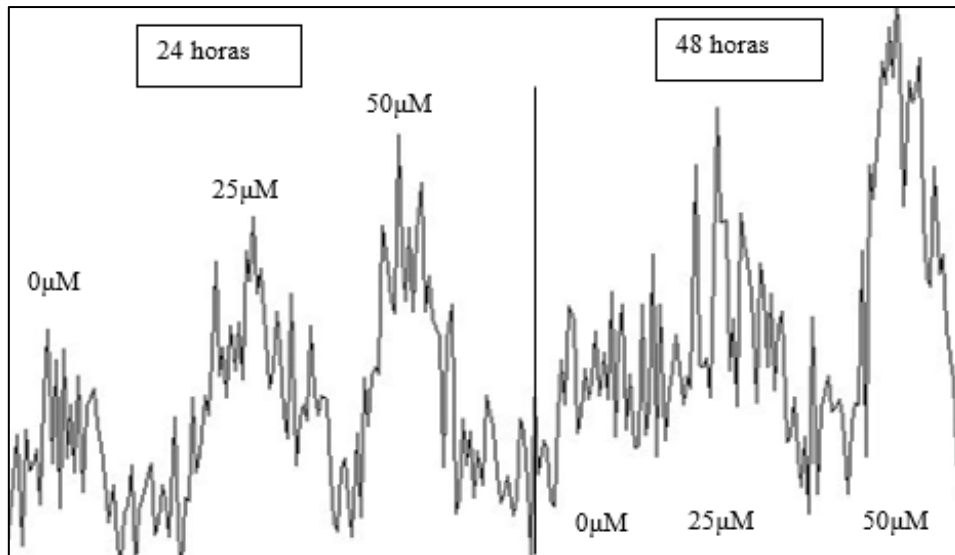


Figura 11. Área generada para cada muestra de ADN en función de la intensidad de señal. Imagen obtenida mediante el software Image J. Para cada área se indica la concentración de H_2O_2 con la que fueron tratadas las células de las que se extrajo el ADN cargado en la membrana.

Tanto en el ADN de las células extraído tras el tratamiento, como en el que se extrajo tras 24 horas se observa un aumento de la cantidad de formas oxidadas del nucleótido guanina. Sin embargo, en el primero no se apreciaron diferencias entre las distintas concentraciones de H_2O_2 , mientras que a las 24 horas se observó un daño significativamente mayor en el ADN sometido a $50\mu M$ que a $25\mu M$.

Por otro lado, en las células que tuvieron el periodo de 24 horas de recuperación, se observó una disminución del daño al ADN en el grupo sin tratar y en el que se expuso a H_2O_2 a $25\mu M$. Por el contrario, las células sometidas a H_2O_2 concentrado a $50\mu M$ mostraron un daño significativamente mayor a las 24 horas que en el momento del tratamiento.

4.3 Análisis de la expresión génica de enzimas de respuesta al estrés oxidativo.

En el primer ensayo el ADNc amplificado mediante qRT-PCR se sintetizó mediante el ARN obtenido de las muestras de células de la granulosa tratadas con H_2O_2 , como fue mencionado en el apartado de material y métodos, los genes amplificados fueron: CAT, SOD1, y β -actina, que se empleó como referencia para cuantificar la expresión del resto.

Los datos de expresión se muestran en las *Tablas 5 y 6*.

CAT					
Muestra		Ct	Ct de actina	ΔCt	Expresión relativa $2^{\Delta Ct} * 1000$
24 horas de incubación	0 μ M	37,21	27,39	9,82	110,6
	25 μ M	-	22,65	-	-
	50 μ M	-	28,9	-	-
48 horas de incubación	0 μ M	-	28,75	-	-
	25 μ M	-	26,22	-	-
	50 μ M	-	26,71	-	-

Tabla 5. Datos de expresión de CAT durante la qRT-PCR. Las celdas en blanco indican que no se obtuvieron datos de expresión para esa muestra.

