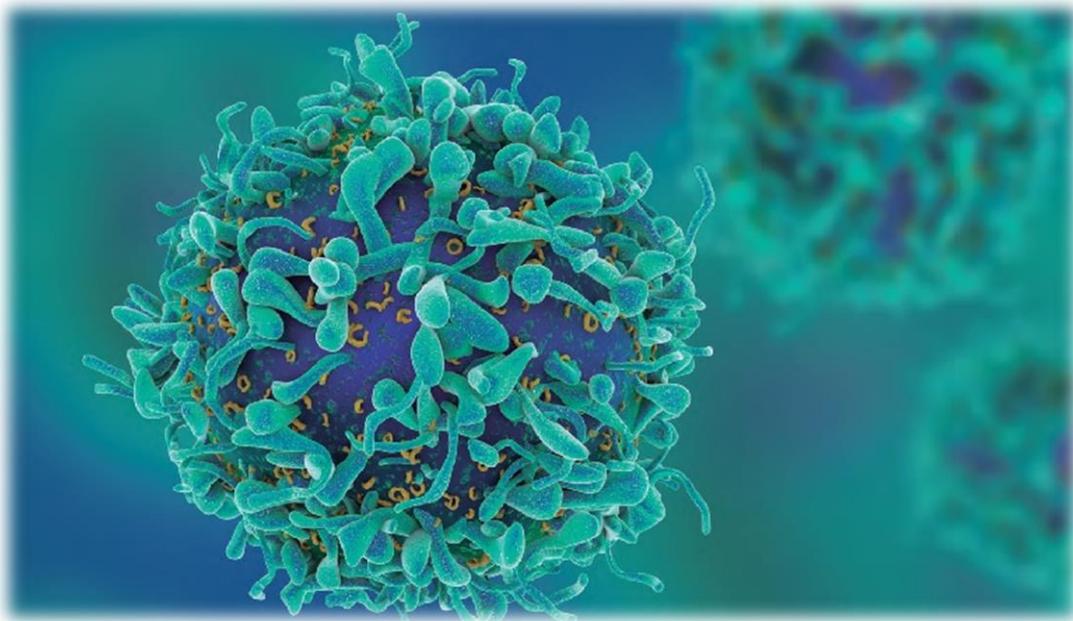




Sección de Biología
Universidad de La Laguna

**Marcadores moleculares en exosomas circulantes
indicativos de patologías ováricas relacionadas con
infertilidad**

**Molecular markers in circulating exosomes indicative of
ovarian pathologies related to infertility**



Trabajo de Fin de Grado

SILVIA GONZALEZ BARBUZANO

Tutorizado por Julio Tomás Ávila Marrero y Rebeca González Fernández
Grado en Biología. Septiembre 2019

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	1
Introducción	2
Descripción del modelo de estudio	2
Variación de la fertilidad en mujeres.....	4
Comunicación intercelular en el proceso reproductivo.....	6
Los exosomas y sus implicaciones en procesos celulares	7
Objetivos	6
Material y Métodos	7
Pacientes.....	7
Purificación de exosomas a partir de suero y de líquido folicular	7
Extracción de proteínas de exosomas.....	8
Electroforesis en gel de poliacrilamida	8
Tinción de proteínas.....	9
Análisis de resultados.....	9
Resultados	14
Expresión del contenido en muestras de suero y líquido folicular en donantes.....	14
Expresión del contenido de exosomas de diferentes grupos de mujeres	16
Discusión	6
Expresión del contenido en muestras de suero y líquido folicular en donantes.....	6
Expresión del contenido de exosomas de diferentes grupos de mujeres	7
Conclusiones:.....	28
Conclusions:	28
Bibliografía	29

Resumen

En la actualidad los problemas asociados a la disminución de la fertilidad son de interés en los tratamientos de reproducción asistida a los que las mujeres con deseo de ser madre recurren cuando el proceso natural se dificulta. Investigaciones recientes estudian la posibilidad de que los exosomas no solo puedan constituir mecanismos de las células para deshacerse de los desechos celulares, sino que podrían estar involucrados en procesos de comunicación celular cumpliendo diversas funciones. Así, el siguiente trabajo se centra en observar la expresión del contenido de la carga de exosomas aislados a partir de muestras de suero y líquido folicular de pacientes con distinto diagnóstico de infertilidad y donantes de ovocitos para comprobar si se dan o no diferencias en el patrón de expresión, ya que, de ser así, la idea de que se los exosomas intervienen en la comunicación intercelular podría verse reforzada.

Abstract

At present, problems associated with decreased fertility are of interest in assisted reproductive treatments that women with a desire to be a mother resort when the natural process becomes difficult. Recent research studies suggesting that exosomes may not only constitute mechanisms for cells to dispose of cellular waste but could be involved in cellular communication processes while fulfilling various Functions. Thus, the following work focuses on observing the expression of the content of the isolated exosome load from serum and follicular liquid samples of patients with different diagnosis of infertility and oocyte donors to check whether they occur differences in the pattern of expression, since, if so, the idea of exosomes involved in intercellular communication could be reinforced.

Introducción

Introducción

En la actualidad, uno de los principales problemas reproductivos es la alteración de la fertilidad, especialmente es los países desarrollados en los que las mujeres de forma voluntaria deciden retrasar la maternidad provocando un incremento en la edad en el momento de llevar a cabo un embarazo.

Desde que apareció la fecundación in vitro en los años 70 para subsanar posibles alteraciones de la fertilidad, esta ha experimentado un enorme avance en cuanto a eficacia y seguridad, lo cual se ha logrado gracias a un mejor conocimiento en Biología de la Reproducción que se ha obtenido a su vez a avances en biología celular, molecular, endocrinología y farmacología [11].

Descripción del modelo de estudio

En la pelvis de la mujer, formando parte del aparato reproductor femenino, se encuentran dos estructuras con forma ovalada denominadas ovarios. Se trata de glándulas complejas con función endocrina y paracrina que constituyen el ambiente adecuado donde tiene lugar la maduración de los oocitos durante el periodo que abarca la vida fértil femenina [3]. Las principales funciones del ovario son, en primer lugar, la secreción de hormonas femeninas como los estrógenos y la progesterona, y, en segundo lugar, la formación y almacenaje de gametos femeninos, los óvulos.

El ovario presenta tres zonas diferenciadas y estructuradas. La médula central constituida por distintos tipos celulares, el hilio interno en el punto de unión del ovario y el mesovario que contiene linfocitos, nervios y vasos sanguíneos, y, por último, el córtex externo que constituye la región más relevante ya que en ella se encuentran unas estructuras globulares denominadas folículos ováricos (oocitos rodeados de complejos celulares diploides de naturaleza somática como las células de la granulosa y las células de la teca). Estos sufrirán cambios en su organización y composición que coincidirán con el grado de desarrollo y de diferenciación de los oocitos que contienen.

Desde el nacimiento hasta la pubertad, la mujer presenta aproximadamente dos millones de folículos primordiales (aquel folículo que desde su formación inicial se compone de un oocito asociado a células granulosas rodeados por una lámina basal), hasta que comienza la vida fértil una vez alcanzada la madurez sexual que comienza a partir de los 12-13 años aproximadamente, muchos de los folículos primordiales se atrofian y así solo unos 40.000 oocitos permanecen en el ovario, y de estos, alrededor de 400 serán los únicos que podrán

madurar por completo hasta pasar a las trompas de Falopio y al útero, donde serán potencialmente fecundables. En esta etapa, comprendida entre el inicio de la pubertad y la menopausia, tienen lugar de forma mensual todo un conjunto de cambios hormonales que provocan que el ovario libere un óvulo potencialmente fecundable, constituyendo así el ciclo menstrual.

