



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



**Facultad de Ciencias
Sección de Biología**

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*.

Sirtuin gene family expression in human granulosa cells, and their relationship to oocyte quality in *in vitro* fertilization techniques.

Rita Marleny Martín Ramírez

Grado en Biología

Julio, 2014

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 20<u>13</u>/<u>20</u><u>14</u>	ENTRADA Fecha: Núm:
---	--------------------------------------

Datos Personales

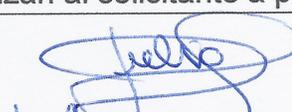
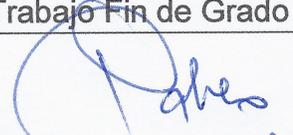
Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
54123743-M	RITA MARLENY MARTÍN RAMÍREZ
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
677 39 20 37	DVLCRYNY-R@HOTMAIL.COM AW01DD6D3637@ULL.EDU.ES

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

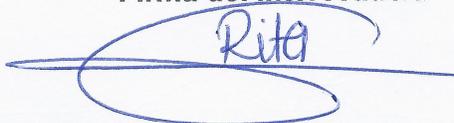
"ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE LA FAMILIA GÉNICA SIRTUINAS EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA HUMANA, Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD OCITARIA EN TÉCNICAS DE FECUNDACIÓN IN VITRO".

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. JULIO ÁVILA MARRERO	
Profesor/a del Departamento de	
y D./Dña. PABLO MARTÍN VASALLO	
Profesor/a del Departamento de	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.:  Julio T. Ávila Marrero	Fdo.:  PABLO MARTÍN VASALLO

La Laguna, a 8 de JULIO de 2014

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Descripción del modelo biológico estudiado.....	1
1.2 Regulación hormonal.....	4
1.3 Envejecimiento ovárico y estrés oxidativo.....	5
1.4 Las sirtuínas y la respuesta a estrés metabólico.....	8
2. Objetivos.....	9
3. Material y Métodos.....	10
3.1 Pacientes.....	10
3.2 Purificación de células de la granulosa humana y cultivo.....	10
3.3 Extracción de RNA.....	11
3.4 Síntesis de cDNA.....	11
3.5 PCR a tiempo real semi-cuantitativa (qRT-PCR).....	12
3.6 Determinación de la expresión relativa de cada gen.....	13
3.7 Análisis estadístico.....	13
3.8 Clonaje de SirT6 en pEGFP-c1 y pcDNA3.1(-).....	13
3.8.1 Construcción del plásmido.....	14
3.8.2 Selección de clones positivos.....	15
3.8.3 Transfección en células HeLa.....	16
3.8.4 Comprobación de la expresión de pEGFP-c1/SirT6.....	16
4. Resultados.....	16
4.1 Purificación de células de la granulosa.....	16
4.2 Cuantificación de la expresión.....	17
4.2.1 Expresión de los genes SirT1, SirT6 y SirT7 en células de la granulosa.....	18

4.2.2 Expresión de los genes SirT1, SirT6 y SirT7 en células de la granulosa en los diferentes tratamientos.....	18
4.3 Clonaje de la sirtuína 6 (SirT6).....	20
4.3.1 Comprobación de la funcionalidad de la construcción pEFGP-c1/SirT6-5.....	22
5. Discusión.....	23
5.1 Metodología de purificación de células de la granulosa humana.....	23
5.2 Expresión de los genes estudiados.....	24
5.3 Clonaje y transfección de SirT6.....	26
6. Conclusiones.....	27
7. Bibliografía.....	29

