

**Departamento de Bioquímica,
Microbiología, Biología Celular y
Genética**

**Análisis de la expresión de genes en
células de la granulosa de folículos
ováricos relacionados con una
maduración ovocitaria óptima.**

**Analysis of gene expression in granulosa
cells of ovarian follicles related to
optimal oocyte maturation.**

Marina Ramos Montesdeoca

Tutorizado por:

Julio T. Ávila Marrero y Rebeca González Fernández

Grado Biología 2017

Resumen

Los avances científicos permiten a los clínicos utilizar procedimientos como la inseminación artificial, la fecundación *in vitro* y la transferencia de embriones para combatir, entre otros, la infertilidad humana.

Durante el desarrollo del folículo ovárico, las células de la granulosa (GC) interactúan con el oocito en desarrollo. Por tanto, el estado fisiológico de estas células puede ser un reflejo de la salud del oocito y constituir un indicador de la capacidad posterior de desarrollo de los embriones. Los biomarcadores de las GC asociados con ovocitos individuales podrían ser utilizados en la reproducción asistida para indicar qué embriones tienen la mejor oportunidad de implantación en el útero y completar la gestación. El análisis de la expresión de genes en GC de folículos ováricos *in vitro* da una importante información sobre las habilidades que adquieren los oocitos durante su fase folicular temprana *in vivo*.

Este estudio se basa en la realización de una base de datos de genes con expresión diferencial en células de la granulosa ovárica a partir de los resultados científicos publicados en este campo para su posterior análisis en conjunto. Este análisis ha permitido reconocer diferentes procesos celulares en las células de la granulosa implicados en el desarrollo folicular.

Palabras clave: fertilización *in vitro*, células de la granulosa, biomarcadores, desarrollo folicular.

Abstract

The scientific advances today permit clinicians to use such procedures as, artificial insemination, in vitro fertilization, and embryo transfer to combat, among others, human infertility.

In the ovarian follicle development, Granulosa cells (GC) surround and interact with the developing oocyte. These GC reflect the oocyte's overall health and may indicate subsequent developmental competence of embryos. Biomarkers of GC associated with individual oocytes could potentially be used in assisted reproduction to indicate which embryos have the best chance of implanting in the uterus and completing gestation. The analysis of gene expression in GC of ovarian follicles *in vitro* gives important information on the abilities which acquire oocytes during their early follicular stage *in vivo*.

This study is focused on the realization of a gene database with differential expression in ovarian granulosa cells from scientific literature in this topic for further analysis together. This analysis has allowed to recognize different cellular processes in granulosa cells involved in follicular development.

Keywords: In vitro fertilization, Granulosa cells, biomarkers, follicular development

Índice	Página
Introducción	
Descripción del sistema biológico estudiado	1-3
Relación entre el oocito y las células de la granulosa	2-4
Datos previos de expresión génica en células de la granulosa	4-6
Objetivos	7
Material y métodos	8
Resultados	
Resultado de la búsqueda de genes	9-16
Resultado del estudio de STRING	16-17
Resultado de agrupamiento de interacciones considerando el Nivel 1 de interacciones	17-20
Resultado de agrupamiento de interacciones considerando el Nivel 2 de interacciones	20-22
Discusión	
Proceso de proliferación y diferenciación	23-24
Proceso de reparación y replicación del DNA	24-26
Proceso de regulación del ciclo circadiano	26
Proceso de diferenciación dentro del tejido	26-27
Proceso de mitosis	27
Conclusión	28
Bibliografía	29-30

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Descripción del sistema biológico estudiado

El ovario humano adulto es un órgano muy complejo compuesto de varios tipos de células. Todos los vertebrados tienen ovarios, el desarrollo y la diferenciación de éstos varía profundamente de unas especies a otras. La función primitiva del ovario es la de originar y almacenar óvulos. En los mamíferos, el ovario produce muchas hormonas, siendo las más importantes, los estrógenos y la progesterona. (Botella Llusíá, 2000)

Son dos cuerpos ovalados que se encuentran alojados en la pelvis y fijados a la superficie posterior del ligamiento ancho por medio de un pliegue peritoneal denominado mesovario.

En los ovarios sucede la ovogénesis. Este proceso se inicia en el periodo embrionario cuando, a partir de las ovogonias se forman los ovocitos primarios, los cuales permanecen detenidos en la meiosis I hasta el periodo postnatal. A partir de la pubertad (12-25 años), en periodos cíclicos de 28 a 30 días, un grupo de ovocitos dejarán de estar detenidos reanudando la meiosis I y entrando en la II, aunque por un proceso denominado dominancia apical, solo uno evoluciona a un ovocito secundario. Estos periodos cíclicos de maduración y desarrollo de los ovocitos continuarán hasta la menopausia (aproximadamente 50 años de edad), durante la cual los ovocitos primarios ya no madurarán y se degenerarán en el ovario (Arteaga Martínez and García Peláez, 2014)

El ovario presenta una médula central, un córtex externo y un hilio interno en el punto de anclaje del ovario con el mesovario. La médula está compuesta por una colección celular heterogénea; el córtex, por células germinales (oocitos) rodeados de complejos celulares inmersos en el estroma formando los folículos ováricos; y el hilio contiene nervios, vasos sanguíneos y linfocitos (Fig 1). (Fernández-Tresguerres Hernández, Ariznavarreta Ruiz and Alfaro González, 2010)

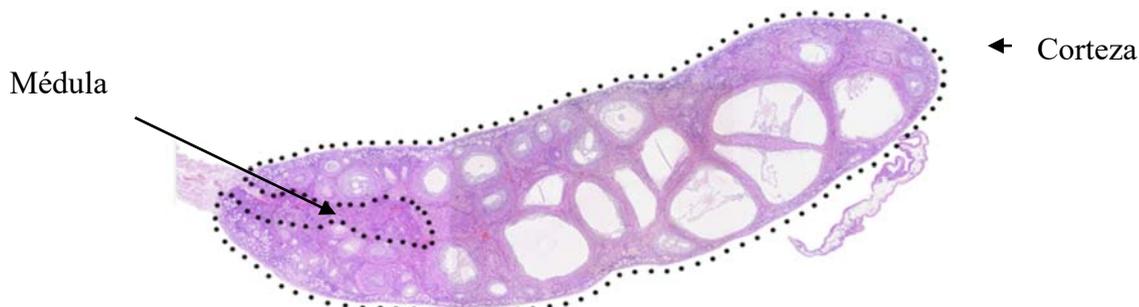


Figura 1. Médula y corteza ovárica. Atlas de histología Vegetal y Animal (Mmegias.webs.uvigo.es, 2017)

El córtex ovárico es el más importante y es aquí donde van a ocurrir la mayoría de los cambios. Destacan como estructuras fundamentales los folículos ováricos, cuya organización y componentes van a sufrir toda una serie de cambios coincidentes con el grado de diferenciación y desarrollo de los oocitos contenidos en su interior. Estos cambios están íntimamente relacionados con la doble misión de los ovarios. Por un lado, serán los responsables de la secreción de hormonas femeninas y, por el otro, serán los encargados de proporcionar los gametos femeninos, los óvulos, para su potencial fecundación (Fernández-Tresguerres Hernández, Ariznavarreta Ruiz and Alfaro González, 2010)

Desde el punto de vista histológico encontramos tres tipos básicos de folículos ováricos que pueden identificarse de acuerdo con su estado de desarrollo (Fig 2):

- Folículos primordiales.
- Folículos en crecimiento (primarios o secundarios)
- Folículos maduros o de Graaf.

El folículo primordial es la etapa inicial del desarrollo folicular. Se corresponde a una ovogonia rodeada de células aplanadas del estroma del ovario (células foliculares). Conforme el folículo primordial se convierte en folículo en crecimiento, ocurren cambios en el oocito. Al principio, aumenta de tamaño y las células foliculares aplanadas circundantes proliferan y se tornan cúbicas (folículo primario). A medida que el oocito crece, aparece la zona pelúcida, capa de glicoproteínas que da lugar a una membrana prominente, translúcida y acelular. Mediante la proliferación mitótica rápida, la capa de células foliculares da origen a un epitelio estratificado, capa granulosa con células de la granulosa. (Ross, Pawlina and Negrete, 2011)

Cuando la capa granulosa alcanza un determinado espesor, en las células aparecen cavidades llenas de líquido llamado líquido folicular. Las cavidades comienzan a confluir y forman una cavidad única con forma de semiluna llamada antro y, entonces, ese folículo se denomina folículo secundario. Conforme el folículo secundario aumenta de tamaño, el antro, revestido por varias capas de células, también se vuelve más grande.

Por último, obtenemos un folículo maduro, también conocido como folículo de Graaf, que contiene el oocito secundario maduro. Se extiende por todo el espesor de la corteza ovárica. La capa granulosa parece tornarse más fina conforme el antro aumenta de tamaño. Mientras continúan agrandándose, los espacios que hay entre las células de la granulosa, el oocito y las células del cúmulo se separan gradualmente del resto de la capa granulosa en preparación para la ovulación. (Ross, Pawlina and Negrete, 2011)

De todos los folículos que comenzaron su desarrollo en cada ciclo, solo uno llegará a la madurez total y los demás se degenerarán y se volverán atrésicos. El folículo terciario puede alcanzar hasta 25 mm de diámetro, momento en el que ocurrirá la ovulación. (Arteaga Martínez and García Peláez, 2014)

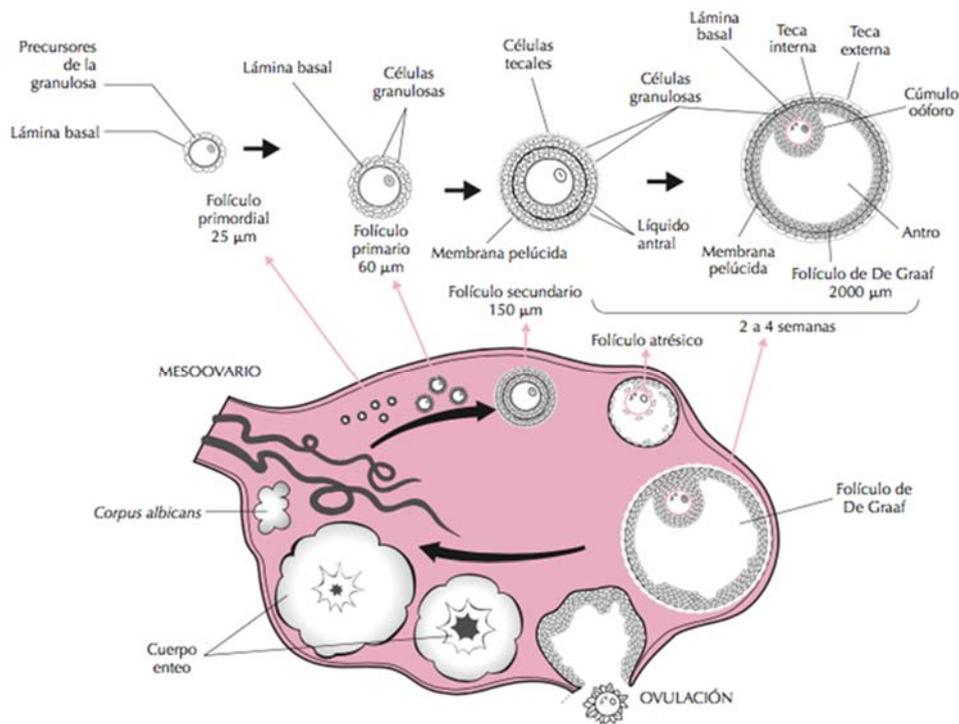


Figura 2. Estructura microscópica del ovario. Desarrollo folicular. Ovulación. Imagen tomada del libro *Fisiología humana* (Fernández-Tresguerres Hernández, Ariznavarreta Ruiz and Alfaro González, 2010)

1.2 Relación entre el oocito y las células de la granulosa

Las células de la granulosa son el principal tipo celular en el ovario y proporcionan el soporte físico y microambiente necesario para el desarrollo del ovocito (Skinner, 2005).