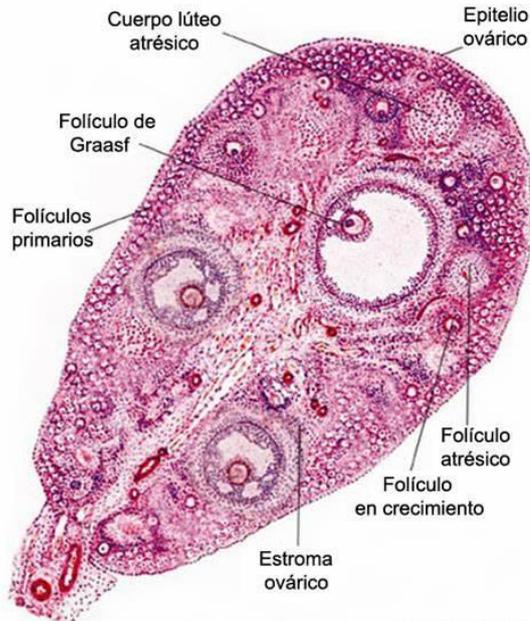


Imagen 1. Estructura histológica del ovario humano. Imagen tomada de http://www.fertilab.net/images/fig_gamf_ova.jpg

Durante el desarrollo folicular, cuando un folículo primordial inicia su maduración, las células de la granulosa se transforman y dan lugar a una única capa de células cuboideas que comienzan a dividirse, en este punto el folículo pasa a denominarse “primario”. A continuación, estos folículos primarios aumentan su tamaño incrementando sus capas de células granulosas. Estas células de la granulosa originarán la “membrana pelúcida” debido a la secreción de mucopolisacáridos que forman una capa translúcida que envuelve al oocito. Al mismo tiempo que esto ocurre, las células del estroma cortical por fuera de la lámina basal dan lugar a las células de la teca que constituyen capas concéntricas de celular alargadas. Se diferencia la teca interna, constituida por células tecales que se encuentran cerca de la lámina basal y que se transforman en células epiteliales, y la teca externa, que se compone de las células tecales más alejadas que mantienen su forma y se unen a células del estroma.

Tanto las células tecales como las células granulosas comienzan a crecer y a proliferar, y a medida que esto ocurre, el folículo aumenta de tamaño hasta que comienzan a aparecer acumulaciones de líquido entre las células de la granulosa para finalmente dar lugar a una

cavidad central llena de este líquido y denominada antra, transformándose así el folículo primario en folículo De Graaf. A medida que el folículo madura, el oocito que inicialmente ocupaba una posición central en el folículo, se desplaza hasta adoptar una posición excéntrica y se rodea de varias capas de células granulosas dando lugar a la formación del cúmulo oóforo que se mantiene unido por uno de sus lados al resto de células granulosas.

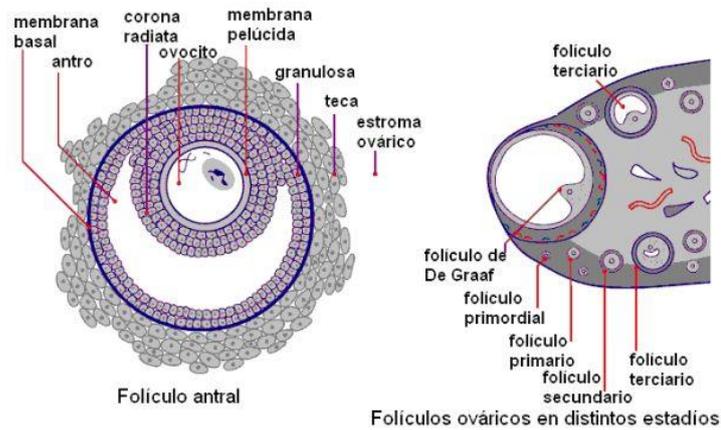


Imagen 2. A la derecha de la imagen se observa un folículo antral cuya estructura es muy parecida a la del folículo De Graaf, y a la izquierda distintos estadios de desarrollo en diferentes folículos. Imagen tomada de http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_17.htm

A pesar de que cada mes muchos folículos comienzan su desarrollo, solo uno de ellos madurará completamente, es decir, solo uno llegará a convertirse en folículo De Graaf y presentará todas las estructuras mencionadas anteriormente y propias de un folículo totalmente maduro. Una vez el folículo de Graaf está totalmente maduro, se produce su ruptura y como consecuencia se libera el oocito que contiene.

Lo que ocurre a continuación es la formación del cuerpo lúteo debido a que las células granulosas que han experimentado cambios morfológicos, las células tecales y los vasos se entremezclan. Si no se produce fecundación en los siguientes 14 días aproximadamente, el cuerpo lúteo se reduce y forma lo que se denomina *corpus albicans*, de lo contrario, si se diese la fecundación, el cuerpo lúteo se transformaría en un cuerpo lúteo gravídico [1].

Variación de la fertilidad en mujeres

Tras explicar cómo tiene lugar la maduración ovárica en condiciones normales, se entendería por fertilidad a la capacidad de tener una gestación que se prolongue hasta que la viabilidad fetal sea alcanzada. En cuanto a la especie humana, la fertilidad varía con el tiempo y esta se encuentra limitada por el periodo que dure de forma efectiva la capacidad de

reproducción (sociedad española de fertilidad). A partir de los 40 años comienza el periodo de infertilidad de la mujer que culmina cuando se alcanza la menopausia, es decir, se produce la pérdida del ciclo menstrual. La disminución de la fertilidad en este periodo se asocia con una disminución en la tasa de implantación y en la tasa de embarazo, así como con un aumento en la tasa de abortos espontáneos, y esto podría deberse a que la calidad y la cantidad de los ovocitos se ha reducido. Además, la reserva ovárica, es decir, la calidad y cantidad de folículos y ovocitos que alcanzan la ovulación también puede disminuir a medida que se aumenta de edad. Esta disminución de la reserva ovárica se asocia a baja respuesta ovárica que es provocada por una pérdida folicular por apoptosis [2,3]. En estas circunstancias de envejecimiento ovárico, la dinámica de crecimiento folicular se ve alterada y, además, los ovocitos que alcanzan la ovulación tienden a presentar defectos a nivel celular y genético, dificultando así la reproducción [3].

Pero la baja respuesta ovárica, aunque sería lo que se espera, no solo se ve asociada a una edad madura. Se da el caso de mujeres con edades inferiores a los 40 años y con baja respuesta ovárica. Son aquellas que se encuentran dentro del periodo que cabe esperar sea fértil y que por alguna patología no lo son. El criterio más común para diagnosticar estos casos es la obtención de un número bajo de ovocitos a pesar de haberse sometido a una estimulación ovárica adecuada en un ciclo de reproducción asistida. Según el conceso de Bolonia, se establecieron una serie de criterios mínimos que son necesarios para determinar una baja repuesta ovárica, donde se debe presentar al menos dos de los tres: además de una edad avanzada, el segundo de ellos consiste en presentar un ciclo anterior de baja respuesta, es decir, tres o menos ovocitos con un protocolo convencional de estimulación; el tercero se trata de obtener un resultado anormal en una prueba de reserva ovárica, es decir, que el recuento de folículos antrales dé como resultado un número menor a entre siete y cinco folículos antrales o una cantidad de hormona anti-mulleriana inferior a 0.5-1.1 ng/ml. Además de estos criterios, también se propuso que es suficiente que, si se dan más de dos episodios de baja respuesta ovárica a pesar de una previa estimulación máxima, aunque no se den otros criterios, se diagnostique como baja respuesta ovárica [4].

Por los casos comentados anteriormente en los que mujeres con edades superiores a los 40 años y mujeres que presentan baja respuesta ovárica y cuya fertilidad es reducida, pero mantienen el deseo de tener hijos, existen mujeres que son donantes de ovocitos, para poder cubrir las necesidades de estas mujeres.