Resumen

En la actualidad, la tendencia a retrasar la maternidad hasta la cuarta década de la vida de la mujer implica que el envejecimiento reproductivo sea considerado una alteración de la reproducción que da lugar a la búsqueda de marcadores moleculares predictivos para conocer el estado fisiológico del ovocito. La comunicación bidireccional existente entre ovocito y células de la granulosa durante el desarrollo folicular nos permite valorar de forma indirecta el estado del ovocito analizando las células de la granulosa. La familia de genes denominada sirtuínas desacetilasas dependiente de NAD⁺) tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis metabólica, proliferación celular y protección frente al daño celular provocado por el estrés oxidativo. En este trabajo se pretende estudiar la expresión de SirT1, SirT6 y SirT7 en células de la granulosa y el efecto del tratamiento con FSH y glucosa. Mediante qRT-PCR se determinó el patrón de expresión de los genes estudiados y el incremento significativo de la expresión de SirT1 en respuesta a glucosa y FSH. Como herramienta para próximos estudios de tipo funcional se realizó la construcción del vector pEFGPc1/SirT6, el cual expresó la proteína fusión de la forma esperada. Los resultados obtenidos indican que, en células de la granulosa, los genes de sirtuínas participan en la regulación del metabolismo energético y en la respuesta celular a FSH.

Palabras clave: Células de la granulosa, sirtuínas, SirT1, SirT6, SirT7, estrés oxidativo, FSH, metabolismo energético, GFP.

Abstract

Nowdays, women tend to delay maternity until the fourth decade of their lives. This delay in the average of reproduction time implies a search for molecular markers in order to predict the physiological state of the oocyte. The cross-talk between the oocyte and the granulosa cells during follicular development allows us to use the granulosa cells to indirectly analyse the state of the oocyte. The NAD⁺ dependent deacetylases belonging to the Sirtuin gene family have an important role in maintaining metabolic homeostasis, cellular proliferation and protecting cells against oxidative damage. The objective of this study is to analyse the expression of SirT1, SirT6 and SirT7 in granulosa cells in normal conditions and in the presence of FSH and glucose. qRT-PCR was used to analyze the normal expression pattern and the upregulation of SirT1 in response to glucose and FSH. As a tool for future functional studies the fusion protein expression vector pEFGPc1/SirT6 was constructed, its performance was successful. These results indicate that sirtuin genes participate in the regulation of energy metabolism and the cellular response to FSH.

Key words: Granulosa cells, sirtuins, SirT1, SirT6, SirT7, oxidative stress, FSH, energy metabolism, GFP.

1. Introducción

1.1 Descripción del modelo biológico estudiado.

Se denomina “foliculogénesis” al proceso mediante el cual se produce el desarrollo del folículo ovárico (una célula gamética acompañada de células foliculares diploides, tales como células de la granulosa y células de la teca). En los ovarios se diferencia una zona cortical y una zona medular, en la primera de ellas se encuentran los folículos ováricos (Figura 1).

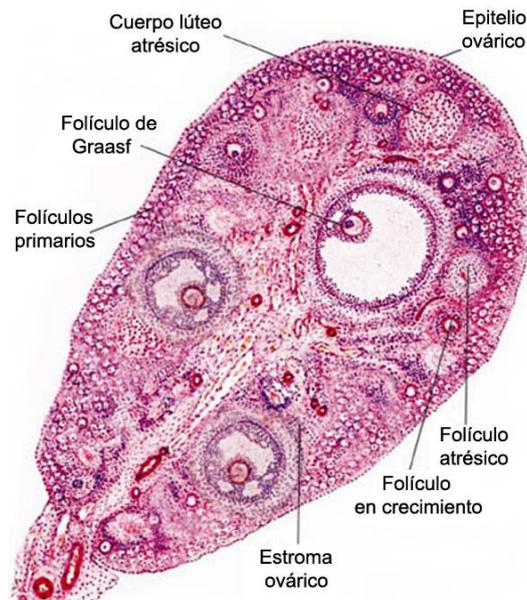


Figura 1. Estructura histológica del ovario humano. Imagen tomada de http://www.fertilab.net/ginecopedia/fertilidad/anatomia_de_los_genitales/femeninos/ovarios_1

Cuando se produce el nacimiento, los folículos están formados por un ovocito primario rodeado de una capa de células foliculares planas. Con el comienzo de la pubertad, bajo un complejo control hormonal, un determinado número de folículos comienza a madurar durante cada ciclo menstrual, dando lugar a folículos en distintas etapas de desarrollo (folículo primordial, primario, secundario, terciario o antral, y de Graaf), figura 1.

La fase folicular se inicia con el desarrollo rápido de varios folículos debido al estímulo hormonal. Alrededor de 7 días después de este momento se selecciona uno de ellos (folículo dominante), que completará su crecimiento hasta la ovulación. El resto de los folículos degeneran, pasando a ser folículos atrésicos.

