

GRADO EN BIOLOGÍA
TRABAJO FIN DE GRADO
Julio 2020

Proyecto de estudio de la variación de los niveles de
estrés oxidativo en diferentes causas de infertilidad
femenina

Autor: Alicia Méndez González

Tutor: Julio Tomás Ávila Marrero

Cotutor: Rita Marleny Martín Ramírez

Índice

1	Introducción	1
1.1	El ovario	1
1.2	Patologías relacionadas con infertilidad femenina	5
1.3	Técnicas de reproducción asistida (ARTs)	8
1.4	Estrés oxidativo	10
2	Objetivos e hipótesis	12
3	Metodología	13
3.1	Selección y clasificación de las muestras	13
3.2	Purificación de muestras	14
3.3	Análisis de los sistemas de defensa frente a ROS	15
3.4	Análisis de los sistemas de reparación frente a ROS	19
3.5	Análisis de datos	20
4	Diseño experimental	20
4.1	Recogida de muestras y cuantificación de sistema de defensa	21
4.2	Análisis de los sistemas de reparación	22
4.3	Análisis estadístico	22
4.4	Edición de memoria	22
5	Resultados esperables	23
5.1	Análisis de sistemas de defensa frente a estrés oxidativo	23
5.2	Análisis de sistemas de reparación frente a estrés oxidativo	25
5.3	Interés clínico de los resultados	26
6	Nuevas rutas y líneas de investigación	27
7	Conclusiones	27
8	Bibliografía	29

Resumen

El estrés oxidativo es causa de diversas patologías, incluyendo infertilidad en mujeres. Estudios realizados en el entorno ovárico han mostrado una clara implicación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la merma de la fertilidad femenina. Sin embargo, en la actualidad no se han llevado a cabo estudios comparativos que permitan la dilucidación de mecanismos no invasivos para conocer el estado del ovocito sin su directa manipulación.

Este proyecto tiene como finalidad establecer los múltiples escenarios de estrés oxidativo entre las distintas causas de infertilidad para la obtención de nuevas técnicas o mejoras para aumentar la tasa de éxito de las técnicas de reproducción asistidas (ARTs). De este modo, se plantea un estudio de los niveles de antioxidantes y de derivados de ROS para la determinación de los sistemas de defensa celulares, así como el análisis de los sistemas de reparación por medio de la cuantificación del daño en el DNA en mujeres con distintas causas de infertilidad.

Palabras clave: ARTs, ROS, endometriosis, PCOS, BRO, granulosa, ovocito, infertilidad.

Abstract

Oxidative stress is the cause of various pathologies, including causes of infertility in women. Studies carried out on in ovaric envionment the have shown a clear implication of reactive oxygen species (ROS) in the loss of fertility. However, comparatives studies which allow the elucidation of non-invasive mechanisms about the oocyte state have not been carried out.

This project aims to investigate the different oxidative stress scenarios among the different causes of infertility in order to obtain new techniques or improvements to increase the success rate of assisted reproductive techniques (ARTs). Therefore, this proposal is intended to study the levels of antioxidants and ROS derivatives for the determination of cellular defense systems, as well as the analysis of repair systems by quantifying DNA damage in women with different infertility diagnosis.

Key words: ARTs, ROS, endometriosis, PCOS, PR, granulosa, oocyte, infertility

1 Introducción

La función reproductiva femenina, llevada a cabo principalmente por el ovario, tiene lugar como una sucesión de ciclos con periodicidad mensual, denominado ciclo menstrual; empieza entre los 9 y los 14 años, menarca, y finaliza entre los 45 y los 55 años, menopausia o climaterio. Entre estos dos sucesos, o fase fértil de la mujer, el ciclo menstrual tiene una periodicidad de entre 28 y 30 días (Ross-Kayne-Pawlina, 4ª Edición).

1.1 El ovario

Los ovarios son órganos pares, de color blanco-rosado y fijados a la superficie posterior del ligamento ancho del útero, a través de un pliegue peritoneal denominado mesoovario (Ilustración 1).

En cuanto a su estructura, externamente tiene forma de almendra de 3 cm de largo, 1,5 cm de ancho y 1 cm de espesor. Internamente se pueden distinguir dos zonas: corteza y médula. La región medular está constituida por tejido conjuntivo laxo, nervios, vasos linfáticos y vasos sanguíneos de gran calibre relativo (Ross-Kayne-Pawlina, 4ª Edición).

Los ovarios tienen como funciones principales e interrelacionadas:

- La producción de gametos.
- La producción de hormonas esteroideas.



Ilustración 1 - Dibujo anatómico del aparato reproductor femenino en un corte próximo al eje axial. Fuente: Imagen propia

FUNCIÓN GAMÉTICA

Tiene lugar en la corteza ovárica, esta función en la formación de un conjunto celular, folículo, que consta de un ovocito (gameto) y células anejas (pertenecientes a los tipos celulares que conforman el folículo ovárico) que mantienen y protegen al primero. Estos folículos, a diferencia de lo que ocurre en el aparato genital masculino, no son de

nueva síntesis o síntesis continua, sino que en el desarrollo fetal se produce un número limitado, permaneciendo detenidos en la primera división meiótica (Ross-Kayne-Pawlina, 4ª Edición).

Desde el punto de vista del estado de desarrollo del ovocito, existen tres tipos identificables: en primer lugar, se encuentra la vesícula germinal (VG), formada en el desarrollo fetal y es el estado de parada en profase I hasta la pubertad; en segundo lugar, la fase MI es el estado en el cual el ovocito ha completado la primera división meiótica. Por último, la fase MII es el estado de máximo desarrollo, apto para la fecundación (Ross-Kayne-Pawlina, 4ª Edición).

Conteniendo al ovocito se encuentran las células foliculares, las cuales sufren un proceso de desarrollo conocido como foliculogénesis. El desarrollo folicular presenta, a su vez, 5 estados de madurez diferenciados y la ovulación:

- **Folículo primordial:** Es el estado de parada del folículo hasta la pubertad. Se caracteriza por la presencia, alrededor del ovocito, de una capa de células aplanadas con lámina basal.
- **Folículo primario:** Las células foliculares ganan espesor, pasando a formar una capa simple de células cúbicas. Etapa de formación de la zona pelúcida.
- **Folículo primario avanzado:** Las células foliculares forman la capa multiestratificada de la granulosa. Alrededor de la granulosa el tejido conjuntivo circundante ha formado las tecas interna (receptora y productora de señales) y externa (estructural).
- **Folículo secundario:** Viene determinado por el inicio de la formación del espacio antral.
- **Folículo maduro (de Graff):** El antro se ha formado del todo, dando un diámetro al conjunto de 10mm o más, y se ha diferenciado la corona radiante, rodeada a su vez por el disco prolífero (Ilustración 2).

Cuando el folículo está completamente desarrollado, se produce la ovulación, proceso por el cual el ovocito es expulsado como MII del ovario, rodeado de la zona pelúcida, la corona radiante y el cuerpo prolífero. El resto del folículo que permanece en el ovario degenera en un cuerpo lúteo (Ross-Kayne-Pawlina, 4ª Edición).

Es importante señalar que el ovocito no es una estructura solitaria, sino que el folículo maduro de forma conjunta mediante señales paracrinas. La granulosa, una de las capas del folículo, presenta una alta tasa de intercambio de señales con el ovocito y se

sabe que le proporciona nutrientes, por lo que las células de esta capa podrían actuar como un buen marcador del desarrollo ovocitario, ya que el estado de desarrollo de la granulosa correlaciona con el estado de maduración del ovocito (Buccione et al., 1990; Sobinoff et al., 2013; Su et al., 2009).