La fertilidad se produce porque los órganos sexuales han madurado lo necesario para ser totalmente funcionales, esto es gracias a la correcta sincronización entre el sistema endocrino, que secreta las hormonas adecuadas, y los órganos sexuales. En el transcurso de vida de una mujer, y en condiciones normales, cuando esta se encuentra en el periodo comprendido entre los 20 y los 30 años, alcanza su máxima fertilidad, coincidiendo este momento con el que se encuentran las donantes. Una vez superada esta edad, la fertilidad entra en un declive fisiológico, que a medida que pase el tiempo irá en aumento, siendo más acusado a partir de los 40 años como se ha explicado anteriormente.

En el proceso de donación, las mujeres donantes reciben en primera instancia una entrevista donde se les informa cómo es el proceso, las posibles complicaciones y las pruebas a las que serían sometidas, y el tratamiento que reciben una vez aceptan ser donantes, consiste en una preparación del endometrio gracias al suministro de comprimidos primero de estradiol, seguidos además de comprimidos de progesterona, hormonas que intervienen de forma natural en la formación de un endometrio apto para que un embrión se pueda implantar. Además, también se les suministran hormonas para inhibir la ovulación y que no interfiera así en la preparación del ciclo (sociedad española de fertilidad).

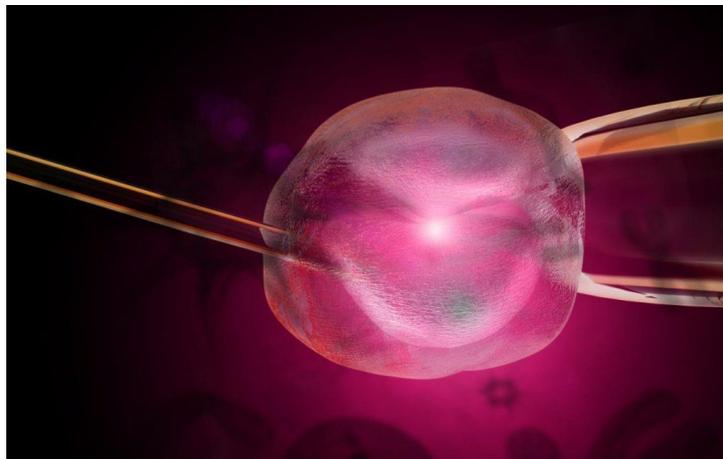


Imagen 3. Óvulo en el proceso de extracción para ser donado. Imagen tomada de <https://www.efesalud.com/donacion-ovulos/>

Comunicación intercelular en el proceso reproductivo.

El nacimiento de una nueva vida es el resultado de una comunicación adecuada entre las células de diferentes tejidos y órganos. Comprender de forma adecuada las diferentes moléculas y mecanismos que están implicados de forma específica en las diferentes fases no sólo es importante en la investigación básica, sino que podría aportar información útil para entender casos de infertilidad inexplicable, con lo cual se mejoraría así el éxito reproductivo.

Como se ha descrito anteriormente, los folículos ováricos representan las unidades reproductivas que se componen del ovocito, de las células somáticas (cúmulo oóforo, células granulosas y células tecales) y del líquido folicular.

El crecimiento del folículo y la maduración de los ovocitos son procesos que se encuentran conectados por un intercambio constante de señales entre la célula germinal y los componentes somáticos, gracias a lo cual el proceso de maduración tiene lugar de forma coordinada. Se produce una conversación cruzada entre el ovocito y las células foliculares somáticas mediante uniones comunicantes (gap junctions) establecidas entre el ovocito y el cúmulo oóforo de células granulosas, y mediante el líquido folicular acumulado dentro del folículo durante la maduración. El líquido folicular se origina por la infiltración de varios capilares en el folículo, que proporcionan distintos componentes plasmáticos, importantes para el crecimiento de los ovocitos, y por la actividad secretora de las células foliculares somáticas y el ovocito. Se compone principalmente de proteínas, hormonas esteroides, enzimas, factores de crecimiento, ácidos grasos, citoquinas y factores anticoagulantes, permitiendo la comunicación intercelular y proporcionando al ovocito nutrición pudiendo así madurar dentro del folículo [6].

Dado que existe una comunicación intercelular en el proceso reproductivo, cuya alteración puede provocar problemas de infertilidad, se estudia la posible implicación de los exosomas ya que se consideran mensajeros intercelulares que podrían actuar efectuando la entrega de su carga a células efectoras o señalando macromoléculas entre células específicas, sin embargo, la composición de su carga y las vías biológicas en las que están involucrados permanece aún sin conocerse con exactitud. [1,7]

Los exosomas y sus implicaciones en procesos celulares

Se emplea el término exosomas para referirse a vesículas extracelulares cuyo diámetro es menor de 150 nm. Tras la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática, estas vesículas son liberadas al ambiente extracelular. En 1985 la científica Rose Johnstone escogió el término “exosoma” para referirse a estas vesículas extracelulares ya que el proceso se parecía a la endocitosis inversa.

En un principio se creía que los exosomas constituían formas de desperdicio celular, y actualmente, ciertos datos refuerzan la idea de que efectivamente se trata de una forma en la que los productos de desecho celular son eliminados para lograr garantizar la homeostasis de las células. Pero además de esto, recientemente se ha considerado que los exosomas podrían

participar en la comunicación de célula a células, así como han sido asociados con muchas funciones fisiológicas y patológicas.

En la biogénesis exosómica, que tiene lugar en el sistema endosomal, un exosoma es liberado con la previa maduración de los endosomas tempranos en cuerpos multivesiculares a la vez que se generan vesículas intraluminales en la luz de los orgánulos debido a la invaginación de la membrana endosomal; el transporte previo de estos cuerpos multivesiculares hasta la membrana plasmática que depende de la interacción de estos con la actina y los microtúbulos del citoesqueleto; y la finalmente la fusión entre los cuerpos multivesiculares que presentan alto nivel de colesterol con la membrana plasmática, proceso en el que se deben superar barreras energéticas gracias a interacciones proteína-proteína y proteína-lípido. Además, se ha demostrado que el calcio puede regular la liberación de exosomas, así como también se ha sugerido que la homeostasis celular regula si los cuerpos multivesiculares serán degradados o secretados, pues los exosomas podrían estar relacionados con mecanismos para hacer frente al estrés intracelular protegiendo así a las células.

En cuanto al contenido vesicular de los exosomas, estos albergan diferentes proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, factores solubles y una gran variedad de moléculas derivadas del citosol. Dependiendo del tipo celular, su composición variará, así como también influirán diferentes condiciones o tratamientos celulares.

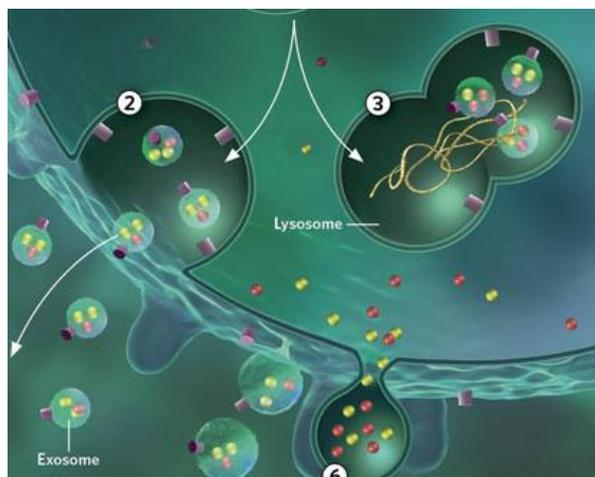


Imagen 4. Proceso de liberación de exosomas desde el interior celular hacia el ambiente intercelular. Imagen tomada de <http://www.divulgades.es/wp-content/uploads/2013/08/Exosomerecord.jpg>

Una vez liberados los exosomas, estos pueden ser degradados por fagocitos o tener otros destinos. Algunos de los destinos que se barajan son, en el caso de los exosomas que se secretan como desechos celulares, que estos puedan afectar a las células vecinas provocando condiciones

patológicas; otra posibilidad es que, en situaciones de estrés intracelular, las células puedan comunicarse con otras células vecinas debido al aumento en el número de exosomas secretados. De la misma forma, se baraja que los exosomas podrían estar vinculados con la autofagia, ruta de degradación que además de suministrar nutrientes en periodos de inanición, sirve para eliminar los orgánulos que están dañados, las proteínas que se encuentran agregadas y los patógenos invasores. Cuando esta ruta es inducida los autofagosomas que contienen la carga citoplasmática se fusionan con los cuerpos multivesiculares formando anfisomas, cuya carga es degradada en los lisosomas, viéndose así reducida la liberación de exosomas debido al aumento de cuerpos multivesiculares que se fusionan para formar los anfisomas, de este modo, cuando la vía degradativa se encuentra obstruida o sobrecargada debido al estrés, la liberación de exosomas constituiría una ruta alternativa de eliminación de desechos.