Desde el momento de la formación del folículo, pasando por la foliculogénesis, hasta la ovulación, la organización y el funcionamiento normal del ovario depende, en gran medida, de estrechas interacciones entre las células germinales y las células somáticas circundantes. (Kidder and Vanderhyden, 2010)

Se conoce a día de hoy una comunicación celular y una cooperación metabólica entre los ovocitos y las células somáticas del folículo para garantizar tanto el suministro de sustratos para el oocito en crecimiento, como para su correcta maduración y, de forma recíproca, la adecuada proliferación y diferenciación de las células somáticas del folículo. (Emori and Sugiura, 2014)

El ovocito influye a su vez en varios aspectos del desarrollo de las células de la granulosa, incluyendo proliferación, diferenciación y producción de la matriz extracelular y la producción de hormonas esteroideas. (Kidder and Vanderhyden, 2010)

La relación está mediada por uniones comunicantes (gap junctions) e implica múltiples mecanismos de comunicación celular, en particular, entre los ovocitos y las células de la granulosa. Estas comunicaciones permiten el intercambio bidireccional de iones, metabolitos y aminoácidos.

Otro medio de comunicación es por medio de la señalización paracrina, mediante la cual los ovocitos son capaces de secretar factores paracrinos claves para la regulación de los procesos en la granulosa.

Un ejemplo de esto son los factores secretados por oocitos como puede ser el GDF9 y el BMP15 que están directamente implicados en la modulación del metabolismo energético y en la biosíntesis del colesterol, que son vías fundamentales ausentes en los ovocitos, pero muy operativas en las células de la granulosa. Por lo tanto, estos y posiblemente otros factores paracrinos se despliegan para "subcontratar" células de la granulosa que satisfagan las demandas metabólicas de crecimiento, maduración e incluso embriogénesis mucho antes de que el embrión asuma esta responsabilidad (Li and Albertini, 2013). De tal forma que un flujo de información durante la maduración del ovocito dentro del folículo ovárico puede ser suficiente para alterar el patrón de desarrollo folicular.

En la actualidad, las células de la granulosa humana son recogidas durante el procedimiento de técnicas de fertilización asistida, a partir del líquido folicular de aquellos folículos preovulatorios pertenecientes a mujeres hormonalmente estimuladas. Dada la estrecha relación de éstas con el ovocito durante el desarrollo folicular, actualmente se acepta de forma generalizada que el estado fisiológico de las células de la granulosa, en el momento de la ovulación, puede aportar información acerca del estado de maduración del ovocito liberado por el folículo.

1.3 Datos previos de expresión génica en células de la granulosa

Los estudios investigados nos ponen de manifiesto que las células del cúmulo y de la granulosa del folículo ovárico rodean e interactúan con el ovocito en desarrollo. Estas células foliculares reflejan la salud general del ovocito y pueden indicar la posterior competencia de desarrollo de los embriones. Los biomarcadores de células de la granulosa asociados con ovocitos

individuales, podrían ser potencialmente utilizados en la reproducción asistida para indicar qué embriones tienen la mejor oportunidad de implantación en el útero y completar la gestación.

Las principales técnicas utilizadas en el estudio de expresión de genes en células de la granulosa han sido los microarrays y RT-PCR. La tecnología del microarrays se basa en la capacidad de depositar muchas -decenas de miles- de secuencias de ADN diferentes en una superficie pequeña, denominada chip. Los diferentes fragmentos de ADN se disponen en filas y columnas, de manera que la identidad de cada fragmento se conoce por su ubicación en el conjunto. Los dos tipos de microarrays son los de expresión génica y los de tejidos. (Rajeshwar Govindarajan, 2017)

Con estos estudios se ha podido recabar datos acerca de diferentes procesos fisiológicos, siendo los nombrados a continuación los más importantes a la par que los más citados. Se encontró diferencia de expresión de genes en los diferentes estados de la foliculogénesis, diferente expresión como respuesta a hormonas o la exposición de diferentes compuestos exógenos, diferente expresión teniendo en cuenta el estado de la mujer analizada (embarazada o no embarazada) e incluso diferente expresión dependiendo de la causa de infertilidad asociada, como pudieron ser endometriosis, PCOS...

Cabe destacar que, en todos estos procesos, hay que tener presente diferentes variables que pueden afectar a la expresión de células de la granulosa. Es por eso que las condiciones y características de cada uno de los estudios varía. Hay que contar con la población de estudio, siendo ésta la más importante, ya que engloba la mayoría características biológicas que pueden interferir en los estudios, como pueden ser edad, hábitos, peso... No debemos olvidar la existencia de diferentes protocolos utilizados, tales como la estimulación hormonal, técnicas usadas, pacientes requeridos, atmósfera y ambiente.

El estudio del desarrollo *in vitro* de ovocitos proporciona información importante sobre las habilidades que adquieren éstos durante su fase folicular temprana *in vivo*. Es por ello que, con ayuda de estos datos, podríamos ser capaces de desarrollar diferentes métodos predictivos con el fin de recrear una fecundación *in vitro* 100% viable. De los estudios revisados, es evidente que la identificación de un único gen expresado para predecir el embarazo es altamente improbable, y que un modelo predictivo con múltiples genes y características del ciclo pueden producir los mejores resultados.

Teniendo en cuenta pues, las características biológicas y los diferentes protocolos utilizados que nos pueden llevar a confusión, es esencial identificar de una manera certera los

biomarcadores de las células de la granulosa para predecir un único nacimiento vivo. Es importante señalar las contribuciones paternas a la calidad del embrión, que normalmente en los estudios no se evalúan.

La capacidad de crear y probar los diferentes tipos de modelos predictivos, permitirá a los biólogos revolucionar la forma en que los embriones se seleccionan y aumentar así las tasas de éxito de la reproducción in vitro.

Actualmente los datos existentes en la bibliografía científica con respecto a la expresión de genes de células de la granulosa relacionados con el proceso de crecimiento y maduración folicular son abundantes y dispersos. Su estudio se ha realizado teniendo en cuenta diferentes aspectos del desarrollo folicular, tratamientos hormonales, variables biológicas de las mujeres estudiadas, causas de infertilidad, condiciones de estrés ... Esto hace muy difícil poder comparar de forma directa los resultados obtenidos entre diferentes estudios.

En este trabajo pretendemos hacer un análisis de red de interacciones entre proteínas (interactoma) con los datos publicados en dicha bibliografía científica, con objeto de identificar los procesos celulares básicos más relacionados con el desarrollo folicular y poder centrar la búsqueda de biomarcadores entre miembros génicos de éstos.

Como conclusión y apoyándome en un ejemplo, diré que tenemos un árbol cuyo tronco es el estudio de la maduración de folículos ováricos para conseguir una mayor consecución de la reproducción in vitro. Dicho árbol se compone de varias ramas, si bien están unidas todas por tener un mismo tronco, no hay relación entre ellas, pues los estudios realizados se encuentran actualmente dispersos y desconectados entre sí, de tal manera que no se puede sacar una conclusión verídica: no hay interconexión entre los diferentes nódulos de las ramas. Nuestro trabajo pretende obtener una visión más general del árbol que nos permita identificar los aspectos más importantes para el crecimiento del mismo.

2. OBJETIVOS

2.- Objetivos

El crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos requieren una serie de eventos coordinados que inducen cambios morfológicos y funcionales dentro del mismo llevando a la diferenciación celular y al desarrollo del ovocito. El crecimiento folicular está regulado en un primer periodo por las interacciones entre las células del ovocito, las células de la granulosa y del cúmulo que rodean e interaccionan con él.

El objetivo general de este trabajo es la identificación de los procesos celulares en células de la granulosa más relacionados con el desarrollo folicular ovárico.

Para la consecución del mismo, se abordarán como objetivos específicos los siguientes:

- Realización de una base de datos de genes con expresión diferencial en células de la granulosa relacionadas con el desarrollo folicular obtenida a partir del análisis de los datos publicados en los últimos 10 años.

- Análisis del conjunto de genes obtenidos en la búsqueda bibliográfica mediante redes de interacción génica (interactomas) con objeto de establecer relaciones entre los diferentes genes descritos en los distintos trabajos científicos con objeto de identificar los procesos celulares más relacionados con el desarrollo folicular.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. Material y métodos

El trabajo a realizar es un estudio de investigación en donde se ha llevado a cabo una recogida masiva de información sobre genes relacionados con procesos implicados en la foliculogénesis. Para ello, se ha propuesto una búsqueda bibliográfica de dichos genes haciendo un escaneo por diversos artículos científicos relacionados con este mismo tema. Se usó PubMed, que es un recurso gratuito desarrollado y mantenido por el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI).

El período temporal de búsqueda abarca los artículos publicados desde el año 2.000 hasta el presente. La estrategia de búsqueda se basó en el uso de las palabras claves: “Granulosa”, “follicular development”, “human”, “infertility”, “ovary” con las cuales fuimos capaces de seleccionar una serie de artículos (incluyendo Reviews) para poder completar la tabla que se muestra en el apartado 4.1 Resultados.

Para la selección de artículos usamos como criterio si el trabajo analizaba expresión génica entre las células que rodean e interactúan con los ovocitos y su desarrollo.

Se seleccionaron un total de 17 artículos, de los cuales 3 eran Reviews. Se logró aislar del conjunto de artículos, un total de 143 genes. De cada gen se describió su función, se comprobó si su expresión aumentaba o disminuía con el proceso analizado y observamos cambios de expresión en patologías relacionadas con la infertilidad.

A partir de los datos de la búsqueda bibliográfica se realizó un mapa de interacciones. Para esta parte se usó el programa STRING (<https://string-db.org/>), base de datos que tiene como objetivo proporcionar una evaluación crítica e integración de interacciones proteína-proteína, incluyendo asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales). En dicha base, se utilizaron una serie de parámetros de inclusión para la configuración de los mapas de interacción. Una vez que se han incluido en la base todos nuestros genes extraídos a partir de un archivo Excel creado anteriormente, se configuran los datos. En nuestro caso, configuramos tanto las fuentes de interacción activa (se seleccionaron “Textmining” y “Experiments”) como la puntuación de interacción mínima requerida (highest confidence 0.900).

Asimismo, cuando obtuvimos los diferentes mapas de interacciones realizamos también una configuración de nivel de dicho mapa. Se configuró el modo de visualización en red, lo pasamos de “static png” a “interactive flash” que permite el agrupamiento avanzado y se ocultaron también los nodos desconectados en la red, para así poder tener una simplificación de la visualización y que la interpretación fuera más evidente.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Resultado de la búsqueda de genes

La búsqueda masiva en PubMed con las palabras claves descritas en métodos y materiales dieron como resultado una lista de múltiples artículos que fueron filtrados por su título y contenido del abstract. Los artículos seleccionados, tanto trabajos de investigación como revisiones, abordaban distintos estudios de expresión génica en células de la granulosa en diferentes condiciones fisiológicas.