El presente estudio se basará en el análisis de las células de la granulosa. La elección de la capa granulosa (CG) como material de estudio, en lugar del uso directo del ovocito, radica en razones fisiológicas y éticas. Dado que la extracción de los ovocitos de la donante o de la paciente se realiza por medio de una punción, se obtiene de forma primaria una mezcla de tejidos y folículos. El oocito se recupera y utiliza en los procedimientos incluidos en las técnicas de reproducción asistida, no permitiéndose su manipulación ni uso con fines de investigación. Tanto los tejidos como las capas de células somáticas que forman el folículo no son de interés en los siguientes procedimientos de ARTs, por lo que se desechan, siendo esta la razón ética que permite su uso para investigación. Desde el punto de vista fisiológico, actualmente está ampliamente aceptado que el análisis de la granulosa permite conocer el estado del ovocito, ya que existe una compleja regulación entre ambos, incluyendo factores paracrinos procedentes de ambos tipos celulares, siendo mediada por proyecciones transzonales (TZP), que son extensiones de la célula granulosa hasta el ovocito, donde se encuentran uniones comunicantes y adherentes. (Li and Albertini, 2013).

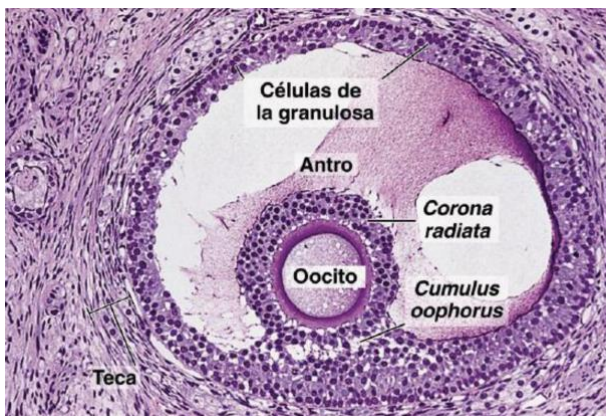


Ilustración 2 - Folículo de Graaf o folículo terciario.

Fuente: <http://files.histologiaunaj-es.webnode.es/200000019-b4011b5f2c/Te%C3%B3rico-Aparato%20genital%20femenino.pdf>

FUNCIÓN HORMONAL

La función hormonal del ovario está inmersa en un eje de regulación denominado el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, en este caso ovario. Este eje proporciona una regulación precisa, cuantitativa y temporal (Ross-Kayne-Pawlina, 4ª Edición).

Así, encontramos un primer grupo hormonal, el de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que estimula la secreción, por parte de la hipófisis, de hormonas gonadotropas, las cuales constituyen el segundo grupo hormonal. En este segundo grupo encontramos:

- **Hormona folículo estimulante (FSH):** Hormona con función estimuladora del desarrollo folicular. El receptor de FSH, localizado en las células de la granulosa, pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G.
- **Hormona Luteinizante (LH):** Propicia la ovulación y media en la función hormonal de los ovarios. Al igual que la FSH, su receptor pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y se localiza en las células de la capa granulosa.

Por último, en el tercer grupo nos encontramos a las hormonas sexuales femeninas, clasificadas como:

- **Estrógenos:** Promueven el crecimiento y la maduración de los órganos sexuales internos y externos, además de producir las características sexuales femeninas desarrolladas en la pubertad. Tienen acción en el desarrollo de las glándulas mamarias.
- **Progestágenos:** preparan los órganos sexuales internos, sobre todo el útero para el embarazo (desarrollo del endometrio). También preparan las glándulas mamarias para la lactancia, promoviendo a la proliferación de lobulillos.

(Ross-Kayne-Pawlina, 4ª Edición; Ariel Tarazona, 2010)

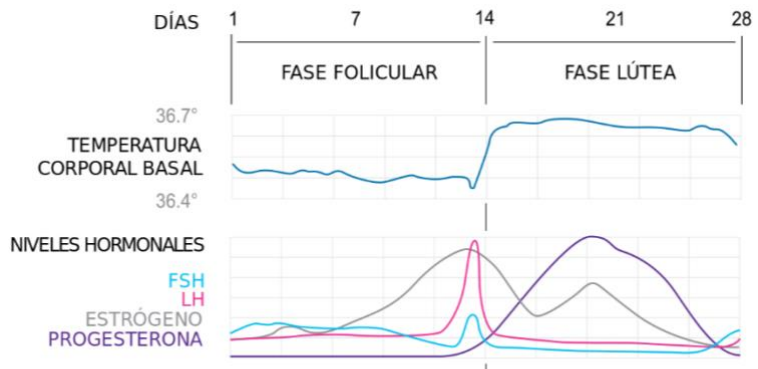
REGULACIÓN HORMONAL

La **regulación hormonal** del ovario se produce en ciclos mensuales, reiniciándose cada mes de la etapa fértil de la mujer (Esquema 1). (Ross-Kayne-Pawlina, 4ª Edición; Ariel Tarazona, 2010)

Cada uno de los ciclos de esta etapa se inician con un aumento progresivo en la producción de FSH, en primer lugar, y de LH, después. La producción adelantada de FSH estimula la foliculogénesis de un grupo de folículos primarios. La producción consecuente de estrógenos por los folículos iniciados estimula la **producción de receptores de FSH**, induciendo una retroalimentación positiva. La acción conjunta de la FSH y los estrógenos promueven la síntesis de **receptores de LH**.

El folículo que completará la foliculogénesis hasta óvulo es aquel con una mayor sensibilidad a la FSH, lo que induce la síntesis de inhibina, como feedback negativo, que regula la producción de FSH, parando el desarrollo de los demás folículos activos, lo que los vuelve atrésicos.

La ovulación (salida del ovocito a las trompas de Falopio) requiere de un pico tanto de FSH como de LH, cuya acción conjunta produce la rotura del folículo con la consecuente liberación del ovocito.



Esquema 1 - Variación de los niveles hormonales durante el ciclo menstrual. Fuente: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MenstrualCycle2_en.svg (free copy license)

Concretamente, el repentino

aumento de la LH produce un descenso de los niveles de estrógenos y la luteinización del resto folicular.

En cuanto al desarrollo del propio ovocito, se inician varios de ellos cada periodo, pero la meiosis I solo se produce por el ovocito dominante, activado y mediado por ROS (véase Estrés oxidativo), mientras que la meiosis II tiene lugar en presencia de antioxidantes. Existe, entonces, un balance complejo entre ROS y los antioxidantes, altamente preciso y regulado para asegurar la eficiencia reproductiva. El incremento de la producción de las hormonas esteroideas en el folículo en desarrollo provoca una mayor formación de ROS, por medio de P450. Estas ROS del folículo preovulatorio, en un ciclo sano son importantes en el proceso de la ovulación, ya que permiten la identificación y desarrollo del ovocito dominante, que derivará en óvulo maduro (M. A. Paine, 2013).

En su conjunto, dado que en el ovario es el centro productor de hormonas sexuales femeninas, se puede entender a este órgano como el principal regulador de la fertilidad femenina, como un reloj biológico cuya función es la de asegurar el éxito reproductivo.

1.2 Patologías relacionadas con infertilidad femenina

En el aparato genital femenino se han identificado patologías que producen infertilidad total o parcial. Ejemplos a desarrollar son: endometriosis, síndrome de ovario

poliquístico o baja respuesta ovárica. Cada una de estas patologías, aunque se encuentran en el entorno ovárico, afectan a distintos tipos de tejidos (Ana C. Pereira, 2014).

ENDOMETRIOSIS

La endometriosis es un desorden ginecológico benigno, dependiente de estrógenos y crónico, que se caracteriza por el crecimiento o desarrollo de tejido endometrial fuera del útero (Ilustraciones 3 y 4). Generalmente se localiza en los ovarios, pero puede afectar a otras superficies pelvianas. Con una afección entre el 6% y el 10% de las mujeres en edad reproductiva, es una causa de infertilidad y dolor pélvico (Agarwa, et al. 2012).