Todo esto ha provocado que en los últimos años cada vez haya mayor interés por los exosomas, ya que podrían tener importantes funciones relacionadas con la salud, ciertas enfermedades, así como podrían aplicarse en terapias y diagnósticos clínicos [7].

Objetivos

Objetivos

Los exosomas son vesículas de pequeño tamaño, secretadas por varios tipos de células, que contienen ARN y proteínas. Estos se encuentran en abundancia en multitud de fluidos corporales como la sangre, el líquido folicular, la saliva, la orina o la leche materna se piensa que pueden actuar como mensajeros intercelulares.

Debido a esto, el objetivo general de este trabajo consiste en encontrar, si las hubiese, y comparar las diferencias del contenido de los exosomas de distintas muestras obtenidas de pacientes sometidas a tratamientos de Fecundación In vitro (FIV).

Para la llevar a cabo al mismo, se abordarán como objetivos específicos los que a continuación se mencionan:

- Purificar exosomas a partir de muestras de suero y líquido folicular de donantes de ovocitos.
- Analizar y comparar el patrón de expresión de las proteínas presentes en los exosomas aislados a partir del suero y líquido folicular de donantes.
- Purificar exosomas a partir de muestras de líquido folicular de pacientes >40 años y pacientes con Baja Reserva ovárica (BR).
- Analizar y comparar el patrón de expresión de las proteínas presentes en los exosomas aislados a partir del líquido folicular de donantes, >40 años y BR.

Material y métodos

Material y Métodos

Pacientes.

El presente estudio se llevó a cabo usando líquido folicular y suero extraídos a dos mujeres del grupo control, es decir mujeres donantes de ovocitos (con códigos de identificación 190402 y 5789), cuyo rango de edad se encuentra entre 18 y 29 años, que no sufrían ningún tipo de alteración por tratarse de mujeres jóvenes que no tenían ninguna enfermedad ovárica y que presentaban, además buena salud psíquica. 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 muestras, sólo de líquido folicular, de una paciente diagnosticada con Baja Respuesta Ovárica (PR) 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 (190508), y de una paciente mayor de 40 años (>40) (190423), en estos dos últimos casos ambas pacientes estaban sometidas a tratamientos de fertilidad. 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.

Purificación de exosomas a partir de suero y de líquido folicular

Los exosomas fueron extraídos a partir de muestras de suero fresco (S) o de líquido folicular fresco (LF). Tanto el suero como el líquido folicular contienen, además de los exosomas, eritrocitos, leucocitos y otras moléculas, por ello es necesario aislar los exosomas. En caso de estar congeladas, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente o bien en un baño a 25°C, y a continuación se centrifugó durante 30 minutos a 2000 x g para eliminar las células y los desechos. Tras la centrifugación el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo con sumo cuidado de no tomar el pellet.

Para las muestras de suero se usó el reactivo Total Exosome Isolation (from serum) (Invitrogen) añadiendo 20µL de reactivo por cada 100µL de suero, mientras que para las muestras de líquido folicular se empleó el reactivo Total Exosome Isolation (from culture media) usando 500µL de reactivo para cada mL de líquido folicular.

Una vez se añadió la cantidad correspondiente de reactivo a la muestra, se homogeneizó pipeteando y se incubó, en el caso del suero, durante una hora, y en el caso del líquido folicular, durante toda una noche, y, en ambos casos manteniendo la muestra a una temperatura de 4°C durante la incubación. Tras la incubación, la muestra de suero se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 x g a temperatura ambiente, y la de líquido folicular durante 1 hora a 4°C. Finalmente, tras centrifugar, se conservaron a -80°C hasta su utilización, tanto el sobrenadante, que recibió el nombre de suero purificado (SS) y líquido folicular purificado (SLF), como el pellet que contenía los exosomas aislados.

Extracción de proteínas de exosomas

Para lograr la extracción de proteínas contenidas en los exosomas se procedió a lisar estos con un buffer de lisis, RIPA (50 mM Tris pH 8 + 150 mM NaCl + 1% Nomidet 40 + complete 1X). Al pellet de exosomas, tanto de suero como de líquido folicular, se añadió 75 µL de buffer de lisis y se dejó en hielo durante 20 minutos, resuspendiendo cada 5 minutos. A continuación, se centrifugó a 12,000 x g durante 2 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante donde se encuentran las proteínas que antes estaban contenidas en los exosomas constituyendo así las muestras de proteínas de exosomas de suero (ES) y las muestras de proteínas de líquido folicular (ELF).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Obtenidas ya las diferentes muestras de trabajo, se sometieron a electroforesis SDS-PAGE discontinua, para lo cual fue necesario preparar un gel de poliacrilamida. Se utilizó el Sistema de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra (BioRad) con tampón de cámara 10X (glicina 2M, Tris 0.25 M, SDS 0.035 M, pH 8.3) usado a concentración 1X y se aplicó un voltaje de 150-200 V. El gel de poliacrilamida se realizó con una fase basal de poliacrilamida al 10% (4,07 mL agua MiliQ + 3,33 mL de acrilamida 30% + 2,5 mL Tris pH 8,8 + 0,1 mL SDS 10% + 50 µL APS + 5 µL TEMED) y una fase superior para potenciar la compactación de poliacrilamida al 4% (3,64 mL agua MiliQ + 0,8 mL de acrilamida 30% + 1,5 mL Tris pH 6,8 + 0,06 mL SDS 10% + 30 µL de APS + 6 µL de TEMED). Cantidades utilizadas para la realización simultánea de dos geles.

Las muestras se prepararon con tampón de carga LSB 3x (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 1.5% β-mercaptoetanol y 0.0025% de azul de bromophenol) en un volumen final de 15 µL. Se usaron 0.5 µL de exosomas de suero y líquido folicular, 0.25 µL de líquido

folicular, suero purificado y suero no procesado y 0.125 μL de líquido folicular no procesado. En todos los casos los volúmenes se ajustaron con agua MiliQ.

Además, para determinar tanto el tamaño como la cantidad de proteínas expresadas, se cargó en cada gel el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (BioRad), así su pocillo correspondiente contenía 5 μL del marcador de peso molecular y 10 μL de LSB 1X.

Tinción de proteínas

Para poder observar lo que se estaba expresando se procedió a realizar una tinción con el colorante fluorescente SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen). En primer lugar, la solución de fijación (50% Metanol + 7% Ácido acético + 43% agua MiliQ) donde se dejó el gel sumergido en ella y en agitación durante 30 minutos. Se desechó la solución utilizada y se sumergió de nuevo en solución de fijación y en agitación por otros 30 minutos. Posteriormente el gel se dejó con SYPRO en agitación y en oscuridad durante toda la noche. Una vez pasada la noche, se lavó el gel con la solución de lavado (10% Metanol + 7% Ácido Acético + 83% agua MiliQ) primero durante 30 minutos y, tras desechar y utilizar nueva solución de lavado, durante otros 30 minutos. Antes de colocar el gel sobre la lámpara UV para su visualización se lavó dos veces con agua MiliQ durante 5 minutos cada vez.