SOD1					
Muestra		Ct	Ct de actina	ΔCt	Expresión relativa $2^{\Delta Ct} * 1000$
24 horas de incubación	0 μ M	35,18	27,39	7,79	451,8
	25 μ M	27,22	22,65	4,57	4210,1
	50 μ M	35	28,9	6,1	1457,9
48 horas de incubación	0 μ M	39,71	28,75	10,96	50,2
	25 μ M	32,95	26,22	6,73	942,0
	50 μ M	34,45	26,71	7,74	467,8

Tabla 6. Datos de expresión de SOD1 durante la qRT-PCR.

Los datos muestran que la cantidad de ADNc amplificado para cada gen fue muy reducida, en especial para la catalasa, en la que solo se obtuvieron datos de expresión para una de las muestras. La expresión de esta fue además notablemente menor que de SOD1.

En las células analizadas en el momento del tratamiento la síntesis de SOD1 fue, en general, mayor que tras 24 horas. Además, en ambos casos la expresión fue mayor en células tratadas con 25 μ M.

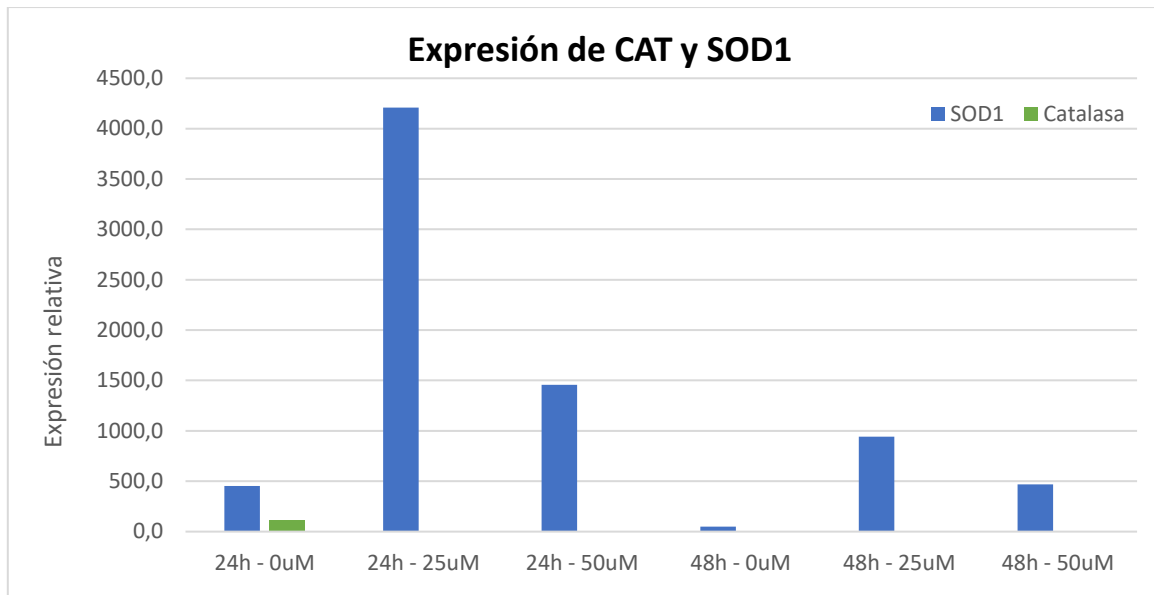


Figura 12. Expresión de los genes CAT y SOD1 durante la qRT-PCR.

En el segundo ensayo se amplificaron muestras a las que no se le aplicó ningún tratamiento. Estas fueron obtenidas de una donante, una paciente PR, NOF y una mayor de 40. De esta forma, se analizó el nivel de expresión en células de la granulosa de mujeres que cubren todos los rangos de edad (como se explicó en material y métodos) y que presentan distintas patologías ováricas. En este caso además de los genes CAT y SOD1 también se estudió la expresión de ALDH3A2, que codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa 3A2.