En la Tabla 1 se lista los genes que se han identificado con distinta expresión en estas células dependiendo de diferentes factores, incluyendo su posible función celular y el tipo de cambio de expresión observado.

Gen	Función	Cambios	Proceso	Cita
<i>GNRHR</i>	Codifica el receptor para la hormona liberadora de gonadotropina tipo 1	Aumenta	Regulación de GNRHR	Nathwani, 2000
<i>MAD2L1</i>	Previene el inicio de anafase hasta que todos los cromosomas estén alineados en la placa de metafase	Aumenta	Exposición al Bisphenol-A	Mansur et al, 2016
<i>BIRC5</i>	Codifica proteínas reguladoras (negativas) que previenen la muerte celular apoptótica			
<i>CDC20</i>	Parece actuar como una proteína reguladora interactuando con varias proteínas (en el ciclo celular)			
<i>BUB1B</i>	Codifica una quinasa involucrada en el punto de control de la formación del huso			
<i>CCNB1</i>	Codifica una proteína reguladora involucrada en la mitosis			
<i>IGFBP1</i>	Codifica una proteína con un dominio IGFBP y un dominio de tiroglobulina tipo I			
<i>TRIB3</i>	Codifica una proteína quinasa inducida por el factor de transcripción NF-kappaB	Disminuye		
<i>HMGCS1</i>	Enzima reguladora de la génesis del colesterol			
<i>EGR2</i>	Codifica una proteína (factor de transcripción con tren dominios en tándem tipo C2H2 zinc)	Aumenta	Control de la expresión en células de la granulosa ovárica	Jin et al, 2017
<i>IER3</i>	Funciona como un coactivador transcripcional de PPAR-alfa en la protección de células Fas o como factor de necrosis tumoral tipo alfa inducida por apoptosis			
<i>RUNX2</i>	Codifica una proteína nuclear con un dominio <i>Runt</i> de unión al ADN	Aumenta	Genes analizados como posibles biomarcadores de embarazo en humanos	Kordus and LaVoie, 2016
<i>BCL2L11</i>	Codifica una proteína que pertenece a la familia BCL-2 (prototípico regulador de la muerte celular)			
<i>CALM1</i>	Miembro de la familia de genes de la calmodulina			
<i>CAMK1D</i>	Miembro de la familia de proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (subfamilia de serin/treonin quinasa)			

CDC42	GTPasa de la subfamilia <i>Rho</i> . Regula vías de señalización de controlan diversas funciones celulares	Aumenta	Genes analizados como posibles biomarcadores de embarazo en humanos	Kordus and LaVoie, 2016
CYP19A1	Codifica un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo P450			
EFNB2	Codifica una efrina de clase EFNB que se une a los receptores EPHB3/4			
GREM1	Codifica un miembro de la familia de antagonistas de BMP. Puede desempeñar un papel en la regulación de la organogénesis, patrón corporal y diferenciación tisular			
HAS2	Miembro de la familia de genes de vertebrados identificada recientemente que codifica una sintasa hialurónica			
HIST1H4C	Codifica una histona dependiente de la replicación (miembro de la familia H4)			
ITPKA	Cataliza la formación de <i>InsP3</i> a <i>InsP4</i> , ambos moduladores de la homeostasis del calcio			
NRP1	Codifica una neuropilina (contiene dominios proteicos específicos que les permite participar en vías de señalización que controlan la migración celular)			
PGK1	Codifica una enzima glicolítica que cataliza la conversión de 1,3-difosfoglicerato en 3-fosfoglicerato			
PTGS2	Codifica una isoenzima inducible. Está regulado por eventos estimulantes específicos (responsable de la síntesis de prostanoide involucrada en la inflamación y la mitogénesis)			
PTX3	Codifica un miembro de la familia de proteínas pentraxina. La expresión está inducida por citoquinas inflamatorias en respuesta a estímulos			
RGS2	Actúa como un mediador de la diferenciación mieloide y desempeña un papel en la leucemogénesis			
TRPM7	Codifica una proteína que es a la vez un canal iónico y una proteína serin/treonin quinasa			
VCAN	Miembro de la familia de proteoglicanos aggrecan/versican. Participa en la adhesión celular, proliferación, migración y angiogénesis			
AR	Factor de transcripción activado con hormona esteroide			
CALU	Codifica una proteína de unión al calcio que se localiza en el ER y está implicada en funciones de plegamiento (entre otras)			
CYP11A1	Codifica un miembro de la superfamilia de enzimas del citocromo P450. Monooxigenasas que catalizan reacciones implicadas en el metabolismo y síntesis del colesterol, esteroides y lípidos			
GABPB1	Codifica un factor de transcripción de la proteína de unión GA (subunidad beta). Participa en la activación de la expresión de la citocromo oxidasa y en el control nuclear de la función mitocondrial			
GPX3	Codifica una proteína perteneciente a la familia de glutatión peroxidasa. La disminución de la expresión de este gen por la hipermetilación del promotor se ha observado en tumores malignos			
GSR	Codifica un miembro de la familia de oxidoreductasa. Enzima central de la defensa antioxidante celular			
GSTA3	Está implicado en la defensa celular contra los compuestos electrofílicos tóxicos, carcinógenos y farmacológicamente activos			
GSTA4	Está implicado en la defensa celular contra los compuestos electrofílicos tóxicos, carcinógenos y farmacológicamente activos			

HIPK1	Codifica una proteína de la familia serin/treonin quinasas y subfamilia HIPK	Aumenta	Genes analizados como posibles biomarcadores de embarazo en humanos	Kordus and LaVoie, 2016
HOMER1	Codifica un miembro de la familia de proteínas dendríticas			
ITM2A	Codifica una proteína de membrana (tipo II) que pertenece a la familia ITM2			
KHDRBS3	Es una proteína de unión a ARN implicada en la regulación de splicing alternativo			
KRT6A	Codifica una proteína miembro de la familia de genes de la queratina			
LRP8	Codifica un miembro de la familia de LDLR. Desempeña un papel crítico en la migración de neuronas durante el desarrollo			
MARCKS	Codifica una proteína que es sustrato para la proteína quinasa C. Implicada en la motilidad celular, fagocitosis, tráfico de membrana y mitogénesis			
NUDT10	Miembro de la familia de tipo nudix. La proteína es una fosfohidrolasa que puede regular la rotación de difosfoinosiol polifosfato			
PFKP	Codifica un miembro de la familia de proteínas fosfofructoquinasa			
PGR	Codifica un miembro de la superfamilia del receptor de los esteroides. Media los efectos fisiológicos de la progesterona que desempeña un papel en los eventos reproductivos			
PIR	Codifica un miembro de la superfamilia de <i>cupin</i> . Es una proteína nuclear que contiene Fe y se expresa en todos los tejidos del cuerpo			
PKN2	Codifica para una proteína que juega un papel importante en diversos procesos biológicos como la regulación de la progresión del ciclo celular, entre otros			
RGS3	Codifica una proteína miembro de la familia RGS			
RPL9	Codifica una proteína ribosomal que es un componente de la subunidad 60S. La proteína pertenece a la familia L6P de proteínas ribosómicas. Se encuentra en el citoplasma			
TP53I3	Codifica una proteína que es similar a las oxidorreductasas, que son enzimas implicadas en las respuestas celulares a los esfuerzos oxidativos y la irradiación			
UGP2	Es un importante intermediario en las interconversiones de hidratos de carbono de mamíferos			
WRB	Se encuentra en la región candidata para la cardiopatía congénita en el síndrome de Down. Codifica una proteína básica que funciona como un receptor que promueve la inserción de proteínas ancladas en la membrana RE			
YWHAZ	Pertenece a la familia 14-3-3 de proteínas que median la transducción de señales por unión a proteínas que contienen fosfoserina			
SEMA3A	Miembro de la familia de las semaforinas. Codifica una proteína con dominio tipo C de tipo Ig, un dominio PSI y un dominio Sema. Puede funcionar como un agente quimioatrayente o quimiorepulsivo			
SFRP1	Codifica un miembro de la familia SFRP que contiene un dominio rico en cisteína homólogo al sitio putativo de unión a Wnt de las proteínas Frizzled			
SLC2A4	Miembro de la familia de portadores de soluto 2 (transportador de glucosa facilitado) y codifica una proteína que funciona como un transportador facilitador de glucosa regulado por insulina			

<i>SPHKAP</i>	Proteína de anclaje que se une preferentemente a la subunidad reguladora de tipo I de la proteína quinasa dependiente de c-AMP (PKA tipo I) y la dirige a distintos compartimentos subcelulares		Genes analizados como posibles biomarcadores de embarazo en humanos	Kordus and LaVoie, 2016
<i>SPSB2</i>	Codifica un miembro de una subfamilia de proteínas que contienen un dominio SPRY central y un bloque supresor C-terminal de la caja de señalización de citoquinas (SOCS). Esta proteína desempeña un papel en la señalización celular			
<i>SYT11</i>	Miembro de la familia de genes de sinaptotagmina. Codifica una proteína similar a otros miembros de la familia que son sensores de calcio conocidos y median la regulación dependiente del calcio			
<i>THOC2</i>	Codifica una proteína que es un miembro del complejo THO. Interacciona con la proteína THOC1			
<i>TMEM64</i>	Actúa como un regulador de las vías de señalización Ca ²⁺ mediadas por TNFSF11 a través de su interacción con SERCA2			
<i>DNAJC15</i>	Codifica una proteína interna de la membrana mitocondrial que tiene un papel en el transporte de las proteínas mitocondriales	Disminuye		
<i>NFIB</i>	Esencial en el desarrollo embrionario y trabaja en consonancia con un conjunto de genes (NFI) para iniciar la diferenciación de tejido en el feto			
<i>PHLDA1</i>	Codifica una proteína nuclear rica en prolina-histidina conservada evolutivamente			
<i>TOM1</i>	Diana del oncogen v-myb. La proteína codificada comparte su dominio N-terminal con proteínas asociadas con el tráfico vesicular en el endosoma			
<i>CHGB</i>	Codifica una proteína secretora tirosina sulfatada abundante en células endocrinas y neuronas			
<i>SFRP2</i>	Codifica un miembro de la familia SFRP que contiene un dominio rico en cisteína homólogo al sitio putativo de unión a Wnt de las proteínas Frizzled			
<i>STC1</i>	Codifica una glicoproteína homodimérica secretada que se expresa en una amplia variedad de tejidos y puede tener funciones autocrinas o paracrinas			
<i>STC2</i>	Codifica una glicoproteína homodimérica secretada que se expresa en una amplia variedad de tejidos y puede tener funciones autocrinas o paracrinas			
<i>LHCGR</i>	Codifica el receptor para la hormona luteinizante como para la coriogonadotropina	Aumenta Disminuye		
<i>CHD9</i>	Funciona como un coactivador transcripcional de PPAR-alfa	Aumenta en grupo embarazado		
<i>DPP8</i>	Codifica un miembro de la familia S9B peptidasa	Disminuye en grupo no embarazado		
<i>TNFAIP6</i>	Codifica una proteína secretora que contiene un dominio de unión al ácido hialurónico	No hay cambios		
<i>FDX1</i>	Codifica una proteína <i>iron-sulfur</i> que transfiere electrones de NADPH a través de la ferredoxina reductasa al citocromo mitocondrial P450			
<i>ALCAM</i>	Codifica la molécula de adhesión de células de leucocitos activada			