El folículo dominante se encuentra en estadio de folículo de Graaf antes de su rotura y de dar salida al ovocito maduro hacia la trompa de Falopio. El folículo de Graaf es el folículo preovulatorio. Alcanza alrededor de 2,5 cm de diámetro y sobresale en la superficie de la

corteza ovárica. El ovocito ocupa dentro del mismo una posición excéntrica. Las células de la granulosa forman un conjunto que rodea al ovocito (la corona radiata) y un grupo que lo conecta con la periferia del folículo (cúmulo oóforo), figura 2.

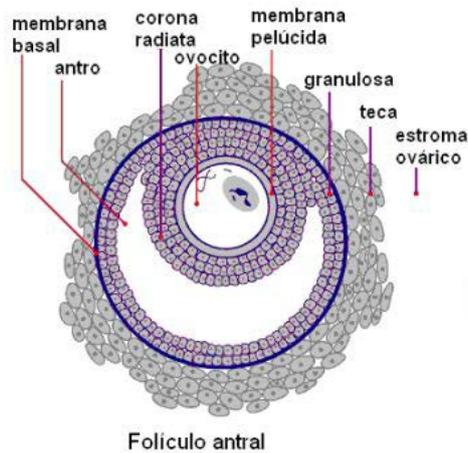


Figura 2. Estructura del folículo antral, cuya estructura es similar al folículo de Graaf. Imagen tomada de http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_17.htm#ciclo_ovarico.

Entorno al ovocito se disponen las células de la granulosa, estas son células somáticas que se encuentran estrechamente relacionadas con el desarrollo de los ovocitos en el folículo ovárico primario y más tarde en el desarrollo folicular (foliculogénesis). Durante el desarrollo folicular, proliferan y se diferencian para formar un cúmulo oóforo de varias capas que rodean el ovocito en el folículo de Graaf (Hennet and Combelles, 2012).

Se sabe que se produce una comunicación celular y cooperación metabólica entre los ovocitos y las células somáticas del folículo para garantizar tanto el suministro de sustratos para el ovocito en crecimiento como su correcta maduración y, de forma recíproca, la adecuada proliferación y diferenciación de las células somáticas del folículo (Emori and Sugiura, 2014; Kidder and Vanderhyden, 2010). Esta relación se encuentra mediada por uniones comunicantes (gap junctions) e implica múltiples mecanismos de comunicación celular, en particular, entre los ovocitos y las células de la granulosa.

Esta comunicación es compleja e incluye factores paracrinos sintetizados por ambos tipos celulares (Buccione et al., 1990; Sobinoff et al., 2013; Su et al., 2009). Como ejemplo, la delección del gen *Gja4*, que codifica una proteína de la unión comunicante en el ovocito, detiene el desarrollo folicular y limita el crecimiento del ovocito y la competencia meiótica (Li and Albertini, 2013). Por lo tanto, un sistema de comunicación elaborado y complejo media en el

flujo de información durante la maduración del ovocito dentro del folículo ovárico, en la que la alteración de uno de los componentes de esta comunicación puede ser suficiente para alterar significativamente el patrón de desarrollo folicular la maduración del ovocito.

En parte, esta comunicación molecular puede estar mediada por unas estructuras denominadas proyecciones transzonales (TZP) que son extensiones prominentes de la superficie de las células de la granulosa que terminan en la membrana plasmática del ovocito, donde se ensamblan uniones comunicantes y uniones adherentes. Las proyecciones transzonales (TZP) atraviesan la zona pelúcida y forman uniones adherentes en invaginaciones profundas en la superficie de los ovocitos y/o uniones comunicantes en la membrana plasmática del ovocito. Estas estructuras pueden ser ricas en actina-F (A-TZP), o pueden estar compuestas principalmente por microtúbulos (M-TZP), figura 3 (Li and Albertini, 2013).