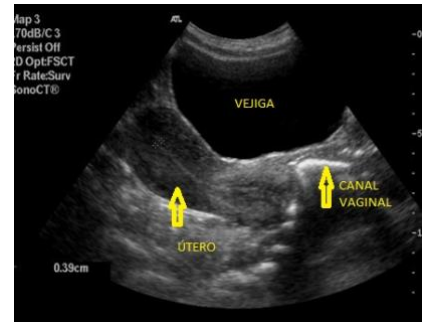


Ilustración 3 - Ecografía uterina sin endometriosis. Fuente:

<https://ecografiafacil.com/category/utero/>

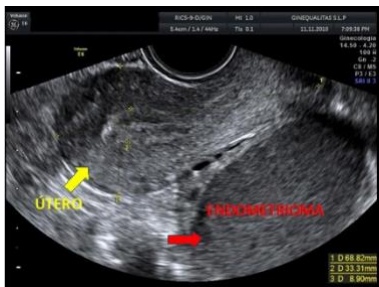


Ilustración 4 - Ecografía de un endometrioma periuterino. Fuente: <https://ginequalitas.com/ginecologia/problemas-ginecologicos/endometriosis.html>

No se trata de una enfermedad simple, sino que presenta características multifactoriales, ocasionando un incremento de ROS en el líquido peritoneal, por medio de marcadores, como malondialdehído, citoquinas proinflamatorias (como IL-6) o factores angiogénicos (como IL-8). Las dos últimas juegan un papel crucial en la activación de células fagocíticas, que son principales productores de ROS, además de especies reactivas de nitrógeno (RNS). (Agarwa, et al. 2012)

SINDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (PCOS)

Es la patología endocrina más común del aparato reproductivo de mujeres en fase fértil avanzada, con una prevalencia del 18%, de las cuales el 90% de las afectadas son incapaces de concebir. Está ocasionado por un incremento en la producción, por encima de valores normales, de hormonas sexuales masculinas (hiperandrogenismo) (Ilustraciones 5 y 6) (Agarwa, et al. 2012; Ana C. Pereira, 2014).



Ilustración 5 - Ecografía de un ovario sano. Fuente:

<https://www.chospab.es/miradorclinic>

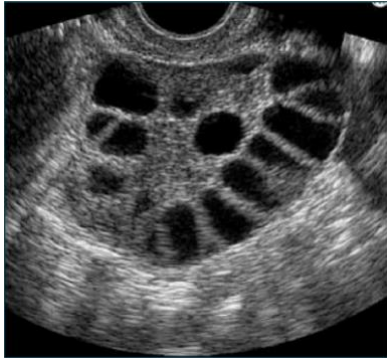


Ilustración 6 - Ecografía de un ovario con PCOS. Fuente:

<https://cerebrodigital.org/post/La->

Se asocia, también, a un descenso en la concentración de antioxidantes, incrementando los niveles de estrés oxidativo. El descenso en el consumo mitocondrial de O₂ y los altos niveles de GSH explican la disfuncionalidad de la mitocondria, desencadenando, en última instancia, la activación de la secreción de TNF-alfa, un importante mediador de la resistencia a la insulina, lo que contribuye a la aparición de hiperandrogenismo. (Ana C. Pereira, 2014).

BAJA RESPUESTA OVÁRICA (BRO)

La baja respuesta ovárica es el déficit de reacción del ovario ante un estímulo hormonal. Puede ser debido a un factor de edad, por lo que resulta más común en mujeres con edad reproductiva avanzada, o bien encontrarse en mujeres jóvenes debido a diversos factores etiológicos. Según Calogne et al., en pacientes con BRO se observa una concentración elevada de derivados de ROS como malondialdehído (MDA) que señala el posible papel del estrés oxidativo en el desarrollo de esta patología a pesar de que aún no se conozca el mecanismo de acción específico (Ana C. Pereira, 2014) (Jirge, 2016).

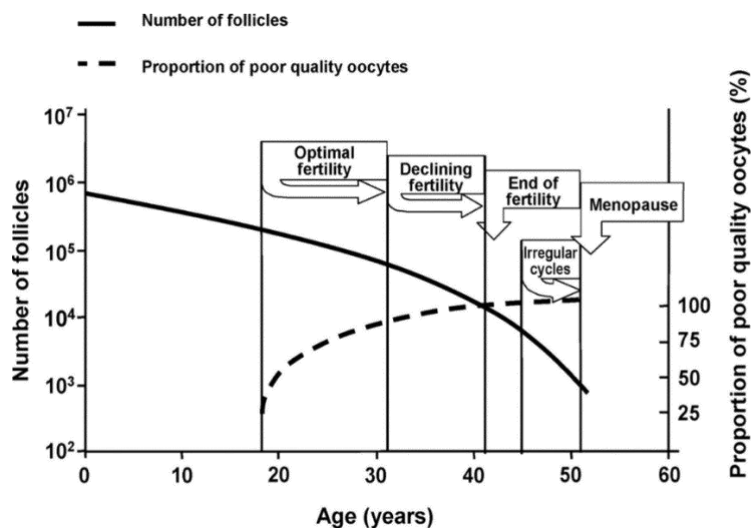
EDAD

El envejecimiento es un fenómeno fisiológico dependiente de factores tanto intrínsecos como extrínsecos a nivel orgánico. Entre los mecanismos intrínsecos podemos señalar la genética o el estrés oxidativo, mientras que en los factores extrínsecos podemos encontrar la higiene o el ambiente (esquema 2) (C.Jaeger, 2011).

Existen múltiples teorías sobre fenómeno fisiológico del envejecimiento, así como diversas conjugaciones de estas. Entre ellas, la teoría genética señala una serie de factores que influyen en la duración de la vida, como la degradación telomérica o las mutaciones no corregidas y acumuladas en el DNA. También encontramos otras teorías que aluden al estrés oxidativo como mecanismo predominante, argumentando que la

mayoría de los mecanismos necesarios para la vida presentan una toxicidad asociada (véase Estrés oxidativo, pág. 9). (C.Jaeger, 2011)

Un estudio con primates no humanos (NHPs) llevado a cabo por Si Wang et al. ha encontrado variaciones transcripcionales en varios tejidos del ovario relacionados con la edad, incluyendo al ovocito y a los tipos celulares que componen el folículo. Un análisis más detallado de los cambios transcripcionales asociados al envejecimiento específicos del tipo de células descubrió la alteración de la señalización antioxidante específica de los ovocitos y las células de la granulosa en etapa temprana, lo que indica un daño oxidativo como un factor crucial en el deterioro funcional de los ovarios con la edad (Si Wang, 2020).



Esquema 2 - Evolución del número de ovocitos de baja calidad y del número de folículos frente a la edad. Fuente: <https://academic.oup.com/edrv/article/30/5/465/2355057>

Por su parte, R. González-Fernández et al. analizó la expresión del gen ALDH3A2, codificante de una enzima importante en la detoxificación de aldehídos generados por la peroxidación lipídica, en mujeres con distintas patologías y edades. Se observó que en el análisis de mujeres sin patología ovárica la expresión del gen ALDH3A2 esta correlacionada positivamente con la edad, la dosis de FSH y LH, además de estar correlacionada negativamente con el número de ovocitos totales y maduros obtenidos. Esto indica un incremento en los niveles de estrés oxidativo a nivel ovárico, así como la consecuente degradación y pérdida de la eficacia reproductiva (Rebeca González-Fernández, 2015).

1.3 Técnicas de reproducción asistida (ARTs)

Teniendo en cuenta que la función ovárica puede verse influida por patologías que afectan y dificultan el proceso de reproducción, junto con la progresiva posposición de la maternidad, se ha hecho necesario el desarrollo de técnicas de reproducción asistida.

La Reproducción Asistida es el conjunto de técnicas y tratamientos médicos destinados a favorecer el embarazo en caso de problemas de fertilidad masculinos, femeninos o ambos. La existencia de patología que afecte a la fertilidad no siempre va a necesitar que las ARTs sean la primera opción a tener en cuenta, pues existen casos en los que su causa es un trastorno leve que puede ser solucionado con tratamientos más convencionales, como pueden ser las propias pastillas anticonceptivas para regular el periodo y el control de los días fértiles.

El primer paso para el tratamiento es la evaluación de esterilidad y el estudio de la mujer y la pareja, en caso de que la hubiese. Este estudio tiene como objetivo conocer, siempre que sea posible, la causa de la infertilidad, y al mismo tiempo, las condiciones de salud de las mujeres que tienen la intención de quedarse embarazadas.