Igual que en el ensayo anterior, la catalasa presentó un nivel de expresión muy reducido y mucho menor que en el resto de los genes estudiados (*Tabla 8*). El gen que más se expresa en todas las muestras es con diferencia SOD1. Las células que presentaron una mayor transcripción de los tres genes fueron las obtenidas de PR y mayores de 40 años, aunque la diferencia entre las muestras no es tan notable como en el ensayo anterior en el que se había aplicado el tratamiento (*Figura 13*).

En la paciente mayor de 40 años se observó una expresión más elevada de ALDH3A2, mientras que en la PR fue SOD1 el gen que más se expresó.

	Muestra	Ct	Ct de actina	ΔCt	Expresión relativa $2^{\Delta Ct} * 1000$
SOD1	Donante	26,2	22,63	3,57	8420,2
	NOF	28,6	24,97	3,63	8077,2
	PR	27,34	23,99	3,35	9807,3
	>40	26,2	22,75	3,45	9150,5
CAT	Donante	32,64	22,63	10,01	97,0
	NOF	33,76	24,97	8,79	225,9
	PR	32,85	23,99	8,86	215,2
	>40	31,28	22,75	8,53	270,5
ALDH3A2	Donante	28,8	22,63	6,17	1388,8
	NOF	31,75	24,97	6,78	909,9
	PR	30,26	23,99	6,27	1295,8
	>40	28,38	22,75	5,63	2019,3

Tabla 7. Datos de expresión de los genes SOD1, CAT y ALDH3A2 para cada muestra durante la qRT-PCR.

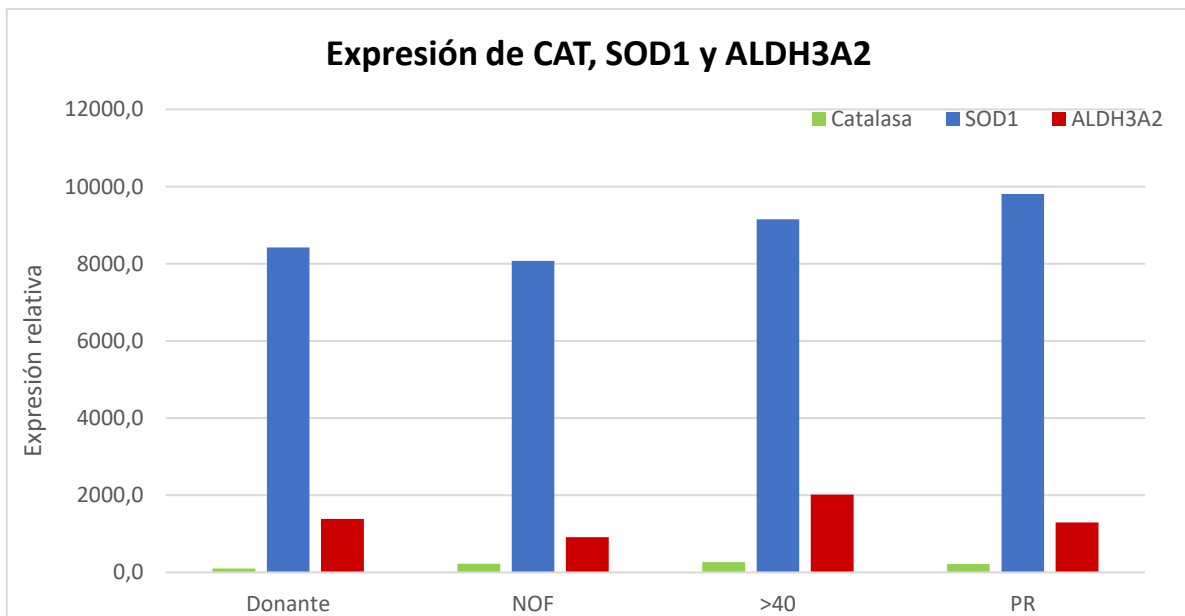


Figura 13. Expresión de los genes CAT, SOD1 y ALDH3A2 para cada muestra durante la qRT-PCR.