Análisis de resultados

Para el análisis de los resultados obtenidos y la comparación de los patrones de bandas presentes en las distintas muestras analizadas se empleó el software de análisis de geles Quantity-one (Bio-Rad).

Resultados

Resultados

Expresión del contenido en muestras de suero y líquido folicular en donantes.

En primer lugar, se analizó si existían diferencias entre el patrón de bandas de muestras de diferente origen, suero y líquido folicular, S y LF, provenientes de un mismo grupo, mujeres donantes de óvulos. Las muestras de suero eran de la donante 5789 y las de líquido folicular de la donante 190402.

Así, en la figura 1, se comparó el patrón de bandas encontrado en una muestra de suero fresco y en una muestra de líquido folicular fresco. Se puede observar que existen 5 bandas diferentes entre ambas muestras.

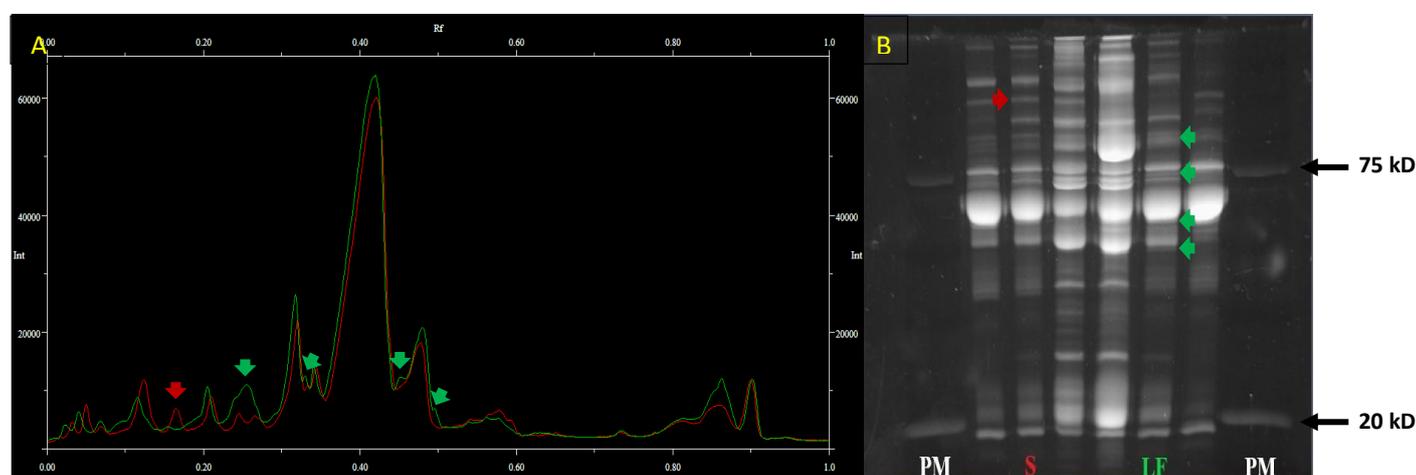


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las proteínas presentes en muestras de suero y líquido folicular. A. Representación gráfica del patrón de proteínas de la muestra de suero (S) en rojo y de la muestra de líquido folicular (LF) en verde. B. Electroforesis de las proteínas del suero de la donante 5789 y del líquido folicular de la donante 190402. Las diferencias entre ambas muestras aparecen señaladas con flechas, existiendo un total de 5 diferencias.

Además, en la figura 2 se comparó el patrón de bandas de una muestra de suero purificado y de una muestra de líquido folicular purificado, SS y SLF. Se observa que 4 bandas presentan diferencias.

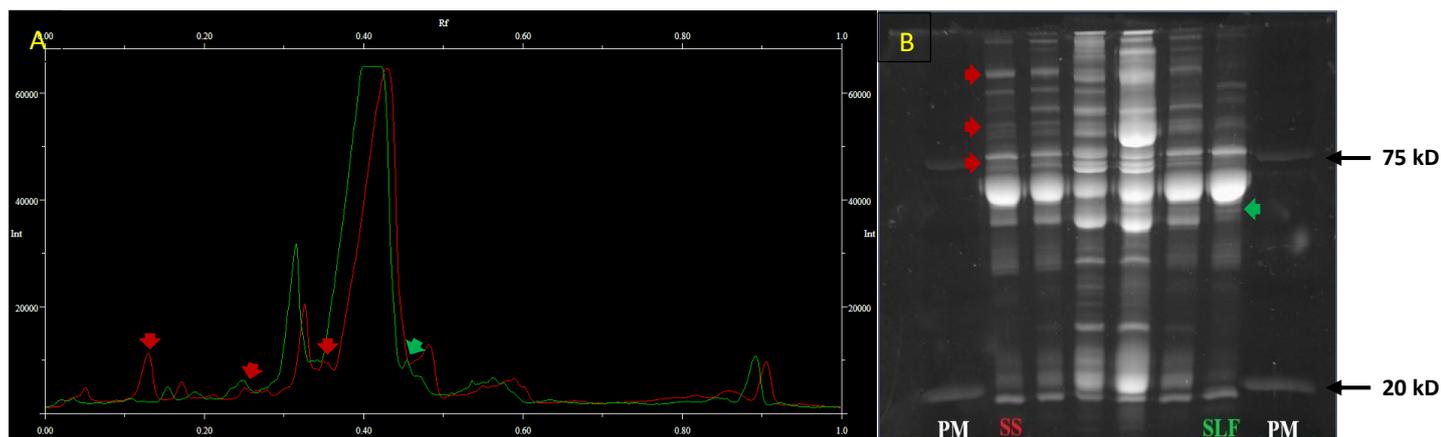


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las proteínas presentes en muestras de suero y líquido folicular. A. Representación gráfica del patrón de proteínas de la muestra de suero purificado (SS) en rojo y de la muestra de líquido folicular purificado (LF) en verde. B. Electroforesis de las proteínas del suero de la donante 5789 y del líquido folicular de la donante 190402. Las diferencias entre ambas muestras aparecen señaladas con flechas, existiendo un total de 4 diferencias.

Finalmente, y constituyendo el foco de interés principal de este apartado, en la figura 3 se comparó el patrón de bandas obtenido a partir de una muestra de exosomas de suero y de una muestra de exosomas de líquido folicular, ES y ELF. En este caso 9 bandas difieren entre ambas muestras.

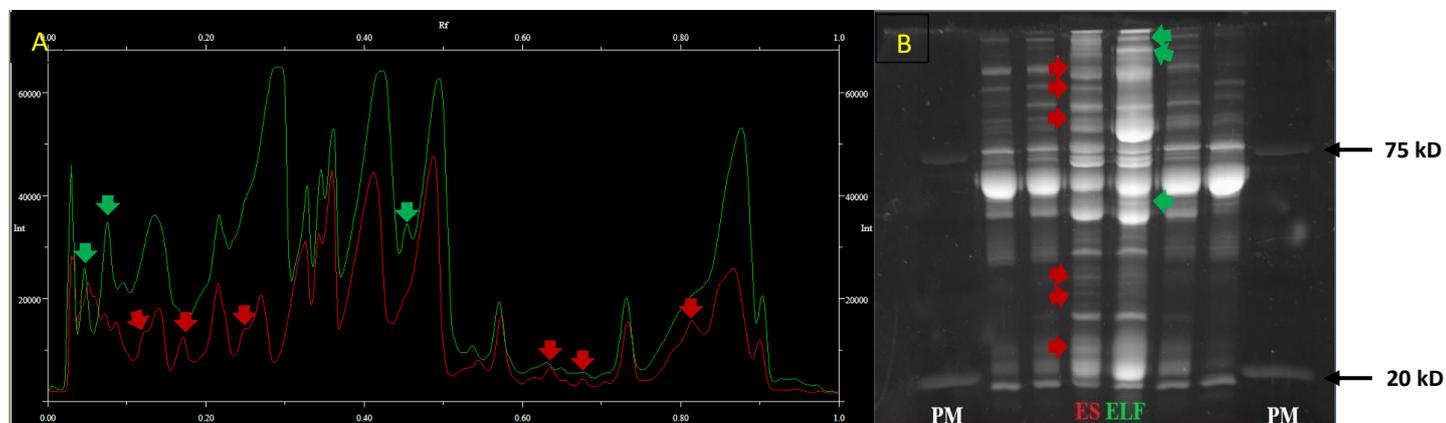


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las proteínas presentes en muestras de suero y líquido folicular. A. Representación gráfica del patrón de proteínas de la muestra de exosomas de suero (ES) en rojo y de la muestra de exosomas de líquido folicular (ELF) en verde. B. Electroforesis de las proteínas del suero de la donante 5789 y del líquido folicular de la donante 190402. Las diferencias entre ambas muestras aparecen señaladas con flechas, existiendo un total de 9 diferencias.