1.3.1 Tratamientos

Inseminación artificial (IA)

Esta técnica básica va asociada a una estimulación basal del ovario mediante inyecciones subcutáneas diarias, durante 7-10 días, para asegurar que la ovulación ocurra un día determinado. Estas inyecciones son hormonales, produciendo un control sobre el momento de la ovulación. Las dosis dependen de cada mujer, siendo necesario realizar una evaluación médica de la paciente. En ese momento, el semen que ha sido previamente procesado para seleccionar los mejores espermatozoides, es introducido en el interior del útero mediante una cánula a través del cuello del útero.

Fecundación In Vitro Facilitada (FIV/ISCI)

La técnica FIV permite que el espermatozoide y el óvulo puedan unirse in vitro, fuera del aparato genital de la mujer. Necesita de una mayor estimulación (por medio de inyecciones hormonales) de los folículos del ovario para asegurar que al menos 3 de ellos puedan ser punzados para obtener óvulos. FIV/ISCI es una variante de la FIV en la que, en lugar de ser los espermatozoides los que por sí mismos penetran en el óvulo, solo uno de ellos es seleccionado para ser introducido mediante micromanipulación.

Transferencia

Procedimiento por el cual se introduce el embrión en el útero de la mujer en el punto óptimo de implantación o anidación, maximizando las probabilidades de éxito de embarazo.

1.3.2 Tratamientos complementarios

Los tratamientos de ARTs pueden estar complementados con el uso o no de otros protocolos, que se adapten a las necesidades de cada paciente y aumenten la probabilidad de éxito del tratamiento, a conocerse:

Ovodonación

Es complementario a las técnicas FIV o FIV/ISCI por medio de la cual la consecución del embrión se logra mediante óvulos sanos donados. El procedimiento implica encontrar una donante compatible con la paciente, atendiendo principalmente al grupo sanguíneo, para asegurar la implantación sin riesgo del embrión. Una vez seleccionada la donante, se procede a una técnica FIV, con la única variación de que la extracción de óvulos se practica en la donante, no directamente en la paciente.

Vitrificación

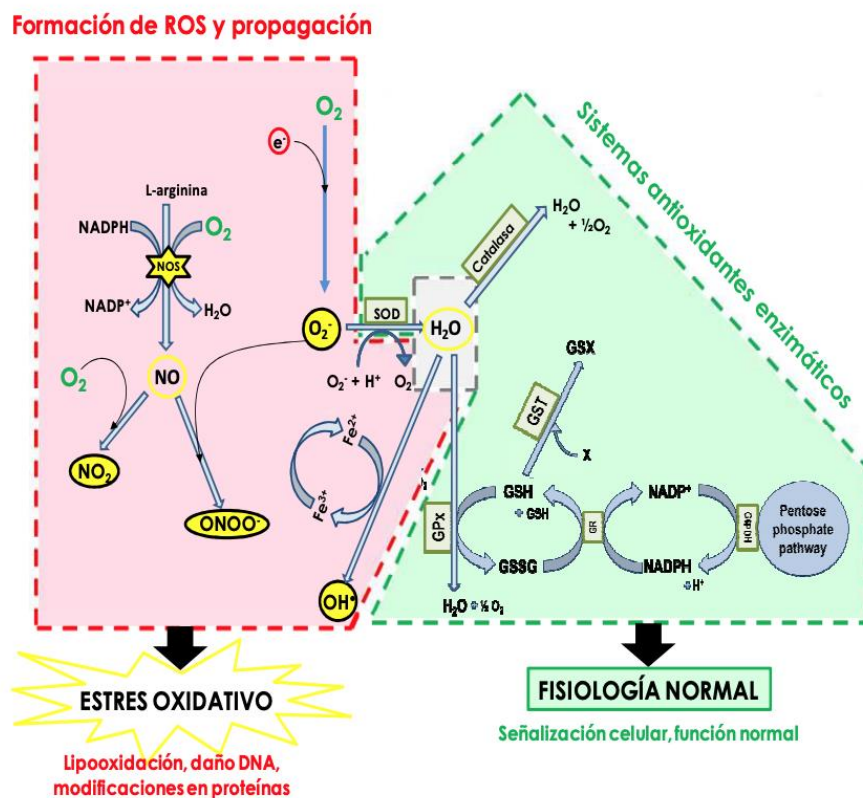
Procesos que permiten la preservación de embriones durante largos periodos de tiempo, realizando una rápida congelación de los mismos para minimizar el daño celular. Complementario a técnica FIV o FIV/ISCI.

1.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo designa una situación de desequilibrio entre ROS, RNS y agentes antioxidantes, favoreciendo a las primeras (esquema 3). Las ROS incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular, como por ejemplo en la respiración celular. Sin embargo, la pérdida de homeostasis puede aumentar en gran medida los niveles de ROS, lo cual puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares. (Breña, 2017; Cimadevilla, 2015)

Las RNS son una familia de moléculas derivadas del óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) producido por la actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS_2). Son producidas en animales a través de la reacción del óxido nítrico con superóxido para formar peroxinitrito. Actúan en conjunto con las especies reactivas del oxígeno en el daño celular, provocando estrés nitrosativo. (Squadritoa & Pryor, 1998)).

Estas moléculas tienen funciones metabólicas relevantes como la activación de diversos factores de transcripción dependientes de redox, como Nrf2, cuando se encuentran en homeostasis. Sin embargo, cuando ésta se pierde, las RNS tienden a generar modificaciones que inducen a la aparición de patologías diversas (desde diabetes hasta patologías relacionadas con la infertilidad), causando daño en un gran abanico de macromoléculas (DNA, lípidos, proteínas u carbohidratos), derivando en procesos como el incremento de calcio en el espacio citosólico, desintegración del citoesqueleto, agotamiento de ATP o la apoptosis, desarrollando diversas patologías en relación al tejido y al sistema implicados. (Rocía Núñez-Calonge, 2016)



Esquema 3 - Esquema de la producción de ROS y de las principales vías enzimáticas antioxidantes. Fuente: https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/24264/TESIS_MEIJIIDE_DE%20LA%20FUENTE_SUSANA.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Estrés oxidativo en el entorno ovárico

La tendencia a posponer la maternidad está haciendo visible el problema del envejecimiento ovárico y sus efectos en la fertilidad femenina, lo que ha promovido estudios al respecto, así como el desarrollo de ARTs.

En un inicio se estableció como causa principal de infertilidad la disminución de la reserva ovárica con los ciclos y la atresia derivada de la edad, es decir, se trataba de una causa cuantitativa. Sin embargo, en estudios posteriores se observó una disminución de la capacidad de fecundación y de desarrollo de embriones viables directamente relacionada con la edad, es decir, la calidad de la producción ovárica, en paralelo a la cantidad de folículos disponibles, que disminuye con la edad. (C.Jaeger, 2011)

Cuando se planteó como principal causa del descenso de fertilidad femenina el envejecimiento ovárico, se dio pie a la investigación en el microambiente ovárico, buscando posibles implicaciones en el desarrollo del folículo y del ovocito. Entre los factores propuestos, son relevantes para este trabajo las ROS y las RNS, al ser éstas tanto causa como consecuencia de perturbaciones energéticas y metabólicas.

Así, el envejecimiento puede entenderse como una acumulación de daños irreversibles en la integridad de las macromoléculas, induciéndose la pérdida de funciones primarias a raíz de la merma de homeostasis metabólica. (Agarwa, et al. 2012)

En este trabajo se analizarán las patologías relacionadas con la infertilidad femenina de forma comparativa en relación a los niveles de especies reactivas y al daño sufrido en el DNA de las células de la granulosa, considerándose esto como un factor relacionado con la respuesta a la estimulación ovárica en ARTs. Se pretende lograr una mejora en las ARTs por medio del desarrollo de procedimientos no invasivos que permitan conocer el estado del ovocito sin la necesidad de manipularlo directamente.