<i>ITPRI</i>	Codifica un receptor intracelular para inositol 1,4,5-trifosfato	Expresión similar	Genes analizados como posibles biomarcadores de embarazo en humanos	Kordus and LaVoie, 2016
<i>LDHA</i>	Codifica una proteína que cataliza la conversión de L-Lactato y NAD en piruvato y NADH (etapa final de la glicólisis anaeróbica)			
<i>PKM</i>	Codifica una proteína implicada en la glucólisis. Es una piruvato quinasa que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo de fosfoenolpiruvato a ADP, generando ATP y piruvato			
<i>PTH1H</i>	Codifica una proteína que es miembro de la familia de la hormona paratiroidea. Regula el desarrollo de las interacciones epiteliales-mesenquimales durante la formación de glándulas mamarias			
<i>SLC2A1</i>	Codifica un transportador de glucosa principal en la barrera hematoencefálica de mamíferos. Se encuentra principalmente en la membrana celular y en la superficie celular			
<i>STS</i>	Codifica una proteína de membrana <i>multi-pass</i> localizada en el ER. Hidroliza varios sulfatos de 3-beta-hidroxiesteroides, que sirven como precursores metabólicos para los estrógenos y los andrógenos			
<i>TBX6</i>	Es un miembro de una familia conservada filogenéticamente de genes que comparten un dominio común de unión al ADN. Codifica factores de transcripción involucrados en la regulación de procesos de desarrollo			
<i>TGFB1</i>	Codifica un ligando secretado de la superfamilia TGF-beta de proteínas. Regula la proliferación, diferenciación y crecimiento celular			
<i>THBS1</i>	Codifica una proteína que es una subunidad homotrimérica unida a disulfuro. Esta proteína es una glicoproteína adhesiva que media las interacciones de célula a célula y de célula a matriz			
<i>HSD3B1</i>	Codifica una enzima que cataliza la conversión oxidativa de precursores delta-5-3-B-hidroxiesteroide en delta-4-cetosesteroides			
<i>SERPINE2</i>	Codifica un miembro de la familia de proteína serpinas (inhiben las serinas proteásicas)			
<i>AHR</i>	Factor de transcripción helix-loop-helix activado por ligando implicado en la regulación de respuestas biológicas a hidrocarburos aromáticos planos			
<i>ALDOA</i>	Enzima glicolítica que cataliza la conversión reversible de la fructosa 1,6-bisfosfato en gliceraldehído 3-fosfato y dihidroacetona fosfato			
<i>CALM2</i>	Miembro de la familia de genes de la calmodulina			
<i>DPYSL3</i>	Está implicado en la orientación del axón, el colapso del cono de crecimiento neuronal y la migración celular			
<i>ERG1</i>	Codifica un canal de potasio activado por voltaje perteneciente a la familia EAG			
<i>EREG</i>	Codifica una hormona peptídica secretada y miembro de la familia de proteínas de EGF. Participa en una amplia gama de procesos biológicos (maduración de ovocitos entre otros)			
<i>IL6ST</i>	Codifica una proteína, transductor de señal. Funciona como una parte del complejo receptor de citoquinas			
<i>INHBA</i>	Codifica un miembro de la superfamilia de proteína TGF-beta			
<i>SCARB1</i>	Es un receptor de membrana plasmática para HDL. La proteína codificada media la transferencia de colesterol hacia y desde HDL			
<i>SERPINA3</i>	Inhibidor de proteasa plasmática y miembro de los inhibidores de la clase serin proteasa			

BMP2	Codifica un ligando secretado de la superfamilia TGF-beta de proteínas. Desempeña un papel en el desarrollo del hueso y del cartilago	Aumenta	Interacción ovocito-células somáticas en el ovario humano	Chang, Qiao and Leung, 2016
BMP4	Codifica un ligando secretado de la superfamilia TGF-beta de proteínas. Esta proteína regula el desarrollo del corazón y la adipogénesis			
BMP6	Codifica un ligando secretado de la superfamilia TGF-beta de proteínas. Esta proteína regula una amplia gama de procesos biológicos incluyendo la homeostasis del hierro, el desarrollo de la grasa y del hueso y la ovulación			
GDF8	Codifica un ligando secretado de la superfamilia TGF-beta de proteínas. Esta proteína regula negativamente la proliferación y diferenciación de las células del músculo esquelético			
BMP7	Codifica un ligando secretado de la superfamilia TGF-beta de proteínas. Desempeña un papel en el desarrollo del tejido adiposo óseo y marrón	Disminuye		
GDF9	Codifica un ligando secretado de la superfamilia TGF-beta de proteínas. Esta proteína regula la función ovárica. La expresión reducida de este gen puede estar asociada con el síndrome de ovario poliquístico	No hay cambios		
CLOCK	Juega un papel central en la regulación de los ritmos circadianos. La proteína codificada forma un heterodímero con BMAL1	Aumenta	Expresión de genes circadianos y esteroidogénesis	Chen et al., 2016
PER2	Miembro de familia de genes <i>Period</i> y se expresa en un patrón circadiano en el núcleo supraquiasmático	Aumenta		
STAR	Codifica una proteína que desempeña un papel clave en la regulación de la síntesis de hormonas esteroides mediante el aumento de la conversión de colesterol en pregnenolona	Aumenta		
BMAL1	Codifica una proteína básica helix-loop-helix que forma un heterodímero con CLOCK. Los defectos en este gen se han relacionado con la infertilidad, los problemas con la gluconeogénesis y la lipogénesis	Expresión similar		
HSD3B2	Codifica una proteína que es una enzima bifuncional. Desempeña un papel crucial en la biosíntesis de todas las clases de esteroides hormonales. Este gen se expresa predominantemente en las suprarrenales y las gónadas	No hay cambios		
FOXO3A	Codifica una proteína que probablemente funciona como un desencadenante de la apoptosis mediante la expresión de genes necesarios para la muerte celular	Aumenta (Ratas)	Activación del folículo primordial prematuro	Sobinoff, Sutherland and McLaughlin, 2012
TSC2	Se cree que su producto génico es un supresor de tumores y es capaz de estimular GTPasas			
TSC1	Codifica una proteína inhibidora del crecimiento que se cree que desempeña un papel en la estabilización de la tuberina			
AKT1	Codifica una proteína serin/treonin quinasa que es catalíticamente inactiva en fibroblastos primarios			
PKD1	Quinasa que desempeña un papel clave en la regulación de la glucosa, en el metabolismo de los ácidos grasos y la homeostasis a través de la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa			
RSP6	Codifica una proteína llamada RSPH6A			
AMH	Codifica un ligando secretado de la superfamilia TGF-beta de proteínas. También desempeña un papel en diferenciación de células de Leydig y en la función y desarrollo folicular en las mujeres adultas	Aumenta Disminuye	Depleción de folículos primordiales maduros	

<i>PTEN</i>	Identificado como un supresor de tumores que está mutado en un gran número de cánceres a alta frecuencia. La proteína codificada por este gen es una fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa	Aumenta (Ratas)	Activación inducida de folículos primordiales	
<i>COX2</i>	Es un regulador clave de la respuesta inflamatoria, que media tanto la activación como la represión de distintas clases de genes inmunes	Aumenta	Marcadores de calidad de oocitos y embriones	Uyar, Torrealda y and Seli, 2013
<i>SCD1</i>	Codifica una enzima implicada en la biosíntesis de ácidos grasos, principalmente la síntesis de ácido oleico			
<i>SCD5</i>	Es una proteína de membrana integral del retículo endoplasmático que cataliza la formación de ácidos grasos monoinsaturados a partir de ácidos grasos saturados			
<i>BDNF</i>	Codifica un miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento nervioso. Puede desempeñar un papel en la regulación de la respuesta al estrés y en la biología de los trastornos del estado de ánimo	Disminuye		
<i>Figla</i>	Codifica una proteína que funciona en la expresión génica específica de ovocitos posnatales	Aumenta	Desarrollo de folículos primordiales	
<i>KL</i>	Codifica una proteína de membrana de tipo I que está relacionada con beta-glucosidasas			
<i>IGF1</i>	Codifica una proteína que es similar a la insulina en función y estructura. Miembro de una familia de proteínas implicadas en la mediación del crecimiento y el desarrollo			
<i>KGF</i>	Codifica una proteína que es un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos. Posee una amplia actividad mitogénica y de supervivencia celular	Aumenta	Proliferación de células de la granulosa	Palma et al., 2012
<i>FOXL2</i>	Codifica un factor de transcripción de horquilla. La proteína contiene un dominio de unión al ADN de la cabeza de la horquilla y puede desempeñar un papel en el desarrollo y la función ovárica		Bloqueo de la etapa de folículo primario y primordial	
<i>SOX3</i>	Codifica un miembro de la familia SOX de factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino celular		Infertilidad con un desarrollo folicular normal	
<i>CREB1</i>	Codifica un factor de transcripción miembro de la familia de cremalleras leucina de proteínas de unión al ADN. Induce la transcripción de genes en respuesta a la estimulación hormonal de la vía del AMPc	Aumenta	Vías de señalización en células inmaduras de la granulosa	Hunzicker dunn and Maizels, 2006
<i>FOXO1</i>	Pertenece a la familia <i>forkhead</i> de factores de transcripción que se caracterizan por un dominio <i>forkhead</i> distinto. Puede desempeñar un papel en el crecimiento miogénico y la diferenciación	Disminuye		
<i>ALDH3A2</i>	Cataliza la oxidación de aldehídos alifáticos de cadena larga a ácidos grasos	Aumenta	Niveles de respuesta y expresión frente a estrés oxidativo	González-Fernández et al., 2016
<i>AGTRI</i>	Codifica un receptor de tipo I que se cree que media los principales efectos cardiovasculares de la angiotensina II	Aumenta	Correlación con diagnóstico de infertilidad	Peña et al., 2010

AGTR2	Proteína de membrana integral que se ve altamente expresada en el feto. Se ha demostrado que media la muerte celular programada	Aumenta	Asociación entre BMI y expresión génica de AMH	Nouri et al., 2016
AMHR2	Serin/ treonin quinasa con un único dominio transmembrana que se engloba en la familia del receptor de tipo II para las proteínas relacionadas con TFG-beta	Disminuye		
GAPDH	Codifica un miembro de la familia de proteínas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. La proteína ha sido identificada como una proteína <i>moonlight</i>	No hay cambios		
BRCA1	Está implicado en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, específicamente la vía de recombinación homóloga para la reparación del ADN de doble hebra	Aumenta	Expresión de genes durante el desarrollo preimplantación	Wells, 2005
BRCA2	Está implicado en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, específicamente la vía de recombinación homóloga para la reparación del ADN de doble hebra			
ATM	La proteína pertenece a la familia PI3 / PI4-quinasa. Es una quinasa importante del punto de control del ciclo celular que se encarga de fosforilar			
APC	Codifica una proteína de varios dominios que desempeña un papel importante en la formación de tumores al antagonizar la vía de señalización de WNT	Disminuye		
TP53	Codifica una proteína supresora de tumores que contiene activación transcripcional, dominios de unión a ADN y oligomerización	Aumenta Disminuye		
BUB1	Codifica una Serin/Treonin quinasa que desempeñan un papel central en la mitosis	No hay cambios		
ACTB	Es un constituyente principal del aparato contráctil y una de las dos actinas citoesqueléticas no musculares			
SUMO1	Codifica una proteína que es un miembro de la familia SUMO. Se une a las proteínas diana como parte de un sistema de modificación postraducciona			
NOBOX	Codifica un factor de transcripción que se cree que juega un papel en la oogénesis	No hay cambios	Expresión en humanos del gen NOBOX en oocitos y folículos ováricos	Huntriss, 2006

Tabla 1. Relación de genes estudiados en células de la granulosa en relación con el desarrollo folicular identificados en la búsqueda bibliográfica

4.2 Resultado del estudio de STRING

En el estudio de esta base de datos, se ha realizado una investigación a dos niveles. Primero, a un nivel menos restringido marcando como opciones “*Experiments*” + “*Textmining*” (Nivel 1) y segundo a un nivel más restrictivo marcando como opción sólo “*Experiments*” (Nivel 2).