Expresión del contenido de exosomas de diferentes grupos de mujeres

Tras analizar si existen o no diferencias en el contenido proteico de exosomas de suero y líquido folicular, de donantes de ovocitos, se comprobó si existían diferencias entre el contenido de exosomas de líquido folicular, LF, obtenido a partir de mujeres con distinto diagnóstico de infertilidad.

En primer lugar, en la figura 4, se comparó el patrón de bandas encontrado en los exosomas de una donante (190402) y el de exosomas de una mujer mayor de 40 años (190423), D y >40. El número de bandas que difieren es de 5.

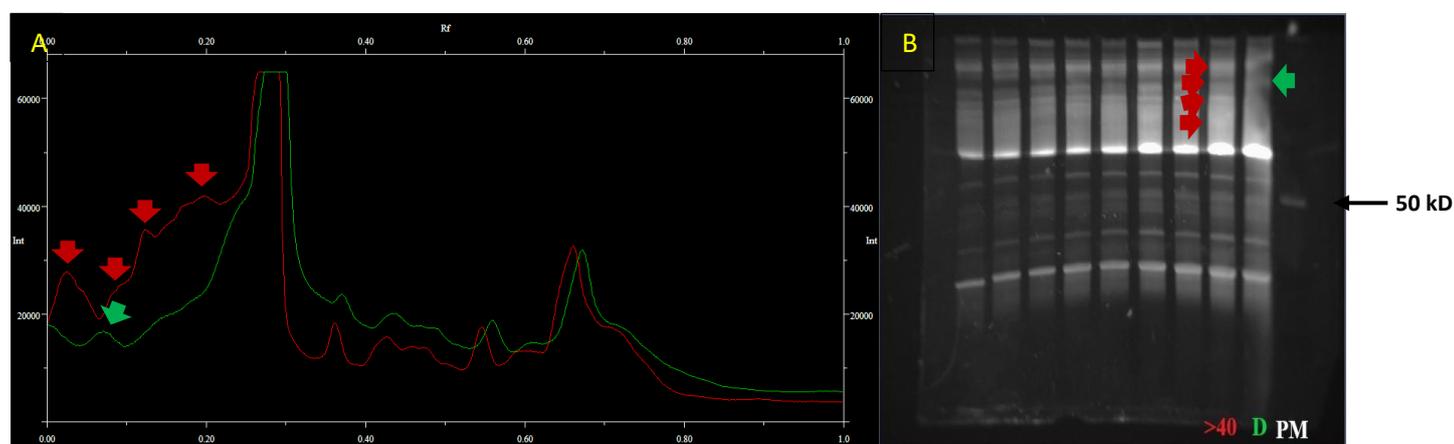


Figura 4. El panel de la derecha es una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las proteínas presentes en muestras de exosomas provenientes de líquido folicular. El panel de la izquierda es una representación gráfica del patrón de proteínas de la muestra de exosomas de una mujer mayor de 40 años (>40) en rojo y de la muestra de exosomas de una mujer donante (D) en verde. Las diferencias entre ambas muestras aparecen señaladas con flechas, existiendo un total de 5 diferencias.

En segundo lugar, en la figura 5, los patrones de bandas que se compararon fueron los que se correspondían con exosomas de una donante (190402) y los exosomas de una mujer con baja respuesta ovárica (190508), D y PR. Las diferencias que se dan suman un total de 7.

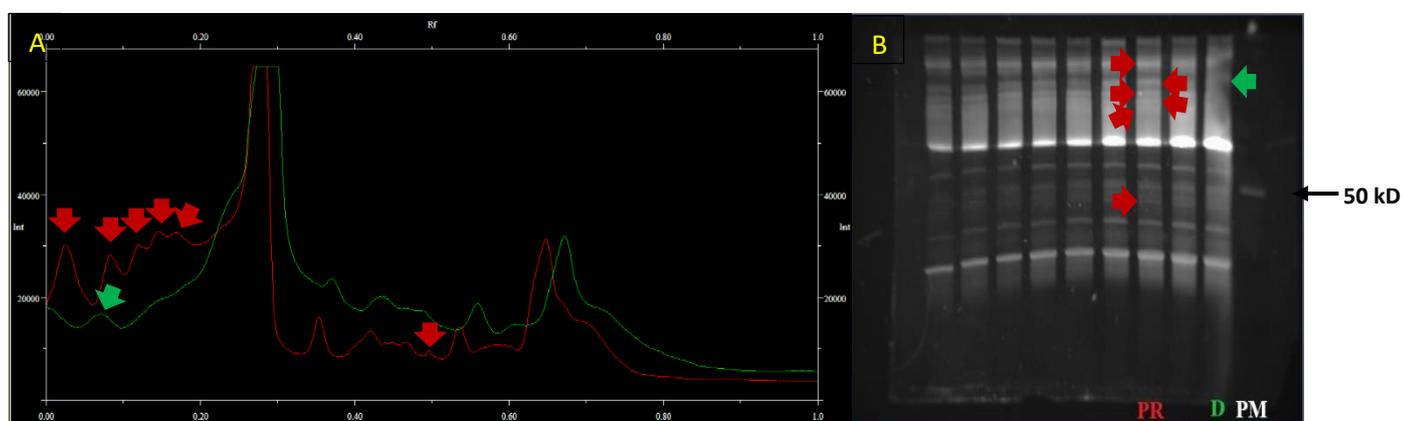


Figura 5. El panel de la derecha es una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las proteínas presentes en muestras de exosomas provenientes de líquido folicular. El panel de la izquierda es una representación gráfica del patrón de proteínas de la muestra de exosomas de una mujer con baja respuesta ovárica (PR) en rojo y de la muestra de exosomas de una mujer donante (D) en verde. Las diferencias entre ambas muestras aparecen señaladas con flechas, existiendo un total de 7 diferencias.

En tercer y último lugar, en la figura 6, se comparó el patrón de bandas de exosomas de una mujer mayor de 40 años (190423) con el de exosomas de una mujer con baja respuesta ovárica (190508). El número de diferencias entre bandas que aparece en este caso es un total de 4.