2 Objetivos e hipótesis

2.1 Hipótesis

El estrés oxidativo puede generar en el organismo, por medio de daño a macromoléculas esenciales de diverso tipo, un amplio espectro de patologías entre las que encontramos algunas causas de infertilidad. Concretamente en esto último, las vías de afección no están claras ni se han estudiado para un tipo de tejido concreto. Teniendo en cuenta todo esto y sabiendo que la capa granulosa (CG) está muy íntimamente en

contacto con el ovocito, se desea verificar el empleo de la CG como marcador para el estado oxidativo y metabólico del ovocito sin necesidad de manipular directamente a este último, llevándose a cabo por medio del estudio comparativo de distintas patologías relacionadas con la infertilidad femenina.

2.2 Objetivos

Así, podemos definir los objetivos a desarrollar en el estudio:

OBJETIVO GENERAL

Analizar el nivel de estrés oxidativo en pacientes y donantes bajo estimulación ovárica con diferentes causas de infertilidad y su posible correlación con la respuesta al tratamiento y la calidad ovocitaria, con el fin último de establecer mejoras en los protocolos de ARTs para el diagnóstico no invasivo del estado del ovocito.

OBJETIVOS CONCRETOS

- Estudiar el nivel de especies totales reactivas de oxígeno en células de granulosa purificadas de pacientes con PCOS, endometriosis, baja reserva, mayores de 40 años y jóvenes donantes de óvulos.
- Cuantificar el daño de DNA en las células de granulosa de las mismas pacientes.
- Realizar un estudio de correlación de los niveles de ROS y daño en el DNA con diferentes parámetros clínicos como edad, número de ovocitos recuperados, protocolo de estimulación o causa de infertilidad.

3 Metodología

Teniendo en cuenta todo lo establecido hasta ahora, la metodología a emplearse en el presente proyecto debe incluir los siguientes apartados:

3.1 Selección y clasificación de las muestras

Este proyecto se llevará a cabo con la colaboración del Centro de Fecundación In Vitro Ángela Palumbo (FIVAP), el cual proporcionará las muestras necesarias para el análisis, siguiendo la normativa del Comité de Ética de la Universidad de La Laguna,

siendo las mujeres que participan en el estudio conocedoras y consentidoras del empleo de sus muestras para el análisis.

Se establecerán grupos de estudio que compartan unas características comunes a fin de obtener resultados **homogéneos** que permitan el análisis de los datos. De este modo, debido a los objetivos planteados, se establecen los siguientes grupos de estudio:

- **Grupo control:**

En este grupo se incluyen a las donantes de ovocitos. Las características de este grupo vienen dadas por los parámetros aportados por el equipo de FIVAP entre los que encontramos a mujeres de entre 18 y 25 años de edad, sin factor ovárico.

- **Mujeres sin factor ovárico:**

Se incluyen aquí a aquellas muestras procedentes de mujeres que no presenten ninguna patología que cause infertilidad. Debe dividirse este grupo en dos: uno que conste de mujeres de entre 27 y 39 años, y otro formado mujeres de a partir de los 40 años (grupo que permitirá el estudio de la relación del estrés oxidativo con el envejecimiento).

- **Mujeres con patología causante de infertilidad**

Dentro de este grupo encontramos a mujeres a las cuales les ha sido diagnosticado algún tipo de infertilidad. Es de interés el estudio de las siguientes patologías: endometriosis, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y baja respuesta ovárica (BRO). Cada una de estas patologías se estudiarán como grupos separados, para facilitar la obtención de datos comparativos entre las distintas patologías. La caracterización y el diagnóstico vendrá dado por el estudio y escrutinio del equipo de la entidad colaboradora siguiendo los parámetros remarcados a continuación: para la endometriosis se siguen el consenso de la ASRM de 1997, mientras que para PCOS se emplea los parámetros proporcionados por ESHRE de 2004, y para BRO los aprobados por la ASRM en 2011. (ESHRE, 2004 ; ASRM, 1997 ; ASRM, 2011)

Se establecerá un tamaño muestral de entre 20-25 muestras por cada uno de los subgrupos de estudio, lo que hace necesario un total de entre 120 y 150 muestras para

ser analizadas. Estos números pueden variar en función del número de muestras disponibles y cedidas por la entidad colaboradora.

3.2 Purificación de muestras

Las muestras se obtendrán a partir de punciones ováricas. Debido a las características del propio procedimiento, el líquido folicular obtenido presentará diversos elementos entre los que se encuentran células epiteliales, células sanguíneas, células de la granulosa, etc. Es por esto que se hace necesario realizar un protocolo que permita la purificación de las células de la granulosa (CG).

El protocolo de purificación está basado en una serie de centrifugaciones, a través de las cuales se va eliminando las impurezas y se mantiene la viabilidad de las células de la granulosa. Para separar las células rojas de la sangre, se emplea un gradiente de Percol (Sigma) al 45%. Después de la centrifugación se recoge la interfase formada, que contiene las células de la granulosa, además de células de la línea blanca sanguínea, las cuales se eliminarán de la muestra por medio de DynaBeads M-450 CD45 (Invitrogen). Estas DynaBeads son partículas magnéticas recubiertas por CD45, un anticuerpo monoclonal que es expresado por todas las células nucleadas sanguíneas. Este procedimiento purifica las células de la granulosa, pero no es específico de células viables (vivas), por lo que tras la purificación se realizará un conteo de células viables por medio de una cámara Neubauer teñidas con Trypan Blue (Sigma), una sustancia capaz de teñir exclusivamente la membrana plasmática de las células senescentes.

Las muestras purificadas y viables que no se analicen inmediatamente serán procesadas según el experimento a aplicar.

3.3 Análisis de los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo

Dado que la homeostasis oxidativa en una célula depende del equilibrio entre producción de ROS y de los elementos de respuesta a los mismos, en este estudio se plantea el análisis por separado tanto de los niveles de los elementos antioxidantes como de ROS por separado:

Elementos antioxidantes de las muestras biológicas

Cuantificación de superóxido dismutasa-1 (SOD-1)

Esta enzima cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto, es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas a la oxidación. Superóxido es una de las principales especies reactivas del oxígeno en la célula y la SOD-1 tiene un papel fundamental como superoxidante, y catalizador de los radicales libres en el citoplasma. La importancia fisiológica de la SOD-1 es ilustrada por las severas patologías que se evidencian en ratones genéticamente modificados para que carezcan de esta enzima. La reacción catalizada por SOD-1 es extremadamente rápida, y la presencia de cantidades suficientes de enzimas en las células de los tejidos mantiene la concentración de superóxido muy baja. Por lo tanto, la cuantificación de la actividad SOD-1 es esencial para caracterizar completamente las capacidades antioxidantes de un sistema biológico. (McCords & Fridovich, 1969)

La cuantificación de SOD en las células se realizará por medio de un Western Blot. El método implica el uso de electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra. Las proteínas separadas se transfieren del gel a la superficie de una membrana. La membrana se expone a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio. La unión del anticuerpo se detecta usando un marcador químico. Se empleará anticuerpos policlonales anti-SOD (Superoxide Dismutase Polyclonal Antibody, HRP) de la casa comercial Rockland.

El ensayo proporciona una herramienta simple, reproducible, y rápida para análisis de la concentración de SOD-1 en los lisados celulares.

Cuantificación de catalasa (CAT)

La catalasa es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidorreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Esta enzima utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso. Así, cumple un papel vital en el metabolismo, eliminando especies altamente reactivas del oxígeno que pueden ser perjudiciales para las proteínas, los ácidos nucleicos y los lípidos de las células. (NCBI - National Center for Biotechnology Information Search database, 2020)

Al igual que con SOD-1, se realizará un análisis de la cantidad de CAT mediante un Western Blot usando anticuerpos policlonales anti-CAT, proveído por Invitrogen.

Capacidad oxidante de ROS en las muestras biológicas

Debido a que las ROS son un conjunto de moléculas altamente reactivas y con un tiempo de vida extremadamente corto, la cuantificación se realizará por medio de la determinación de sus derivados oxidados. La mayoría de los procesos de cuantificación de ROS, incluyendo el proceso que en este proyecto se propone utilizar, se basan en el uso de compuestos no fluorescentes que, en reacción con ROS, produzcan un compuesto con fluorescencia que permitan la fácil cuantificación.