En el Nivel 1 hemos seleccionado dos tipos de evidencias que contribuyeron a la predicción de nuestro mapa. Constatamos tanto “*Experiments*” que muestra una lista de datos de interacción de proteínas importantes, recogidos de otras bases de datos de interacción proteína-proteína,

como “*Textmining*” que nos recoge una lista de grupos significativos de interacción de proteínas, extraídos de los resúmenes de la literatura científica. Al abarcar dos tipos de fundamentos, la búsqueda que se realiza es mayor que la que se hace al tener marcado sólo una opción (Nivel 2), por lo que decimos que este último nivel es más restrictivo debido a que sólo nos mostrará las interacciones entre proteínas recopiladas a partir de otras bases de datos sin tener en cuenta los resúmenes de la bibliografía científica.

A continuación, se verán una serie de figuras en donde se muestran los diferentes mapas. Las figuras 3 y 4 muestran el mapa de interacciones obtenido con el conjunto de genes analizados usando el Nivel 1 y Nivel 2 de interacciones. Podemos observar que algunos genes tienen múltiples interacciones con otros, mientras que algunos poseen muy pocas interacciones o ningunas.

La complejidad de interacciones observadas nos da una idea del abundante conocimiento que existe actualmente sobre la función e interacción de proteínas en las células. Sin embargo, se hace muy difícil extraer conclusiones sin realizar un filtrado de los datos.

Aplicando un algoritmo matemático de agrupamiento en redes (MCL) proporcionado por el programa STRING, en el que se asigna una puntuación a cada interacción por su fortaleza, podemos establecer grupos de genes que se relacionan más directamente y eliminar aquellos miembros con ninguna interacción o con una puntuación por debajo del umbral de confianza.

4.2.1.-Resultado de agrupamiento de interacciones considerando el Nivel 1 de interacciones:

En este primer mapa de interacción (Fig.3) observamos cómo hay una inmensa cantidad de genes presentes. Se muestra en la figura 3 las diferentes interacciones que pueden ser; múltiples (como el caso de *AKT1* o *PT53*), escasas (como *CLOCK* o *HOMER*) o ninguna (éstas se han excluido del mapa para hacer más visible la interpretación).

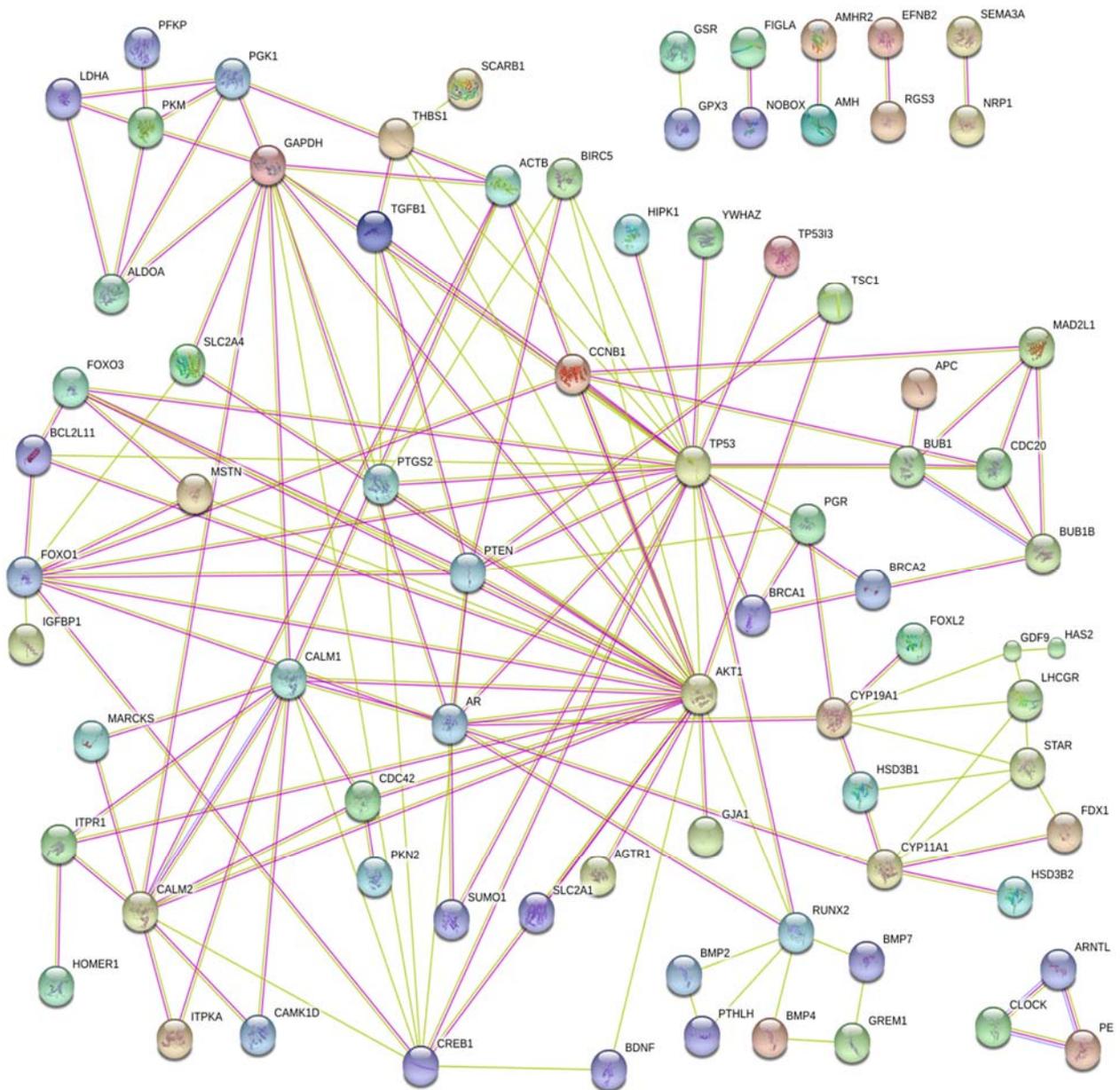


Figura 3. Mapa de interacciones proteína-proteína obtenido a partir del programa STRING (Nivel 1)

Los genes implicados en este mapa de interacción (Fig.3) están relacionados con procesos celulares que parece que son importantes para la fisiología de estas células en el folículo. Al hacerse difícil la conclusión debido a la cantidad de información que se puede recabar de dicha foto, pasamos usar el algoritmo matemático explicado anteriormente para obtener un mapa de interacciones del cual si podemos sacar un desenlace. A continuación, se muestra la Figura 4 donde se ha procedido a clusterizar, de tal manera que obtenemos un estudio de agrupamiento de las interacciones por su valor y podemos detectar grupos de genes con valores de interacciones más altos.

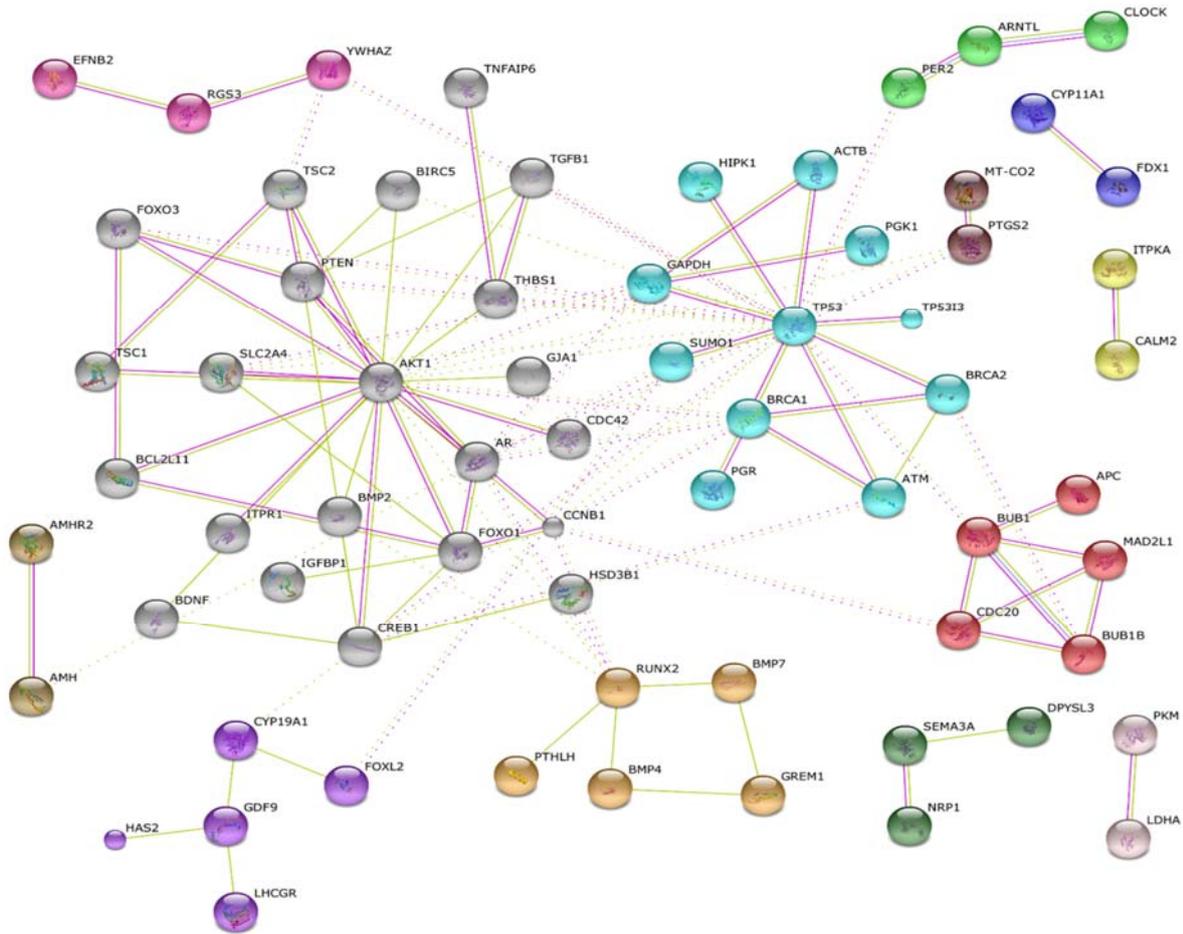


Figura 4. Mapa de interacciones proteína-proteína obtenido a partir del programa STRING clusterizado (Nivel 1)

En dicha representación (Fig.4) podemos diferenciar un total de cuatro grupos que parecen hacer referencia a procesos celulares importantes.