5. Discusión

5.1 Cuantificación de productos oxidantes.

En vista de los resultados, los valores más fiables son los de la réplica que se marcó con 45 μ M DCFDA, puesto que mostró valores más elevados de fluorescencia para muestras tratadas por igual, en comparación con la réplica marcada con 25 μ M. Esto se debe posiblemente a que la concentración de ROS presentes en las células fue mucho mayor que la del marcador a esa concentración, sobrepasando el límite de saturación. Esto se pone de manifiesto en la considerable diferencia de emisión de fluorescencia obtenida entre las dos réplicas para el control con TBHP y para la muestra tratada con 50 μ M de H₂O₂.

Por tanto, teniendo en cuenta la segunda réplica del ensayo, se deduce no sólo que el tratamiento con peróxido de hidrógeno a una concentración de 25 μ M o superior es capaz de inducir estrés oxidativo en los cultivos de células de la granulosa, sino que este aumenta de forma lineal conforme la concentración del oxidante aplicado crece. El hecho de que las muestras tratadas con 10 μ M no presentaran una gran variación con respecto a los controles y que, incluso se observara una ligera disminución de la absorbancia, puede deberse a la respuesta enzimática defensiva llevada a cabo por la célula, que logró reducir los productos oxidantes. Este mecanismo, en células de la granulosa, parece tener éxito al frenar el estrés oxidativo cuando la concentración de H₂O₂ presente en el entorno oscila en los 10 y los 20 μ M aproximadamente, pero no cuando se sobrepasa ese límite.

5.2 Análisis del daño al ADN.

En primer lugar, cabe destacar que la señal obtenida en el revelado de la membrana fue débil, por lo que para futuros ensayos sería conveniente aumentar la cantidad de ADN cargado.

Como ya se comentó en los resultados, el daño en el ADN fue mayor en las células que tuvieron un periodo de 24 horas de recuperación tras la adición del tratamiento oxidante, incluso aunque la cantidad cargada en la membrana fue de la mitad. Por ello, es lógico pensar que ante una concentración de 25 μ M o más de H₂O₂ las células de la granulosa no cuentan con mecanismos de reparación suficientemente eficaces, al menos en un periodo de 24 horas, para evitar que los daños en el ADN sigan aumentando debido a la oxidación de la guanina. Este aumento del daño a las 48 horas también indica que es posible que el ADN no se repare de forma correcta y esto lleve a una acumulación aún mayor de daños.

Para futuros estudios sería de gran relevancia estudiar el daño en el ADN durante periodos de recuperación más largos, para analizar si los efectos del estrés oxidativo son de alguna forma reversibles o permanentes.

5.3 Expresión de enzimas de respuesta al estrés oxidativo.

Se encontró expresión para todos los genes estudiados, lo que indica que las células de la granulosa sintetizan las enzimas CAT, SOD1 y ALDH3A2 de forma natural. Sin embargo, la expresión de los genes que codifican para la catalasa ha sido muy reducida en todos los ensayos, por lo que la cantidad de ADNc durante la amplificación debe ser mayor en futuros análisis. Esta reducida síntesis de catalasa a nivel celular es un indicativo de una baja respuesta enzimática ante el estrés oxidativo con H₂O₂, puesto que se trata de la enzima específica para reducir esta molécula a H₂O. Es probable que este sea uno de los factores más importantes que determinan el escaso éxito que mostraron las células de la granulosa evitando el estrés oxidativo y el daño al ADN cuando el tratamiento con H₂O₂ sobrepasa una concentración tan reducida como los 10 µM.