Se selecciona como protocolo de cuantificación el kit comercial ROS Detection Cell-Based Assay Kit (DCFDA) de la casa comercial Cayman Chemical, el cual se basa en el empleo de 2,7-diclorofluorocin diacetato (DCFDA), que es un compuesto permeable a la membrana celular y sensible a redox, que, en presencia de ROS y algunos RNS, rinde 2,7-diclorofluoroceína, un producto fluorescente.

Por medio de este kit se desea conocer el balance de ROS frente a los niveles estudiados de CAT y SOD-1, obteniendo información del estado de los sistemas de defensa frente al estrés oxidativos en cada uno de los grupos de estudio.

Cuantificación de la expresión de CAT y SOD-1

Esta sección experimental del estudio tiene como fin la de comparar la expresión de los genes codificantes de CAT y SOD-1 frente a las concentraciones de estas enzimas. Para ello se recurrirá al mRNA de CAT y SOD-1. Para la cuantificación de la expresión se realizará una qRT-PCR haciendo uso de primers específicos para cada uno de los genes.

Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizará mediante el kit Aurum total RNA mini kit (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Síntesis de cDNA

Se hará uso del kit IScript cDNA Synthesis (BioRad) según instrucciones del fabricante, para la obtención del cDNA.

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

Este tipo de PCR permite visualizar el proceso de amplificación en todo momento y es mucho más sensible que la PCR convencional, debido a la utilización de un fluorocromo intercalante que es capaz de emitir fluorescencia cuando se une al DNA de doble cadena.

Usando el programa Omiga, se diseñarán oligonucleótidos específicos para la secuencia de humanos de cada uno de los genes estudiados (Tabla 1). Se incluye en este análisis la amplificación del gen β -actina como control positivo, ya que es un gen constitutivo, es decir, tiene niveles de expresión constante en todas las células y condiciones de un mismo organismo.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia(5'→3')	Tm(°C)
Catalasa	CAT-F	TTAATCCATTCGATCTCACC	55,0
	CAT-R	GCTATCTGTTCAACCTCAGC	55,1
Superóxido dismutasa I	SOD1-F	GATCTCACTCTCAGGAGACC	53,6
	SOD1-R	CCCAATTACACCACAAGC	54,8
β -actina	Act-F	CTTCCTTCTGGGCATGG	61,6
	Act-R	GCCGCCAGACAGCACTGT	63,7

Tabla 1 - Primers diseñados para la realización de la qRT-PCR.

Para la realización de este procedimiento se empleará el sistema CFX-96 (BioRad). Cada gen será analizado por triplicado en todas las muestras, comprobándose la formación de un producto único por pareja de cebadores mediante una curva de disociación, a realizarse mediante un calentamiento progresivo de las muestras desde los 59°C a los 95°C y tomando lecturas cada 0,5 segundos. Esto permite verificar la ausencia de señal fluorescente por contaminación de amplificaciones inespecíficas. La amplificación del cDNA se realizará siguiendo un protocolo que consta de 44 ciclos y con una temperatura de 59°C para el paso de alineamiento o annealing.

Cuantificación y determinación de la expresión génica

Una vez obtenidas las lecturas de la qRT-PCR, se empleará el método comparativo Cycle Threshold (método comparativo CT), a través del cual se determina el ciclo umbral (CT) para cada reacción llevada a cabo en la qRT-PCR.

De esta forma, CT es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base. A partir de los datos medios de CT se calcula la expresión relativa del gen a estudiar en cada condición con respecto a la expresión del mismo en el control mediante el método $2^{\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen, 2008).

3.4 Análisis de los sistemas de reparación frente a ROS

Determinación y cuantificación del daño en el DNA

El estrés oxidativo puede causar una reacción característica en las bases nitrogenadas que permite la cuantificación del daño causado por las ROS sobre esa macromolécula. Concretamente, se produce la oxidación de la guanina, dando lugar a la 8-oxoguanina (8-oxo-G) (Ilustración 7).

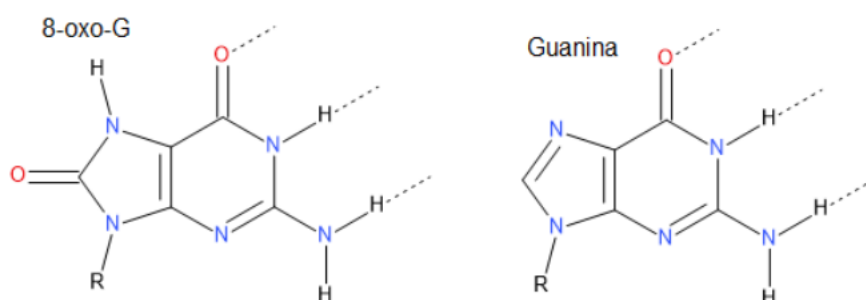


Ilustración 7 - Estructura de la 8-oxo-G (izquierda) frente a la Guanina (derecha). Fuente: [14]

Esta reacción será la base del estudio del daño en el DNA, por lo que se realizará la técnica de Inmunocitoquímica/Inmunofluorescencia (ICC/IF) por medio del anticuerpo proporcionado por la casa comercial Abcam Anti-DNA/RNA Damage antibody [15A3]. El interés de esta sección del proyecto es la observación del daño en las células de la granulosa en el momento de la toma de muestra, por lo que las muestras son de observación directa y las células no serán cultivadas, ya que esto puede alterar el daño en el DNA, falseando los resultados obtenidos.

Este protocolo necesita de la **adhesión** de las células a una superficie, para permitir la correcta exposición de la muestra a los anticuerpos a emplear para revelar el daño en el DNA. En este proyecto la adhesión se realizará por citocentrífuga, una variante

de sobremesa de la centrífuga, que es capaz de concentrar muestras biológicas sobre una plataforma visible al microscopio. La razón de una observación directa, sin cultivo, radica en la necesidad de alterar los datos lo menos posible, ya que se desea obtener la lectura del daño en el DNA de las células en el momento de la extracción.

Debido a que el componente a observar es nuclear, se realizará un primer paso de permeabilización seguido de la incubación con la solución de bloqueo. Tras el bloqueo se incubará la muestra en la misma solución con el anticuerpo específico durante 1 hora a temperatura ambiente y, a continuación, se realizarán 3 lavados de 10 minutos con PBST. La incubación con el anticuerpo secundario se realizará en la misma solución de bloqueo y en condiciones de oscuridad. La observación del daño en el DNA se realizará por medio de un microscopio confocal.

3.5 Análisis de datos

Se hará uso del software SPSS para la realización del análisis estadístico de los datos obtenidos en los experimentos, con el fin de confirmar o desmentir los resultados esperables.

Datos sobre los sistemas de defensa frente a ROS

Los datos obtenidos permitirán la configuración de gráficas que permitan la comparación de los niveles de antioxidantes y de ROS, así como la comparativa de éstas y entre los grupos de estudio. La lectura de los resultados obtenidos por el kit DCFDA se realizará con un lector de placas.

Para el análisis de la expresión génica de CAT y SOD-1 a partir de los datos medios de CT obtenidos, se calcula la expresión relativa respecto al gen de referencia de la β -actina de cada gen a estudiar en cada condición con respecto al control mediante el método $2^{\Delta\Delta CT}$.

Datos sobre los sistemas de reparación frente a ROS

Se empleará el software ImageJ para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia obtenida en la observación de muestras en microscopio confocal. Se seleccionarán células de la granulosa al azar, realizando un promedio de fluorescencia obtenida por muestra.

- Obtención de muestras.
- Purificación de las células de la CG.
- Realización de protocolos de cuantificación de CAT y SOD-1.
- Cuantificación de ROS.