El grupo gris (nodo *ATK1*), el que ocupa mayor espacio, analizado con ayuda de la base de datos se ha llegado a la conclusión que está relacionado con funciones de diferenciación celular y proliferación, a la par con el estrés oxidativo y procesos de apoptosis. Dentro de este grupo, los genes que están relacionados con el desarrollo de la estructura reproductiva, el sistema reproductivo y el proceso reproductivo son el *ATK1* y el *PTEN*.

El grupo agua-marina (nodo *TP53*) junto con el grupo marrón (nodo *AMH*) se vio que están relacionados con procesos de replicación de DNA y de reparación de daño del DNA. Además, vemos como tres de los genes que se incluyen en este cluster (*TP53*, *BRCA1* y *PTGS2*) están relacionados con procesos de regulación de la apoptosis y con la regulación de la muerte celular programada.

El grupo rojo (nodo *CDC20*) se relaciona con procesos de regulación negativa del desarrollo de las células y procesos de regulación negativa de la organización de componentes celulares. Sin embargo, también lo vemos relacionado con el proceso del ciclo celular.

Por último y relacionando dos grupos, el grupo naranja (nodo *BMP4*) junto con el grupo rosa (nodo *RGS3*) vemos como ambos están relacionados con procesos de regulación en el ciclo celular, en la morfogénesis de las glándulas mamarias y en el proceso del ciclo de ovulación.

4.2.1.-Resultado de agrupamiento de interacciones considerando el Nivel 2 de interacciones:

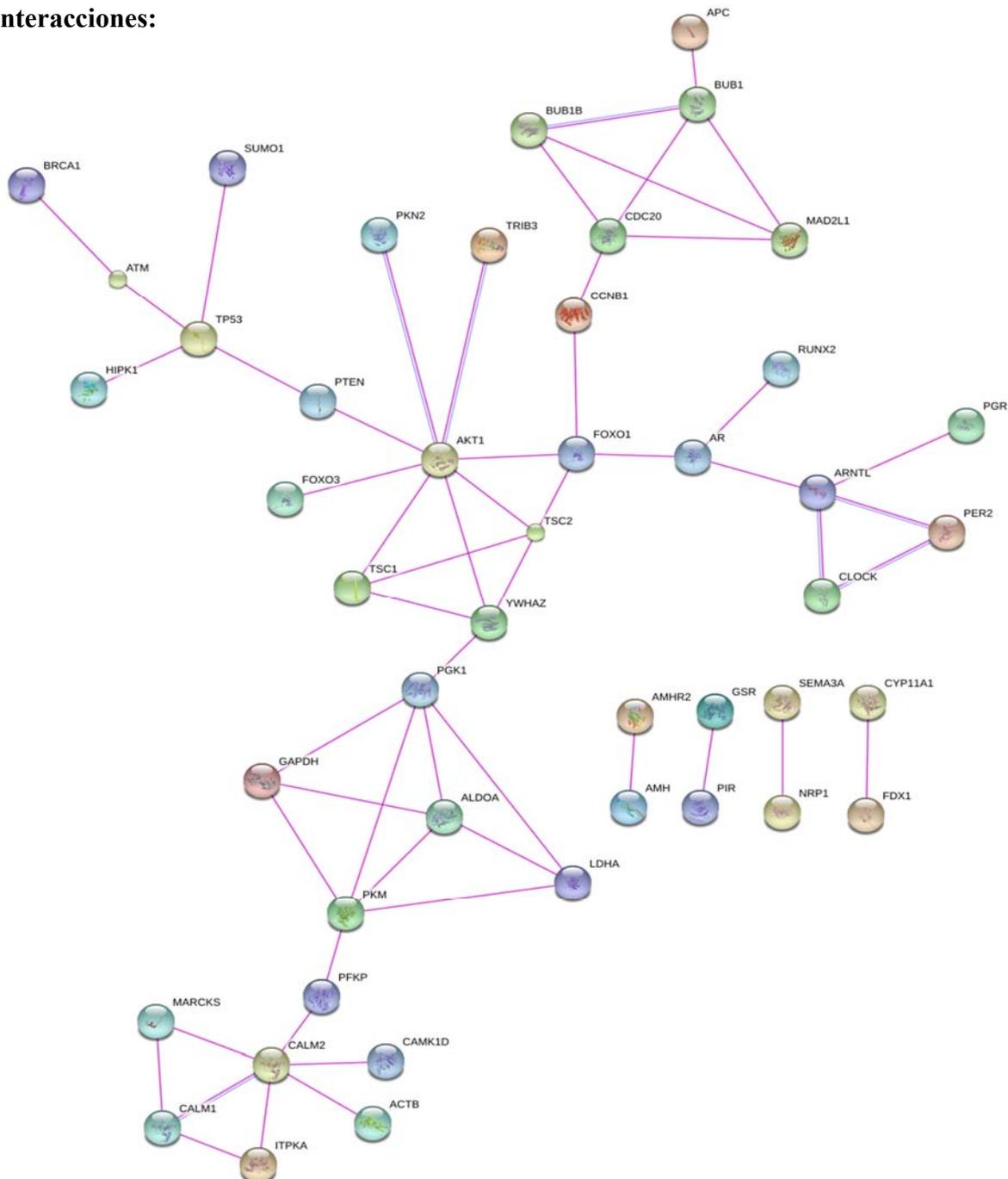


Figura 5. Mapa de interacciones proteína-proteína obtenido a partir del programa STRING (Nivel 2)

En este caso (Fig.5) nos encontramos, como ya esperábamos, con un total de genes más reducido que en el Nivel 1. Recordando el inicio de este apartado, sabemos que el Nivel 2 era más restrictivo que el anterior, por lo que eran de esperar este mapa de interacción. Todos los genes representados en dicho mapa están relacionados con procesos celulares que parece que son importantes en la fisiología de la célula del folículo.

Para sacar unas conclusiones más verídicas procedemos a clusterizar nuestro mapa. De tal manera que usamos el clustering MCL, pero en este caso lo hacemos a dos niveles (uno más restrictivo que otro) para poder observar bien las diferentes interacciones en los genes con el fin de redactar las conclusiones adecuadas.

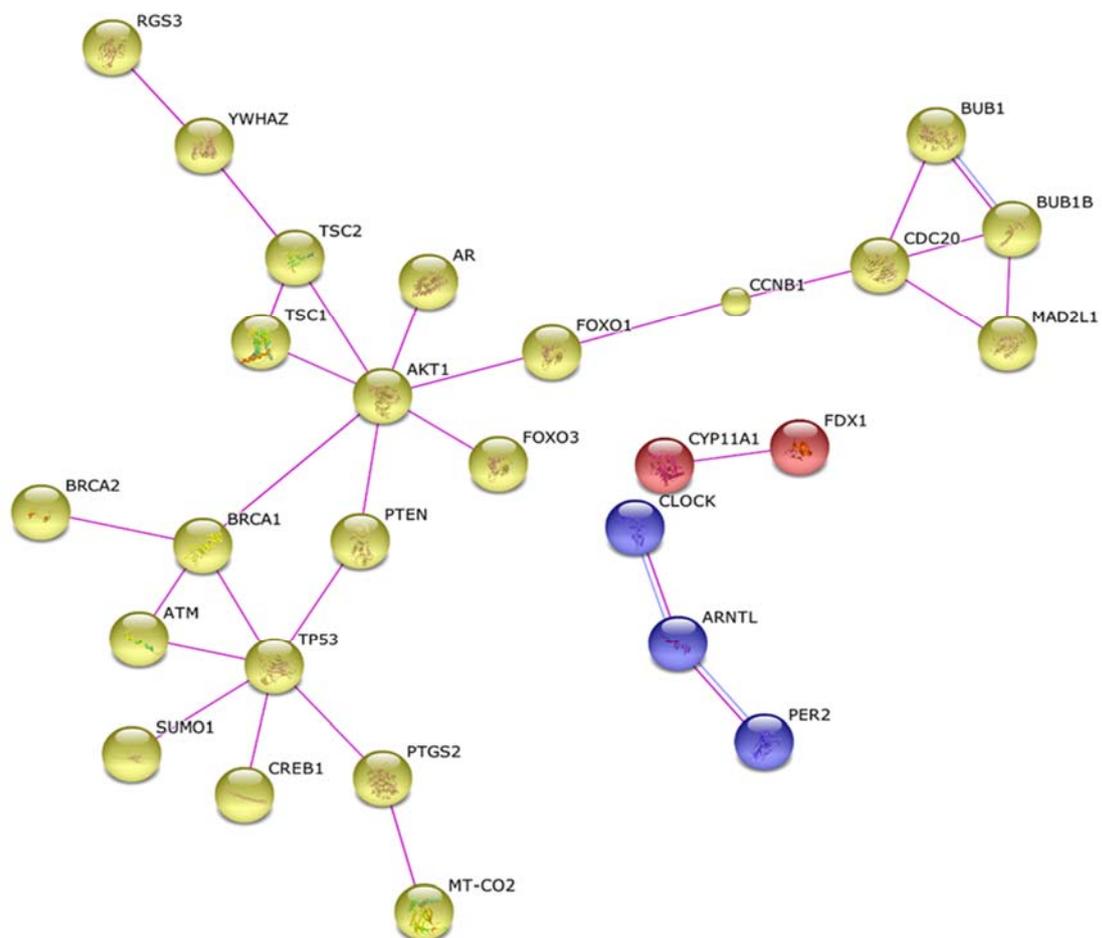


Figura 6. Mapa de interacciones proteína-proteína obtenido a partir del programa STRING clusterizado 1 menos restrictivo (Nivel 2)

En esta primera imagen (Fig.6) vemos como obtenemos un total de 1 de los 4 grupos nombrados anteriormente englobado en un grupo mayor. En este caso, están interconectados lo que nos indica que los procesos están interrelacionados.

Además, vemos también un grupo más pequeño, el grupo lila (nodo *CLOCK*) que se relaciona con procesos de regulación del ciclo circadiano de las células. Esto puede ser interesante, ya que el desarrollo folicular está implicado en un proceso circadiano, como es el ciclo menstrual. Después de haber analizado la primera imagen, sacada a partir de un nivel de clustering MCL menos restrictivo, pasamos a analizar la segunda imagen (Fig.7) con un nivel de mayor restricción.