Por el contrario, la expresión de SOD1 como respuesta al tratamiento, fue mayor, aunque se observó una drástica disminución cuando la concentración de H₂O₂ aplicada era de 50 µM, y también tras las 24 horas de recuperación. Esto indica que cuando el estrés oxidativo supera cierto umbral los mecanismos de defensa cesan, quizás porque los daños afectan a las enzimas de transcripción, o porque se prioriza el uso de la energía en los mecanismos de reparación, necesarios para mantener las funciones básicas celulares. Esto ocurre cuando la concentración de H₂O₂ es mayor, y tras el tiempo de recuperación porque, como ya se mostró en el Dot-blot, el estrés oxidativo aumenta tras ese periodo.

Por otro lado, la mayor tasa de transcripción de SOD1 en el control de las células estudiadas en el momento del tratamiento con respecto al de las células que se recuperaron tras 24 horas puede deberse al posible estrés generado en la célula como resultado de la manipulación, en la que se mantuvieron algunos minutos a temperatura ambiente y desprotegidas de la luz.

En cuanto al ensayo con células no tratadas de pacientes se observó, de la misma forma, la reducida expresión de catalasa, por lo que la mala respuesta ante la oxidación con H₂O₂ no es fruto de una alteración durante el tratamiento, sino que ocurre de manera natural en las células de la granulosa. Además, la elevada expresión de SOD1 indica que las células mantienen activos los mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo en el entorno folicular. Esto ocurre de la misma forma con los mecanismos de reparación, puesto que la expresión de ALDH3A2 también tiene lugar por defecto en estas células.

Por otro lado, las células obtenidas de donantes y pacientes NOF muestran una expresión de las enzimas SOD1, CAT y ALDH3A2 más reducida que en el resto, por lo que posiblemente estas se encuentren sometidas a un estrés oxidativo menor en el entorno ovárico. En cuanto a las células de mayores de 40 y pacientes PR, las que parecen estar sometidas a un mayor estrés oxidativo son las de PR, puesto que la síntesis de CAT y SOD1 son más elevadas, mientras que en >40 sólo la expresión de ALDH3A2 es mayor. Esto encaja con la bibliografía actual, que recoge que en pacientes mayores de 40 años los problemas de infertilidad (relacionados con un excesivo estrés oxidativo) son mucho más frecuentes que en mujeres más jóvenes. Además, como ya hemos visto, numerosos estudios relacionan la baja respuesta a la estimulación ovárica con daños en las células de la granulosa.

Sin embargo, en todos los casos se observa una capacidad de respuesta enzimática ante el estrés, por lo que no parece que las células se encuentren tan dañadas como ocurría en el ensayo anterior con las que habían sido sometidas a 50µM de H₂O₂, en las que se observaba una notable disminución de la actividad de los mecanismos de defensa. Además, estos ensayos deben ser reproducidos para poder obtener un tamaño muestral elevado que permita un análisis estadístico, lo que aportaría resultados más precisos y fiables.

6. Conclusiones

- La incubación con H₂O₂ durante 20 minutos induce una situación de estrés oxidativo en las células de la granulosa a partir de una concentración de 25µM.
- El estrés oxidativo generado es capaz de producir daños en el ADN mediante la generación de formas oxidadas de guanina.
- Las células de la granulosa no mostraron tener un mecanismo de reparación eficaz que permita reparar, tras 24 horas de incubación en condiciones favorables, los daños producidos en el ADN.
- Los daños producidos por estrés oxidativo son mayores tras un periodo de un día que de forma inmediata.
- La expresión de enzimas de defensa ante ROS desciende cuando la concentración de H₂O₂ a la que se ven sometidas sobrepasa los 25 µM.

- Las células de la granulosa de pacientes con problemas de fertilidad muestran signos de estar expuestas a estrés oxidativo, aunque son capaces de poner en marcha mecanismos de defensa y reparación.
- Las pacientes mayores de 40 años y con baja respuesta a la estimulación ovárica son las que más signos de exposición al estrés oxidativo muestran.