En esta etapa, el número de muestras que se reservarán será de entorno a 10-12 por cada grupo de estudio, es decir, aproximadamente 60-72 muestras en total. La duración de esta etapa dependerá del periodo de recogida de las muestras, previéndose un tiempo de 2 meses para la obtención de la totalidad de las muestras necesarias, mientras que los protocolos experimentales ligados a este periodo tendrán una duración relativa, tomando como inicio la llegada de las primeras muestras y como final el análisis de las últimas que serán dedicadas a esta sección del proyecto, calculándose 1,5 meses. En este periodo se preservarán las muestras que se emplearán en el siguiente periodo

4.2 Periodo II - Análisis de los sistemas de reparación

Una vez finalizando la etapa de cuantificación del estrés oxidativo, las muestras que habían sido preservadas se prepararán para iniciar los dos protocolos restantes:

- Determinación de la expresión génica para CAT y SOD-1. Aunque este punto corresponde al análisis de los sistemas de defensa, organizativamente se realizarán en este periodo, con el fin de repartir la carga de trabajo y la aplicación de un número estable de protocolos simultáneos.
- Cuantificación del daño en el DNA debido al estrés oxidativo.

En esta etapa, las tareas se realizarán de forma simultánea, analizándose, por un lado, la expresión génica y, por otro, los preparativos de tinción inmunocitoquímica para el daño en el DNA. Este proceso requerirá de 1,5 meses para su realización.

4.3 Periodo III - Análisis estadístico

Una vez obtenidos todos los datos experimentales, se procederá al análisis de los resultados según las técnicas descritas en el apartado de Análisis de datos (pág. 20). Es decir, se contrastarán los resultados analíticos obtenidos con las hipótesis planteadas (véase Hipótesis y Objetivos) y se dilucidarán si se cumplen los resultados esperados. Este

periodo tendrá una duración estimada de 3 semanas, contando con correcciones o repetición de algún análisis.

4.4 Periodo IV – Edición de la memoria

Finalmente, se elaborará una memoria del proyecto, tomando en consideración los medios y el tiempo finalmente necesario y empleado, así como resultados obtenidos y conclusiones finales. Este proceso de edición tomará el tiempo restante del proyecto, con un máximo de un mes para su realización.

5 Resultados esperables

Como se ha comentado con anterioridad, el estrés oxidativo depende de la relación entre los niveles de antioxidantes y de ROS en la célula. Las diferentes causas de infertilidad a analizar en el presente proyecto han sido estudiadas previamente empleando diferentes líneas celulares, pertenecientes o no al ovario (Rebeca González-Fernández, 2015; Jirge, 2016; Ana C. Pereira, 2014; A. et al., 2012; al. Á. M., 2020). Se recuerda que el motivo de este proyecto es el de realizar un estudio comparado de estas causas de infertilidad, con el fin de elaborar un método no invasivo para conocer el estado del ovocito.

Teniendo en cuenta todo ello, el proyecto se desglosó en dos enfoques distintos, pero relacionados:

- Análisis del estado de sistemas de defensa celulares frente al estrés oxidativo.
- Análisis del estado de sistemas reparación ante daños en el DNA causados por el estrés oxidativo.

5.1 Análisis de sistemas de defensa frente a estrés oxidativo

Para el análisis de los sistemas de defensa se analizarán los datos obtenidos de los siguientes experimentos:

- Cuantificación de CAT y SOD.
- Cuantificación de ROS
- Determinación de la expresión génica de CAT y SOD-1.

Mujeres sin factor ovárico

Este grupo de mujeres no presenta ninguna patología causante de infertilidad, pero se ha dividido en dos grupos de estudio diferenciados por la edad.

Teniendo en cuenta que la infertilidad ocasionada por el propio envejecimiento está debida a una pérdida de la homeostasis, podemos suponer una pérdida en la actividad o eficiencia de los sistemas defensivos celulares. De esta forma, y como se señala en estudios como el realizado por R. González-Hernández et al, existe un incremento de la expresión de genes implicados con la detoxificación causada por el estrés oxidativo. Estos estudios hacen alusión a los sistemas de reparación. En base a los resultados de dichos estudios, podemos esperar un incremento de derivados de ROS frente a los niveles de antioxidantes en el grupo de mujeres sin factor ovárico con más edad en los sistemas de defensa celulares. Se tomará como grupo control a las donantes, ya que presenta el grupo de edad más bajo (de 18 a 25 años), tomando como idea inicial que sus niveles de estrés oxidativo sean basales (nulos o despreciables).

Mujeres con diferentes diagnósticos de infertilidad

Endometriosis

Algunos estudios realizados en mujeres con endometriosis (Agarwa, et al. 2012), se encontró que el estrés oxidativo (que induce esta patología) está implicado en un descenso en el ratio de implantación del embrión en el útero. De esto se puede suponer que, de existir un incremento de ROS en las pacientes de endometriosis, los sistemas de defensa responden de forma efectiva, de manera que el desarrollo del ovocito no se ve comprometido.

No obstante, otros estudios señalan que la capacidad antioxidante parece estar reducida en mujeres con la enfermedad, aunque no están totalmente claras qué vías están afectadas. Puede parecer que este fenómeno tiene que ver con el papel de la glutatión peroxidasa. De este ser el caso, se espera obtener como resultado, un desequilibrio similar al encontrado en el útero y en las zonas afectadas por el sobrecrecimiento del endometrio, frente a una homeostasis en el grupo de mujeres donantes. Esto se puede traducir en un mayor nivel de ROS a causa de un descenso en los niveles de antioxidantes (valorados por medio de la presencia y expresión de CAT y SOD-1).

PCOS

En este caso, la patología generada por el estrés oxidativo tiene lugar dentro del propio ovario. Esta patología, en última instancia (véase Síndrome de ovario poliquístico) produce un aumento en la secreción de hormonas sexuales masculinas. La bibliografía consultada presenta estudios (Agarwa, et al. 2012) cuyos resultados están basados en el análisis del líquido folicular, asociando esta patología a una merma en la eficiencia de los sistemas de defensa. Teniendo en cuenta de que existe una compleja señalización en el folículo, el líquido folicular debe ser un reflejo de las condiciones en las que se producen las interacciones entre la granulosa y el ovocito, por lo que se espera un decrecimiento de los niveles de CAT y SOD frente a un aumento de ROS, en relación con las mujeres jóvenes sin factor ovárico. Este descenso de los niveles de antioxidantes puede deberse a una pérdida parcial de la funcionalidad de CAT y SOD-1 o un decrecimiento en la expresión de los genes que los codifican.

BRO

La bibliografía que relacionan esta patología con el estrés oxidativo es más escasa, pero algunos estudios, como Calogne et al., señalan que se observa un aumento en los niveles de derivados de ROS como el malondialdehído (MDA). Teniendo en cuenta este marco, podemos esperar dos posibles resultados:

- Se produce un incremento de ROS. En este escenario podríamos esperar unos niveles de CAT y SOD-1 semejantes o mayores a los presentados por mujeres jóvenes sin factor ovárico.
- Disminuye la eficiencia de los sistemas de defensa, produciendo la acumulación de estrés oxidativo.

5.2 Análisis de sistemas de reparación frente a daños por estrés oxidativo

Los datos a emplear para la obtención de estos resultados serán los proporcionados por el protocolo realizado para cuantificar el daño en el DNA. De esta forma, y como se ha descrito previamente, el estrés oxidativo derivado de la pérdida de homeostasis, da como resultado el daño a diversos tipos moleculares, entre estos el DNA.

El grupo control representado por las donantes de la entidad colaboradora presentará los niveles basales de daño en el DNA, asumiéndose que éste es, hipotéticamente, bajo o fisiológico.

Esperamos encontrar un mayor daño en el DNA en aquellos grupos que presenten mayores niveles de estrés oxidativo. Pueden darse dos posibles resultados:

- Por un lado, esperamos que las mujeres con patología ovárica no presentarán diferencias significativas entre ellas en cuanto al daño en el DNA si tampoco presentan unas diferencias importantes en los niveles de estrés oxidativo (sistemas de defensa). Mientras que en las mujeres que no presenten factor ovárico, se espera un aumento en el daño en el DNA proporcional a la edad.
- Por otro lado, las mujeres con diferentes causas de infertilidad que presenten unos niveles de estrés oxidativo significativamente distintos, es esperable que presenten un daño en el DNA proporcional a dicho estrés. Las mujeres sin factor ovárico de mayor edad seguirán presentando mayor daño en el DNA que en las más jóvenes del mismo grupo.