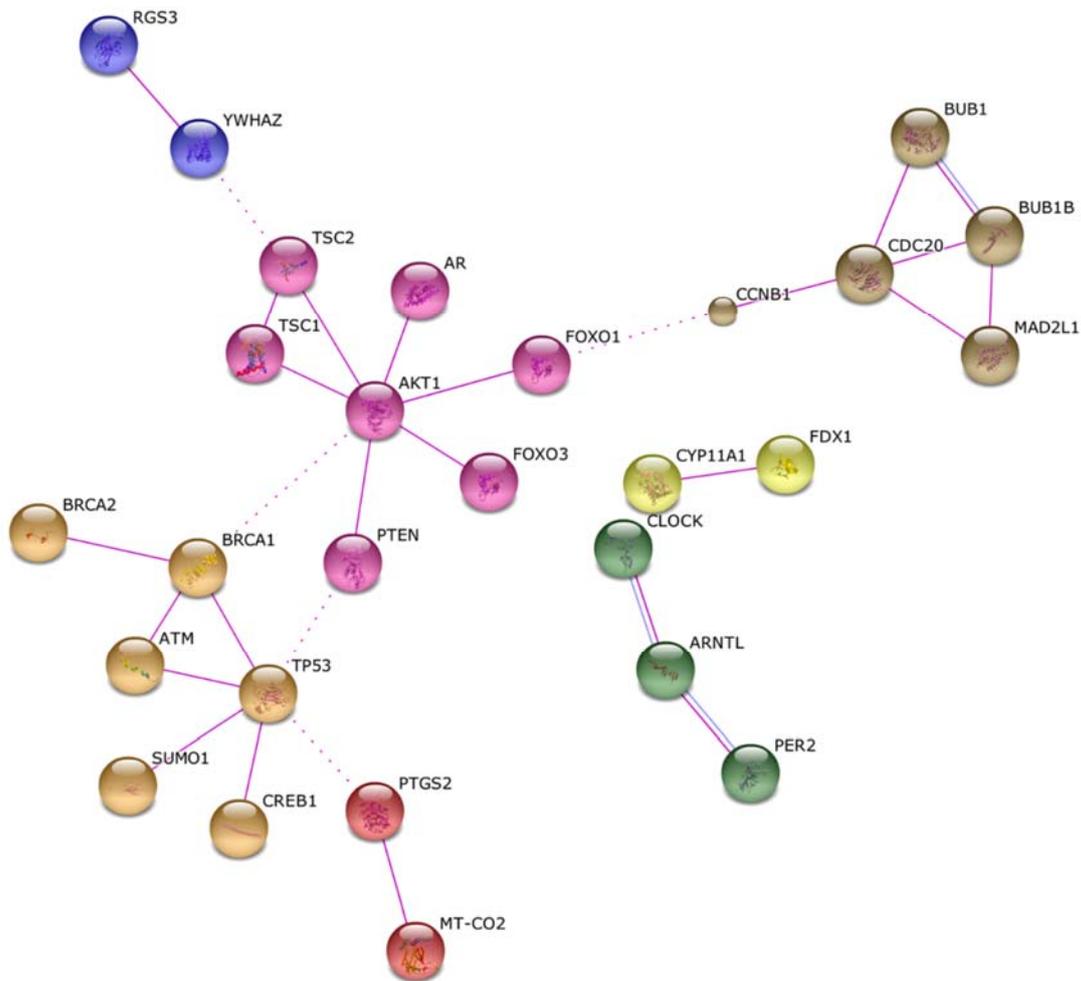


Figura 7. Mapa de interacciones proteína-proteína obtenido a partir del programa STRING clusterizado 2 más restrictivo (Nivel 2)

En este caso (Fig.7), seguimos obteniendo los mismos grupos que en el primer análisis, pero con menos miembros debido a que estamos en el análisis más restrictivo. Seguimos viendo el grupo con nodo *ATK1* relacionado con funciones de diferenciación y proliferación celular, el grupo con nodo *TP53* implicado en procesos de replicación y reparación de DNA, el grupo con nodo *CLOCK* descrito en procesos de regulación de ciclos circadianos, el grupo con nodo *RGS3* vinculado con procesos de diferenciación dentro del tejido y el grupo con nodo *CDC20* enlazado con procesos de mitosis.

5. DISCUSIÓN

5.- Discusión

En los últimos años se ha logrado progresar en el conocimiento de interesantes mecanismos de control intraovarino que coordinan, de acuerdo con diferentes señales sistémicas, el reclutamiento, la selección y el crecimiento de los folículos desde el estadio primordial hasta la ovulación. En este trabajo hemos puesto de manifiesto un estudio, a partir del cual, se han podido identificar varios procesos celulares que podrían estar relacionados con aspectos críticos en el desarrollo folicular y constituir puntos de interés para la identificación de genes marcadores relacionados con un desarrollo folicular óptimo. A continuación, describiremos brevemente cada uno de estos procesos y su implicación en el desarrollo folicular.

5.1- Proceso de proliferación y diferenciación

Una de las rutas con mayor número de genes en nuestros resultados es aquella relacionada con el proceso de proliferación y diferenciación. Para que la foliculogénesis y la ovogénesis se produzcan se necesitan muchos factores intrínsecos y extrínsecos, es decir, una retroalimentación positiva de la secreción hormonal y la distribución local de los factores de crecimiento ovárico y folicular. (Kranc W et al., 2017)

Durante la formación folicular, las células de la granulosa (GC) cambian su morfología y sus propiedades fisiológicas, es este uno de los procesos que se ve intervenido por los genes que hemos mostrado en la Tabla 1, como puede ser el *PTEN* (induce la activación de folículos primordiales). Además, otros factores necesarios para que las GC se vayan diferenciando capa a capa es el *TGFBI* (regula la proliferación, diferenciación y crecimiento celular) y el *IGFBPI* (su concentración aumenta si hay exposición a agentes citotóxicos). La activación y modificación de las vías bioquímicas implicadas en la foliculogénesis se requiere para un mejor crecimiento de las GC.

Estudios en los últimos años indican una variedad de procesos involucrados en la morfología folicular y remodelación bioquímica durante el crecimiento y el desarrollo. Se demostró que los IGF desempeñan un papel central en la diferenciación de GCs tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, se describió también el papel primario de la FSH y la LH en la formación del folículo ovárico. (Kranc W et al., 2017). Es decir, la proliferación y diferenciación es un proceso imprescindible para la evolución de los folículos primarios hasta los maduros.

En esta ruta encontramos que también aparecen *FOXO1* y *FOXO3*, genes implicados en la regulación de la apoptosis en folículos. Los miembros de la familia de factores de transcripción FOXO se expresan en las células de la granulosa durante varias etapas del desarrollo folicular

(Pisarska et al., 2009) (Liu et al., 2013). Actualmente, se ha demostrado que *FOXO1*, *FOXO3* y *FOXO4* se expresan en las células de la granulosa en humanos, lo que puede sugerir que estos factores de transcripción también estén involucrados en la foliculogénesis humana y la luteinización. Sin embargo, se crea la necesidad de realizar estudios posteriores que serán necesarios para determinar su papel en el ovario humano (Pisarska et al., 2009). Se ha demostrado que en mujeres con POF (premature ovarian failure) los genes *FOXO1* y *FOXO3* adquieren mutaciones, por lo esto es otra evidencia para corroborar que este paquete de genes también desempeña un papel importante en los procesos señalados anteriormente. (Pisarska et al., 2009).

El desarrollo folicular ovárico es un proceso altamente orquestado, en el cual múltiples vías de señalización desempeñan papeles críticos en etapas específicas del crecimiento. Menos del 1% de todos los folículos que están presentes en el ovario de mamífero al nacer ovulan y luteinizan hasta convertirse en células secretoras de progesterona capaces de soportar el embarazo. Más del 99% sucumben a la atresia y la pérdida completa de células de la granulosa por muerte celular programada. Por lo tanto, el equilibrio entre el crecimiento del folículo y la ovulación frente a la atresia se regulan con precisión mediante factores promotores del crecimiento frente a factores restrictivos del mismo. La comprensión de dichos factores es de suma importancia para controlar los folículos en crecimiento y permitir que éstos den lugar a ovocitos sanos que puedan tener éxito (Liu et al., 2013).

5.2- Proceso de reparación y replicación del DNA

Otra ruta que es de interés comentar es la relacionada con la reparación y replicación del DNA. Los radicales libres y otras especies reactivas están implicados en la fisiología ovárica normal. Sin embargo, también son altamente reactivos con moléculas complejas (proteínas, lípidos y DNA) y alteran sus funciones que conducen al estrés oxidativo. El daño oxidativo puede desempeñar un papel destacado en el desarrollo de trastornos que influyen considerablemente en la fertilidad femenina.

Encontramos un grupo de genes agrupados en STRING como son el *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* y *p53*. Todos ellos están relacionados con la respuesta al daño celular. En conjunto, estos genes se encargan de activar la reparación de DNA por rotura de la doble hebra del mismo. Un aumento de la expresión podría significar un aumento del daño celular que produciría una rotura de DNA. El daño es necesario repararlo para que pueda tener lugar la síntesis y división celular durante la proliferación.

El *BRCA1* y el *BRCA2* son genes humanos que producen proteínas supresoras de tumores. Éstas son las encargadas de ayudar a reparar el DNA dañado y, por tanto, aseguran la estabilidad del material genético de las células. Las mutaciones en estos genes aumentan la probabilidad de que las células presenten alteraciones genéticas adicionales que pueden conducir al cáncer.

El gen *ATM* codifica una proteína ATM serin/treonin que está implicada en la regulación de los procesos de control de la división celular y en la reparación de daños sufridos en la molécula de DNA. Cuando este gen presenta alguna mutación se predispone a la aparición de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el de ovario.

P53 por su parte es una proteína supresora de tumores. Se le considera el “guardián del genoma”. Resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del DNA, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. Una mutación en este gen podría permitir que células anormales proliferen dando por resultado cáncer.

Se han identificado más de 100 mutaciones en dichos genes, aunque muchas se relacionan con un mayor riesgo de cáncer, poco se ha estudiado sobre su papel en el proceso de desarrollo folicular, por lo que sería interesante lanzar un estudio analizando la expresión de estos genes durante las diferentes fases de desarrollo de los folículos y relacionarlo con parámetros de calidad del oocito.

Adicionalmente, el gen *AMH* (miembro de la superfamilia de TGF) se expresa en las células de la granulosa hasta el estadio medio antral en humanos, lo que supone una implicación funcional continua de este gen en el desarrollo del folículo.

Varios estudios realizados sobre la función de AMH en el ovario indican que al menos tiene dos funciones. Una de ellas es que desempeña un papel inhibitorio durante el reclutamiento inicial, cuando los folículos primordiales en reposo se inician para crecer. La segunda recae sobre su capacidad de modificar el crecimiento folicular antral y preantral disminuyendo la respuesta de FSH del folículo. Este efecto puede ser importante durante el reclutamiento cíclico, cuando los folículos son seleccionados para crecer hasta la etapa final.

Por otra parte, en las mujeres hay indicios de que *AMH* puede ser utilizado como marcador para el envejecimiento ovárico y como marcador de la respuesta ovárica en las mujeres sometidas a tratamiento de fecundación *in vitro*. (Durlinger et al., 2002), así como marcador tumoral en células de las granulosa. (Durlinger et al., 2002).

Por último, encontramos una serie de hormonas, entre ellas la melatonina, que son capaces de comportarse como un antioxidante eficaz para proteger las macromoléculas contra el estrés oxidativo causado por especies reactivas, es decir, protegen la rotura del DNA. El equilibrio entre las especies reactivas del oxígeno y los antioxidantes dentro del folículo parece ser crítico a la función de las células del ovocito y de la granulosa.

Por tanto, los resultados obtenidos en los estudios en rutas de reparación y replicación de DNA parecen indicar que este proceso está íntimamente ligado con un buen desarrollo folicular.

5.3.-Proceso de regulación del ciclo circadiano

A diferencia de las rutas anteriores, la regulación del ciclo circadiano durante el desarrollo folicular ha sido muy poco estudiado.

Algunos estudios han demostrado que los *genes circadianos* podrían estar involucrados en el desarrollo de síndrome de ovario poliquístico, siendo el hiperandrogenismo una característica distintiva. Sin embargo, el efecto de esta característica en la expresión génica circadiana de las GC humanas es desconocido y el patrón de expresión general de estos genes en el ovario a día de hoy no está clara. (Chen et al., 2016). Se ha observado por medio de inmunohistoquímica en ovarios humanos la expresión de proteínas circadianas como pueden ser *CLOCK* y *PER2*.