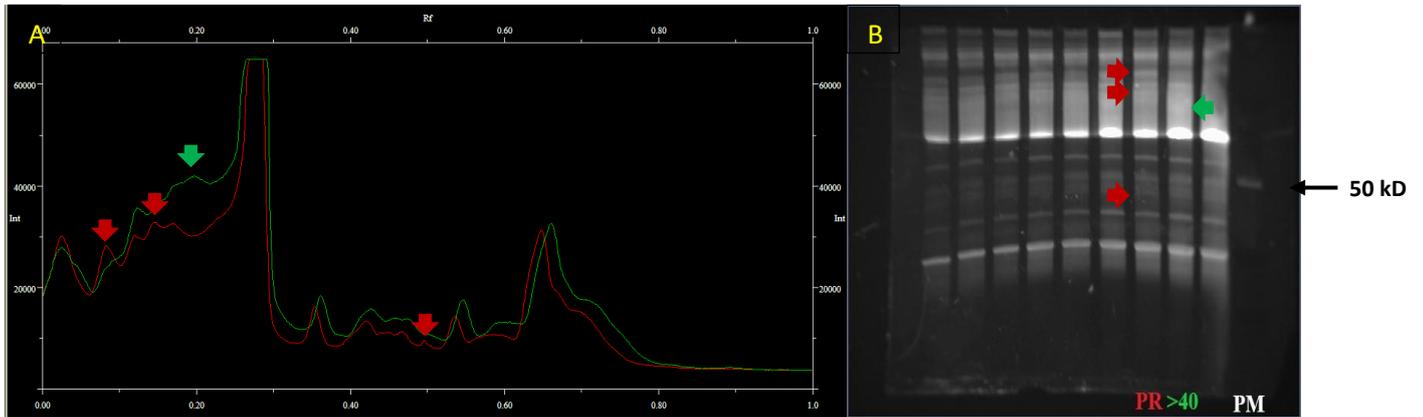


Figura 6. El panel de la derecha es una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las proteínas presentes en muestras de exosomas provenientes de líquido folicular. El panel de la izquierda es una representación gráfica del patrón de proteínas de la muestra de exosomas de una mujer con baja respuesta ovárica (PR) en rojo y de la muestra de exosomas de una mujer mayor de años (>40) en verde. Las diferencias entre ambas muestras aparecen señaladas con flechas, existiendo un total de 4 diferencias.

Discusión

Discusión

Expresión del contenido en muestras de suero y líquido folicular en donantes

En vista de los resultados, el análisis comparativo de la expresión de proteínas presentes en suero fresco y líquido folicular fresco mostró que existen algunas diferencias entre ambas muestras. Esto es totalmente lógico teniendo en cuenta que la composición es diferente ya que provienen de ambientes totalmente distintos.

En el caso de la comparación entre la expresión de proteínas que se encuentran en muestras de suero purificado y líquido folicular purificado, se observa que también existen diferencias, y por el mismo motivo que el caso anterior, es de esperar.

Respecto a la expresión de proteínas contenidas en exosomas de suero y de líquido folicular, que constituyen el foco de atención, los resultados arrojan que efectivamente existen diferencias en función de la proveniencia de los exosomas. Se trata, además, del mayor número de diferencias obtenido en las tres comparaciones realizadas, constituyendo casi el doble de las obtenidas en la comparación de suero fresco y líquido folicular fresco, y más del doble de las encontradas al comparar suero purificado y líquido folicular purificado.

Se ha comprobado que los exosomas se emplean para deshacerse de los desechos y de las sustancias tóxicas celulares. La infección provocada por intoxicación con priones puede ocurrir a través de vías como la exposición dietética, procedimientos médicos y transfusión de sangre. Isoformas anormales de la proteína priónica fueron aisladas a partir de exosomas, y este hecho se relaciona con el empleo, por parte de las células, de los exosomas como un mecanismo a través del cual pueden deshacerse de proteínas tóxicas [17]. En base a hechos como este y a las diferencias obtenidas al comparar muestras de suero y líquido folicular de donantes, los exosomas, además de ser empleados por las células como mecanismos de expulsión de desecho, también podrían ser utilizados como mecanismos de comunicación intercelular pues tanto el líquido folicular como el suero provienen de donantes sanas, y al ser así no tendrían por qué presentar tantas diferencias en el contenido de proteínas de su carga como ocurre cuando se compara líquido folicular fresco con suero fresco, y líquido folicular purificado con suero purificado.

De esta forma los exosomas podrían presentar diferencias en su carga debido a que en ambientes distintos están implicados en funciones relacionadas con la actividad de las células propias de los distintos ambientes, pudiendo constituir así mecanismos de comunicación celular como se cree [7].

Expresión del contenido de exosomas de diferentes grupos de mujeres

Al analizar los resultados obtenidos tras comparar las proteínas presentes en la carga de exosomas de líquido folicular y de distintos grupos de mujeres, se observa que en todas las comparaciones realizadas se dan diferencias.

El líquido folicular deriva de los componentes del plasma circulante que cruza la barrera sanguíneo-folicular a través de los capilares de la teca, de los productos de las células granulosas y de las células tecales, donde se incluyen hormonas, proteínas, aminoácidos y factores antiapoptóticos. Este ha sido reconocido como una fuente de factores bioquímicos que pueden ser predictivos de la calidad de los ovocitos [14], por lo tanto, es lógico pensar que los productos contenidos dentro del líquido folicular juegan un papel importante en el crecimiento del folículo y la maduración de los ovocitos. Estudios revelaron que el líquido folicular es un producto tanto del plasma sanguíneo como de la actividad secretora de las células de granulosa [15,16]. La comunicación bidireccional entre gametos y células granulosas en el folículo ocurre de forma directa a través de una red de uniones comunicantes o a través de factores de señalización paracrin, autocrinos y endocrinos en el fluido folicular. Estas interacciones son críticas para el crecimiento folicular normal, la proliferación y diferenciación de células granulosas, la maduración de los ovocitos y la fertilidad [8]. Es aquí donde entran en juego los exosomas. Se consideraba y aún se considera que los exosomas son utilizados por las células para deshacerse de los desechos que se generan en la actividad celular [7,17], pero además de eso, estudios recientes ha determinado que también podrían estar actuando como un mecanismo adicional de transmisión y control en el proceso reproductivo ya que en su carga presentan moléculas que se prevé que pueden estar relacionadas con el crecimiento folicular y la maduración de ovocitos. Uno de los tipos de moléculas presentes son los miRNA que se piensa que podrían dirigirse a elementos clave como la transformación del factor de crecimiento beta (TGF β) que se expresa en el ovocito desde etapas tempranas siendo responsable precisamente del crecimiento folicular y la maduración de los ovocitos [6]. En base a este y otros datos similares obtenidos en varios estudios, se quiso indagar en el contenido de la carga exosomal para dilucidar si, en diferentes condiciones, transportan moléculas distintas.

En este caso las comparaciones se realizan en base a la expresión de proteínas presentes en exosomas. En primer lugar, al realizar la comparación entre una donante y una mujer mayor de 40 años, se obtuvieron 5 diferencias. Se trata de situaciones en las que el estado fisiológico celular no es el mismo ya que, como se ha explicado anteriormente, una edad avanzada provoca un declive fisiológico. En mujeres mayores de 40 años, cuando se someten a tratamientos de reproducción asistida, en muchos casos obtienen resultados satisfactorios, ya que en un estudio

el 62,5 % de las mujeres mayores de 40 años habían tenido descendencia viva o bien se presentaban un embarazo en curso [13] lo que determina que lo que influye no es en sí la edad de la mujer, sino que es la edad del óvulo la que va a influir principalmente [9,13]. Una edad avanzada lo que provoca es que el óvulo no complete la primera división meiótica normal de forma eficaz, esto puede ser debido al envejecimiento citoplasmático que a su vez puede ser promovido porque la actividad llevada a cabo en las mitocondrias para obtener energía se reduce [9]. En un estudio realizado en el que se comparaba el contenido de miRNAs en exosomas de líquido folicular de yeguas jóvenes y yeguas viejas, los resultados que se obtuvieron fueron un total de 22 mRNA en las jóvenes y 14 miRNA en las viejas. Además, se observó que 14 miRNA se encontraban exclusivamente en los exosomas de las jóvenes, y lo mismo sucedió con 5 miRNA presentes solo en las viejas [12]. En ese estudio las diferencias encontradas se dan entre miRNAs, y en el caso de este trabajo, donde lo que se estudia son las diferencias en la expresión de proteínas, efectivamente también obtenemos la presencia de diferencias.