5.3 Interés clínico de los resultados

Uno de los objetivos de este proyecto es la determinación de mejoras en los protocolos existentes de ARTs para la obtención de ovocitos en perfectas condiciones para el desarrollo del embrión. Así, necesitamos comparar los resultados con las condiciones de extracción de los ovocitos y el rendimiento que mostraron en los primeros 5 días del desarrollo embrionario, ya que este es el número de días standard para el desarrollo del embrión en laboratorio antes de la transferencia a la madre. Se compararán, de esta forma los resultados obtenidos con la dosis hormonal administrada a cada paciente, el número de ovocitos maduros obtenidos y la puntuación global del embrión en estado de 8 células (día 3). En este punto del desarrollo se suele determinar los embriones con más probabilidades de llegar a buen término su incubación en laboratorio y, por tanto, óptimos para su transferencia a la madre. Para ello se evalúan aspectos como el % de fragmentación, la presencia de un solo núcleo o la división simétrica y coordinada, que son parámetros visuales que aportan información rápida sobre el estado del embrión y su calidad.

Todos los datos anteriores aportan información sobre las condiciones preovulatorias del desarrollo de los ovocitos y la evolución de los embriones. Estos datos, proporcionados por la empresa colaboradora, serán contrastados con los datos obtenidos en el proyecto para dilucidar la necesidad de implementar, de forma anexa al tratamiento hormonal, un tratamiento antioxidante que permita una mejora en el entorno ovárico con respecto al estrés oxidativo y el mejor desarrollo del ovocito. Es posible que, en casos donde el estrés oxidativo no esté muy acentuado, sea necesario, únicamente, aconsejar hábitos que no generen estrés oxidativo durante el tratamiento, poniendo como ejemplo evitar el tabaco.

6 Nuevas rutas y líneas de investigación

Los resultados que se obtengan de la realización de este proyecto pueden, a su vez, suscitar nuevas preguntas con nuevos enfoques y estudios. De hecho, se ha planteado, durante el desarrollo de este mismo TFG, el posible estudio del origen de la merma en los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo, ya que puede ser debida tanto al daño en el DNA a nivel de genes implicados en la síntesis de antioxidantes, como a fallos en el proceso de traducción de la señal de mRNA.

7 Conclusiones

Como objetivos se señalaron tanto la corroboración del uso de la CG como biomarcador para conocer el estado homeostático del ovocito, como el desarrollo mejoras en las ARTs. De esta forma, se realizó un trabajo bibliográfico para dilucidar el marco teórico sobre el que se sustentará el estudio. Dicho trabajo deja como resultado una serie de conclusiones preliminares, a falta de la experimentación directa:

1. Debido a lo encontrado en la bibliografía marco de este proyecto, la capa granulosa presenta funciones de biomarcador para el estado del ovocito, debido a la compleja comunicación establecida de forma bidireccional entre ovocito y CG.
2. El balance entre los niveles de ROS y antioxidantes determina el grado de daño del oxidativo de la célula y su estado fisiológico, encontrándose una correlación positiva.
3. El estudio de los niveles de ROS, elementos antioxidantes y nivel de daño oxidativo del DNA podría constituir una herramienta útil para tipificar los diferentes

diagnósticos de infertilidad, empleándose como referencia para la optimización de protocolos de estimulación ovárica en ARTs.

7.1 Conclusions

As objectives, both the corroboration of the use of GC as a biomarker to know the homeostatic state of the oocyte, as well as the improvement of ARTs were pointed out. In this way, a bibliographic work was carried out to elucidate the theoretical framework on which the study will be based. This work results in a series of preliminary conclusions, in the absence of direct experimentation:

1. Due to what was found in the framework bibliography of this project, the granular layer presents biomarker functions for the oocyte status, due to the complex bidirectional communication established between oocyte and GC.
2. The balance between ROS and antioxidant levels determines the degree of oxidative damage of the cell and its physiological state, finding a positive correlation.
3. The study of ROS levels, antioxidant elements and level of oxidative DNA damage could be a useful tool to typify the different infertility diagnoses, being used as a reference for optimizing ovarian stimulation protocols in ARTs.

8 Bibliografía

- Agarwal. (2012). *The effects os oxidative stress on female reproduction: a review. Reproductive Biology an Endocrinology* 10:49.
- Ana C. Pereira, F. M. (2014). *Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies. Cell Biology and Toxicology* 30:301-312.
- Ariel Tarazona, Á. L. (2010). *La competencia del ovocito: qué, cuándo y cómo. Acta Biológica Colombiana* 15:3-18.
- ASRM. (1997). *Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis.*
- Buccione, R. S. (1990). *Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. Biology of Reproduction* 43:543-547.
- C.Jaeger. (2011). *Fisiología del envejecimiento. ElSevier* 32:1-8.
- Castell, J. S. (2017). *Estudio de la formación de 8-oxo-G. Universitat de les Illes Balears.*
- Cimadevilla, H. M. (2015). *Nuevos métodos de detección de marcadores de estrés oxidativo en muestras biológicas. Universidad de Oviedo. Recuperado de: <http://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/33658>*
- ESHRE. (2004). *Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary síndrome (PCOS). Human Reproduction.*
- Ferraretti, A., La, M., Fauser, B., Tarlatzis, B., Nargund, G., & Gianaroli, L. (2011). *ESHRE consensus on the definition of poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization: The Bologna criteria. Human Reproduction.*
- Jirge, P. R. (2016). *Poor ovarian response. Human Reproduction*, 9(2):63-69.
- Li, R. a. (2013). *The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(3):141-152.
- M. A. Paine, A. A. (2013). *Studies on Women's Health. Springer*, 80-84.
- McCords, J. M., & Fridovich, I. (1969). *Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). The Journal of Biological Chemistry*, 244(22):6049-55.
- Mora, Á. (2020). *Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. Vitae*, 16(3):311-319.
- NCBI. *GeneDatabase, Cat (Catalase). ID:847*
- Oro, S. G. (2018). *Utilidad de la luz polarizada en el laboratorio de reproducción asistida. Universidad de Vigo: Tesis Doctoral. Recuperado de: http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/1014/utilidad_luz_polarizada_laboratorio.pdf?sequence=1&isAllowed=y*

- Ramírez, R. M. (2014). *Estudio de expresión de la familia génica sirtuinas en células de la granulosa humana, y su relación con la calidad oocitaria en técnicas de fecundación in vitro*. TFG, Universidad de La Laguna.
- Rebeca González-Fernández, J. H.-V. (2015). *Expression Levels of the Oxidative Stress Response Gene ALDH3A2 in Granulosa-Lutein Cells Are Related to Female Age and Infertility Diagnosis*. *Reproductive science*, 23(5):604-9.
- Rocía Núñez-Calonge, S. C. (2016). *Oxidative stress in follicular fluid of young women with poor response compared with fertile oocyte donors*. *El Sevier, Reproductive BioMedicine*, 32(4):446-56.
- Ross-Kayne-Pawlina. (4ª Edición). *Histología - Texto y atlas color con biología celular y molecular*. Editorial Panamericana, 730-744.
- Rubio, M. A. (2012). *Seminario: Regulación neurológica y hormonal de la función reproductora. Servicio de Obstetricia y Ginecología, Complejo Hospitalario Universitario de Albacete*. Recuperado de: https://www.chospab.es/area_medica/obstetriciaginecologia/docencia/seminarios/2012-2013/sesion20120620.pdf
- Schmittgen, T. L. (2008). *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. *Nature Protocols*, 3:1101-1108.
- Si Wang, Y. Z. (2020). *Single-Cell Transcriptomic Atlas of Primate Ovarian Aging*. *CellPress*, 180(3):585-600.
- Sobinoff, A. S. (2013). *Intracellular signalling during female gametogenesis*. *Molecular Human Reproduction*, 17(5):265-278.
- Squadrito, G. L., & Pryor, W. A. (1998). *Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide*. *Free Radical Biology and Medicine*; 25(4,5):392-403.
- Su, Y. S. (2009). *Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism*. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(1):32-42.