6. Conclusions

- Incubation with H₂O₂ for 20 minutes causes a situation of oxidative stress in granulosa cells from a concentration of 25 μM.
- The oxidative stress generated is capable of producing DNA damage by producing oxidized forms of guanine.
- The granulosa cells did not show to have an effective repair mechanism that allows to repair, after 24 hours of incubation under favorable conditions, the damages produced in DNA.
- Damages due to oxidative stress are greatest during the period of one day than immediately.
- The defense enzymes expression against ROS decreases when the H₂O₂ concentration is above 25 μM.
- The granulosa cells of patients with fertility problems show signs of being exposed to oxidative stress, although they are able to put in the defense's and repair's mechanisms.
- Patients older than 40 years and with a low response to ovarian stimulation show the most signs of exposure to oxidative stress.

Bibliografía

1. **Comoli, Chiara L.** 2016. Fertility in time of economic crisis: the Great Recession effects on childbearing in the United States. Florence: European University Institute.
2. <https://ec.europa.eu/eurostat/data/database>.
3. **Velde, Egbert R te, Pearson, Peter L.** 2002. The variability of female reproductive ageing. *Human reproduction update* **8**: 141-154.
4. **Margo I., Hennet, y Combelles, Catherine M. H.** 2012. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International Journal of Developmental Biology* **56**: 819-831.
5. **Tatone, Carla, Amicarelli, Fernanda, Carbone, Maria C., Monteleone, Patrizia, Caserta, Donatella, et al.** 2008. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction Update* **14**: 131-142.
6. **Einchenlaub-Ritter, Ursula.** 2012. Oocyte ageing and its cellular basis. *The International Journal of Developmental Biology* **56**: 841-852.
7. **Tatone, Carla, Amicarelli, Fernanda.** 2013. The aging ovary - the poor granulosa cells. *Fertility and Sterility* **99**: 12-17.
8. **Devine, Patrick J., Perreault, Sally D., y Luderer, Ulrike.** 2012. Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity. *Biology of Reproduction* **86**: 1-10.
9. **Sohel, Mahmudul Md., Akyuz, Bilal, Konca, Yusuf, Arslan, Korhan, Sariozkan, Serpil, et al.** 2019. Oxidative stress modulates the expression of apoptosis-associated microRNAs in bovine granulosa cells in vitro. *Cell and Tissue Research* **376**: 295-308.
10. **Goud, Anuradha P., Goud, Pravin T., Diamond, Michael P., Gonik, Bernard, y Husam M., Abu-Soud.** 2008. Reactive oxygen species and oocyte aging: Role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* **44**: 1295-1304.
11. **Birben, Esra, Sahiner Murat U., Sackesen, Cansin, Erzurum, Serpil, y Kalayci, Omer.** 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization journal* **5**: 9-19.
12. **Kelson, Todd L., Secor Mc Voy, Julie R., Rizzo, William B.** 1997. Human liver fatty aldehyde dehydrogenase: microsomal localization, purification and biochemical characterization. *BBA General Subject* **1335**: 99-110.
13. **Li, Rong, y Albertini, David F.** 2013. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **14**: 141-152.
14. **Bapurao Jeve, Yadava y Malappa Bhandari, Harish.** 2016. Effective treatment protocol for poor ovarian response: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Human Reproductive Sciences* **9**: 70-81.
15. **Younis, Johnny S., Ben-Ami, Moshe, Ben-Shlomo, Izhar.** 2015. The Bologna criteria for poor ovarian response: a contemporary critical appraisal. *Journal of Ovarian Research* **8**: 1-10.
16. **Hayeck, Samer E., Bitar, Lynn, Hamdar, Layal H. Mirza, Fadi G., Daoud, Georges.** 2016. Poly Cystic Ovarian Syndrome: An Updated Overview. *Frontiers in Physiology* **7**: 1-15.
17. **Bulletti, Carlo, Coccia, Maria E., Battistoni, Silvia, y Borini, Andrea.** 2010. Endometriosis and infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **27**: 441-447.
18. **Schmittgen, Thomas D., Livak, Kenneth, J.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Natural Protocols* **3**: 1101-1108.