En segundo lugar, al analizar los resultados que provienen de realizar una comparación entre donantes y mujeres con baja respuesta ovárica, el número de diferencias obtenidas fue 7, constituyendo la comparación en la que más diferencias se hallaron. Así, se analiza el contenido de la carga de exosomas de dos muestras que, aunque provengan de líquido folicular, su estado fisiológico celular varía pues el estado folicular no es el mismo en una donante fértil y en condiciones que se suponen son las ideales que en una mujer cuya fertilidad se encuentra reducida por una baja respuesta ovárica. Recientemente se ha propuesto que los niveles del factor de células madre, SCF, en el líquido folicular pueden afectar la foliculogénesis y la ovulación posterior ya que este se trata de un factor de crecimiento de citoquinas producido en la fase folicular humana inmediatamente antes de la fase ovulatoria [10]. Un informe reciente ha demostrado que, en los ciclos de reproducción asistida a mujeres con baja respuesta ovárica, los niveles del factor de células madre en el líquido folicular fueron significativamente mayores en el líquido folicular de pacientes en los que se recuperó al menos un ovocito en comparación con aquellos en los que no se encontró ningún ovocito [18]. De esta forma, como mismo en esta patología los niveles del factor de células madre varía, también podría hacerlo el contenido proteico celular en exosomas, siendo los resultados obtenidos datos que lo corroboran ya que revelan que efectivamente la expresión de proteínas es diferente en mujeres con patologías que en mujeres sanas.

En último lugar, cuando se observan las diferencias que se dan al comparar la expresión de proteínas en exosomas presentes en el líquido folicular de mujeres mayores de 40 años frente

a la de mujeres con baja respuesta ovárica, a pesar de que ambas situaciones coinciden al presentar una disminución de la fertilidad, encontramos 4 diferencias. Esto es así porque el origen de la fertilidad reducida nada tiene que ver en ambos casos, pues en el caso de mujeres mayores de 40 años es lo que cabe esperar ya que la edad afecta de forma negativa siendo el factor desencadenante, y en el caso de mujeres con baja respuesta ovárica la explicación de esta reducción de la fertilidad se debe a que alguna patología afecta de forma sistémica a ciertos grupos de células.

Si se analizan las características de las mujeres con las que se llevaron a cabo las comparaciones de la expresión de proteínas en exosomas de líquido folicular, es lógico que el mayor número de diferencias se haya obtenido al comparar una donante y una mujer con baja respuesta ovárica, pues las mujeres de 40 años, tienen la fertilidad reducida pero están sanas, el único factor desencadenante es la edad, las mujeres con baja respuesta ovárica tienen fertilidad reducida, y presentan alguna patología y las donantes presentan las condiciones ideales, es decir, están sanas y son fértiles. De esta forma, si tenemos en cuenta que de las comparaciones realizadas la más que presenta diferencias entre la carga de sus exosomas es la de donantes y mujeres con baja respuesta ovárica coincidiendo este caso con el que mayores diferencias entre grupos se dan, al igual que el hecho de que en todas las comparaciones realizadas existan diferencias, en mayor o menor medida, se ve que para cada situación se da un perfil molecular específico con patrones diferenciales en la carga de los exosomas, lo que refuerza la idea de que efectivamente los exosomas son empleados por las células en procesos de comunicación intercelular [7]

Conclusiones

Conclusiones:

1. Existen diferencias en el patrón de bandas de exosomas aislados de suero y líquido folicular de donantes de ovocitos.
2. En mujeres con diferente diagnóstico de infertilidad, mayores de 40 años y baja respuesta ovárica, y donantes de ovocitos, el contenido de proteínas de los exosomas aislados de líquido folicular varía.

Conclusions:

1. There are differences in the pattern of isolated exosome bands from serum and follicular fluid from oocyte donors.
2. In women with different infertility diagnostics, over 40 years old and with poor ovarian response, and oocytes donors, the protein content of isolated exosomes from follicular fluid changes.

Bibliografía

Bibliografía

- [1] **Fernández-Tresguerres Hernández, J., Ariznavarreta Ruiz, C. and Alfaro González, V.** (2010). *Fisiología humana*. 1st ed. México, D.F: McGraw-Hill-Interamericana.
- [2] **Huiqun Yin, Hong Jiang*, Ruibing He, Cunli Wang, Jie Zhu, Zhenyi.** (2019). Cumulative live birth rate of advanced-age women more than 40 with or without poor ovarian response. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 58(2019) 201-205.
- [3] **Julio Ávila, PhD^{1,2}, Rebeca González-Fernández, PhD¹, Deborah Rotoli, PhD^{1,3}, Jairo Hernández, PhD⁴, Angela Palumbo, MD, PhD^{4,5}.** (2016). Oxidative Stress in Granulosa-Lutein Cells From In Vitro Fertilization Patients. *Reproductive Sciences*, 23(12), 1656-1661.
- [4] **A.P. Ferraretti^{1,*}, A. La Marca², B.C.J.M. Fauser³, B. Tarlatzis⁴, G. Nargund⁵, and L. Gianaroli¹.** (2011). ESHRE consensus on the definition of ‘poor response’ to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criterio. *Human Reproduction*, 26(7), 1616-1624.
- [5] **Giuliana Baccino, José Luis Gómez Palomares, Rosa Tury Federico Pérez Milán.** (2012). Guía para pacientes sin hijos. *Sociedad Española de Fertilidad*.
- [6] **Francesca Andronico,¹ Rosalia Battaglia,^{1,*} Marco Ragusa,^{1,2} Davide Barbagallo,¹ Michele Purrello,¹ Cinzia Di Pietro^{1,*}.** (2019). Extracellular Vesicles in Human Oogenesis and Implantation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2162.
- [7] **Nina Pettersen Hessvik^{1,2}, Alicia Llorente^{1,2}.** (2017). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences* 10(1007), 00018-017-2595-9.
- [8] **Stahl PD¹, Raposo G^{2,3}.** (2019). Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology (Bethesda)*, (34)3, 169-177.
- [9] **Santiago Brugo-Olmedo, M.D.*, Claudio Chillik, M.D., Susana Kopelman, M.D.** (2003). Infertility: causes and definition. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 54(4).
- [10] **Salmassi A, Zorn S, Mettler L, Koch K, Jonat W, Schmutzler AG** (2011) Circulating concentration of stem cell factor in serum of stimulated IVF patients. *Reprod Biomed Online* 22:140–147
- [11] **Isaac Cohen Corcía.** (2015). *Marcadores de la exposición a tóxicos en líquido folicular de pacientes estériles, sometidas a FIV y su relación con la tasa de gestación.* (Tesis Doctoral) UMA, Málaga.
- [12] **Juliano C. da Silveira, D.N. Rao Veeramachaneni, Quinton A. Winger, Elaine M. Carnevale, and Gerrit J. Bouma2.** (2012). Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle. *Biology of reproduction*, 86(3);71, 1-10.
- [13] **Sauer, M. V., Paulson, R. J., & Lobo, R. A.** (1990). A Preliminary Report on Oocyte Donation Extending Reproductive Potential to Women over 40. *New England Journal of Medicine*, 323(17), 1157–1160.
- [14] **Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P.** (2009) Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*, 7:40.
- [15] **Fortune JE.** (1994) Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod*, 50, 225–232.
- [16] **Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF.** (2010) Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction* 82, 1021–1029.
- [17] **Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M., & Hill, A. F.** (2012). Exosomes: Vehicles for the Transfer of Toxic Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases? *Frontiers in Physiology*, 3.
- [18] **Gizzo S, Quaranta M, Andrisani A, Bordin L, Vitagliano A, Esposito F et al** (2016) Serum stem cell factor assay in elderly poor responder patients undergoing IVF: a new biomarker to customize follicle aspiration cycle by cycle. *Reprod Sci* 23:61–68

Páginas webs consultadas:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

<https://www.investigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/73/posts/exosomas-la-nueva-panacea-de-los-biomarcadores-13470>

[https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(18\)30440-0/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(18)30440-0/fulltext)

<http://www.c4c.cl/portafolio-biotecnologico/>