Estos fueron detectados en las células de la granulosa de folículos antrales dominantes, pero estaban ausentes en los folículos primordiales, primarios y preantrales. Se ha descubierto que si se realiza una estimulación con testosterona se comprueba una expresión oscilante de *PER2* y una expresión aumentada de *CLOCK*. La expresión oscilante del gen *PER2* puede ser inducida en GC humanas in vitro (Chen et al., 2016). Estos resultados indican una posible relación entre el reloj circadiano y la esteroidogénesis en el ovario humano. Además, demuestran el efecto de la testosterona en la expresión génica circadiana en células de la granulosa.

5.4.- Proceso de diferenciación dentro del tejido

Dentro de este proceso se encuentran los genes englobados en el nodo *RGS3*, que incluiría a los genes *RGS3*, *YWHAZ* y *EFNB2*.

El gen *YWHAZ* codifica para una proteína con un importante componente apoptótico. Esta proteína desempeña un papel importante durante el desarrollo embrionario y sirve como un mecanismo tanto de diferenciación de tejido como de eliminación de células “no deseadas”. Se ha visto que dicha proteína ha estado implicada en muchos tipos de cánceres, entre ellos el de mama. (Matta, Siu and Ralhan, 2012)

Por su parte el gen *EFNB2* codifica un miembro de la familia de las efrinas. Éstas han sido implicadas en la mediación de eventos de desarrollo, especialmente en el sistema nervioso y en la eritropoyesis. Se ha realizado un estudio cuyos resultados nos proponen que la elevada expresión de este gen (junto con transcritos que codifican para los receptores) es predictivo de un resultado favorable de un neuroblastoma. (Tang, XX et al., 2000)

La generación de tejidos durante el desarrollo requiere mecanismos coordinados que regulan la diferenciación de las células en el momento y lugar apropiados.

5.5.- Proceso de mitosis

En este caso, los genes encontrados que se incluyen dentro de esta ruta son *CD20*, *BUB1*, *BUB1B* y *MAD2L1*. Una expresión elevada o disminuida de estos genes puede indicar un desequilibrio del proceso de mitosis y, por ende, afectar al desarrollo folicular.

Se realizó un estudio centrado en los genes *MAD2L1* y *BUB1* que juegan un papel importante en el proceso mitótico. La investigación mostró una alta expresión asociada con un mal pronóstico de cáncer de mama y pueden desempeñar un papel importante en la progresión del mismo. (Wang et al., 2015).

Un proceso correcto de mitosis se hace necesario para el desarrollo folicular óptimo. Los puntos de control mitóticos mutados son una característica común de muchos cánceres humanos.

6. CONCLUSIONES

6.- Conclusión

Las principales conclusiones extraídas de este estudio son:

- 1.- El análisis de las bases de datos bibliográficas ha permitido identificar un gran número de genes cuya expresión está relacionada con diferentes fases del desarrollo folicular y patologías relacionadas con infertilidad en la mujer, poniendo de manifiesto la existencia de una gran dispersión en los resultados que dificulta identificar los principales procesos celulares implicados en el desarrollo folicular.
- 2.- El análisis de los patrones de interacción de estos genes mediante herramientas informáticas como “STRING” ha permitido identificar varios procesos celulares que pueden estar implicados de forma directa en desarrollo folicular, tales como: proliferación y diferenciación; reparación y replicación de DNA; ciclo circadiano; diferenciación celular y mitosis.
- 3.- El análisis de los estudios publicados sobre estos procesos celulares en el desarrollo folicular ovárico nos ha permitido identificar a los procesos de regulación del ciclo circadiano y de mitosis como posibles nuevas rutas de interés para la identificación de genes biomarcadores del desarrollo folicular.

6.- Conclusions

The main conclusions taken from this study are:

- 1.- The analysis of the bibliographic databases has allowed to identify many genes whose expression is related to different phases of follicular development and pathologies related to infertility in women, showing the existence of a great dispersion in the results which makes it difficult to identify the main cellular processes involved in follicular development.
- 2.- Analysis of the interaction patterns of these genes using computer tools such as "STRING" has allowed to identify several cellular processes that may be directly involved in follicular development, such as: proliferation and differentiation; DNA repair and replication; Circadian cycle; Cell differentiation and mitosis.
- 3.- The analysis of the published studies on these cellular processes in the ovarian follicular development has allowed us to identify the processes of regulation of the circadian cycle and mitosis as possible new routes of interest for the identification of biomarker genes of follicular development.

7. BIBLIOGRAFÍA

7.- Bibliografía

- Arteaga Martínez, S. and García Peláez, M.** (2014). *Embriología humana y biología del desarrollo*. 1st ed. México: Médica Panamericana.
- Botella Llusía, J.** (2000). *El ovario*. 1st ed. Ediciones Díaz de Santos.
- Chang, H., Qiao, J. and Leung, P.** (2016). Oocyte–somatic cell interactions in the human ovary—novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Human Reproduction Update*, 23(1), pp.1-18.
- Chen, M., Xu, Y., Miao, B., Zhao, H., Luo, L., Shi, H. and Zhou, C.** (2016). Expression pattern of circadian genes and steroidogenesis-related genes after testosterone stimulation in the human ovary. *Journal of Ovarian Research*, 9(1).
- Cruz MH, Leal CLV, Cruz JF, Tan DX and Reiter RJ** (2017). Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology* 82 (7), pp. 925-932.
- Durlinger AL, Visser JA and Themmen AP** (2002). Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 124, pp. 601–609.
- Emori, C., and Sugiura, K.** (2014). Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. *Animal Science Journal* 85, pp. 627-633.
- Fernández-Tresguerres Hernández, J., Ariznavarreta Ruiz, C. and Alfaro González, V.** (2010). *Fisiología humana*. 1st ed. México, D.F: McGraw-Hill-Interamericana.
- González-Fernández, R., Hernández, J., Martín-Vasallo, P., Puopolo, M., Palumbo, A. and Ávila, J.** (2016). Expression Levels of the Oxidative Stress Response Gene ALDH3A2 in Granulosa-Lutein Cells Are Related to Female Age and Infertility Diagnosis. *Reproductive Sciences*, 23(5), pp.604-609.
- Hunzickerdunn, M. and Maizels, E.** (2006). FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: Branching out from protein kinase A. *Cellular Signalling*, 18(9), pp.1351-1359.
- Jin, H., Won, M., Shin, E., Kim, H., Lee, K. and Bae, J.** (2017). EGR2 is a gonadotropin-induced survival factor that controls the expression of IER3 in ovarian granulosa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), pp. 877-882.
- Kidder, G.M., and Vanderhyden, B.C.** (2010). Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88, pp. 399- 413.
- Kranc, W., Budna, J., Kahan, R., Chachula, A., Bryja, A., et al.** (2017). Molecular basis of growth, proliferation, and differentiation of mammalian follicular granulosa cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 31(1), pp. 1-8.
- Kordus, R. and LaVoie, H.** (2016). Granulosa cells biomarkers to predict pregnancy in ART: pieces to solve the puzzle. *Reproduction* 153(2), pp. R69-R83.
- Li, R., and Albertini, D.F.** (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, pp. 141-152.
- Li, S., Liu, Y., Tseng, C. and Singh, S.** (2006). Analysis of gene expression in single human oocytes and preimplantation embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(1), pp.48-53.
- Liu, Z., Castrillon, D., Zhou, W. and Richards, J.** (2013). FOXO1/3 Depletion in Granulosa Cells alters follicle growth, death and regulation of Pituitary FSH. *Molecular Endocrinology*. 27(2), pp. 238-252.
- Mansur, A., Israel, A., Combelles, C., Adir, M., Racowsky, C., et al.** (2016). Bisphenol-A exposure and gene expression in human luteinized membrane

granulosa cells in vitro. *Human Reproduction*, 32(2), pp. 409-417.

Matta, A., Siu, K. and Ralhan, R. (2012). 14-3-3 zeta as novel molecular target for cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(5), pp.515-523.

Minghui Chen, Yanwen Xu, Benyu Miao, Hui Zhao, Huijuan Shi and Canquan Zhou (2016). Expression pattern of circadian genes and steroidogenesis-related genes after testosterone stimulation in the human ovary. *Chen et al. Journal of Ovarian Research* 9 (56).

Nathawanim P. (200). Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Receptor Gene Expression by 17 β -Estradiol in Cultured Human Granulosa-Luteal Cells. *Endocrinology*, 141(5), pp. 1754-1763.

Nouri, M., Aghadavod, E., Khani, S., Jamilian, M., Amiri Siavashani, et al. (2016). Association between BMI and gene expression of anti-Müllerian hormone and androgen receptor in human granulosa cells in women with and without polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology*, 85(4), pp.590-595.

Palma, G., Argañaraz, M., Barrera, A., Rodler, D., Mutto, A. and Sinowatz, F. (2012). Biology and Biotechnology of Follicle Development. *The Scientific World Journal*, Article ID 938138, pp.1-14.

Peña, Ó., Palumbo, A., González-Fernández, R., Hernández, J., Naftolin, F. and Ávila, J. (2010). Expression of angiotensin II type 1 (AT1) and angiotensin II type 2 (AT2) receptors in human granulosa-lutein (GL) cells: correlation with infertility diagnoses. *Fertility and Sterility*, 93(5), pp.1601-1608.

Pisarka, M., Kuo, F., Tang, D., Zarrini, P., Khan, S. and Ketefian, A. (2009). Expression of forkhead transcription factors in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 91(4), pp. 1392-1394.

Rajeshwar Govindarajan, M., Jeyapradha Duraiyan, Karunakaran Kaliyappan, and Murugesan Palanisamy (2012). *Microarray and its applications. J Pharm Bioallied Sci.* 4 (2) pp,310-312

Ross, M., Pawlina, W. and Negrete, J. (2011). *Histología*. 1st ed. Buenos Aries, Madrid [etc.]: Editorial Médica Panamericana.

Sobinoff, A., Sutherland, J. and Mclaughlin, E. (2012). Intracellular signalling during female gametogenesis. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 19(5) pp.265-278.

Tang, XX., Zhao, H., Robinson, ME., Cnaan, A., London, W., Cohn SL., et al. (2000). Prognostic significance of EPHB6, EFNB2 and EFNB3 expressions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 35(6), pp.656-658.

Uyar, A., Torrealday, S. and Seli, E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility*, 99(4), pp.979-997.

Wang, Z., Katsaros, D., Shen, Y., Fu, Y. and Canuto, E. (2015). Biological and Clinical Significance of MAD2L1 and BUB1, Genes Frequently Appearing in Expression Signatures for Breast Cancer Prognosis. *PLOS ONE*, 10(8), pp. 136-246.

Wells, D. (2005). Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Human Reproduction*, 20(5), pp.1339-134

Páginas web usadas:

-Búsqueda Bibliográfica:

Ncbi.nlm.nih.gov. (2017). *Home - PubMed - NCBI*.

[en línea] Disponible ent:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> [Primer acceso 7 febrero. 2017].

-Análisis de patón de interacciones, STRING:

String-db.org. (2017). *STRING: functional protein association networks*. [en línea] Disponible en: <https://string-db.org/> [Primer acceso 15 abril. 2017].