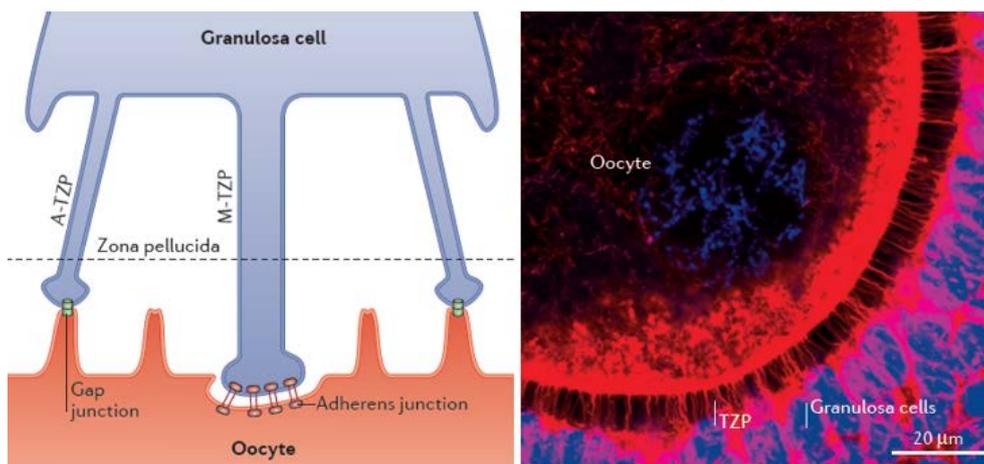


Figura 3. A la izquierda: representación de las uniones entre las células de la granulosa y la superficie del ovocito. A la derecha: ovocito de vaca (*Bos primigenius taurus*) teñido con faloidina, en rojo se muestran las A-TZP (Li and Albertini, 2013).

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.

1.2 Regulación hormonal.

El sistema reproductor femenino y el ciclo menstrual están bajo el control de las hormonas del eje hipotálamo-hipofisiario. Existen tres grupos principales de hormonas:

- A. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) hipotalámica: estimula la secreción de gonadotrofinas por la hipófisis.
- B. Gonadotrofinas hipofisarias:
 - B.1. Hormona foliculoestimulante (FSH): induce la maduración del folículo ovárico.
 - B.2. Hormona luteinizante (LH): estimula la ovulación e induce la secreción de hormonas sexuales por el ovario.
- C. Hormonas sexuales femeninas:
 - C.1. Estrógenos (estradiol): determina la aparición de los caracteres sexuales secundarios en la pubertad y estimulan la proliferación del endometrio en cada ciclo menstrual.
 - C.2. Progestágenos (progesterona): prepara al endometrio para la implantación.

Las hormonas encargadas del crecimiento ovárico y la maduración de los folículos son la FSH y la LH, estas son secretadas en grandes cantidades tras la pubertad (Messinis et al., 2010). Al inicio de cada ciclo menstrual, las concentraciones de gonadotropinas aumentan, la de FSH tras la de LH. El incremento de los niveles de FSH provoca un crecimiento acelerado de varios folículos, que llegan hasta el estadio de folículo antral.

Se produce una acumulación de estrógenos secretados por las células de la granulosa y de la teca interna, bajo el estímulo de la FSH. Esto produce el aumento de receptores de FSH. Así se produce una retroalimentación positiva, dando lugar a que los folículos antrales se vuelvan más sensibles a los efectos de la FSH. Además, la acción combinada de la FSH y los estrógenos promueve la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa y la teca interna.

Uno de los folículos responde más que el resto a la FSH y, debido a la retroalimentación positiva causada por los estrógenos, se convierte en el folículo dominante. Este comienza a producir inhibina, hormona que, junto con el creciente nivel de estrógenos, inhibe la secreción de FSH. Esto produce el bloqueo de los otros folículos menos desarrollados. Estos folículos se vuelven atrésicos y el dominante continúa con su crecimiento. No obstante, para el crecimiento final de folículo y la ovulación, se requiere un aumento de la LH. Un pico de LH y FSH se produce más adelante, ambas hormonas actúan sinérgicamente provocando la ruptura del folículo, con la

consiguiente liberación del ovocito. El pico de LH ocasiona una disminución en la secreción de estrógenos y la luteinización (conversión a cuerpo lúteo) en los restos del folículo (figura 4).

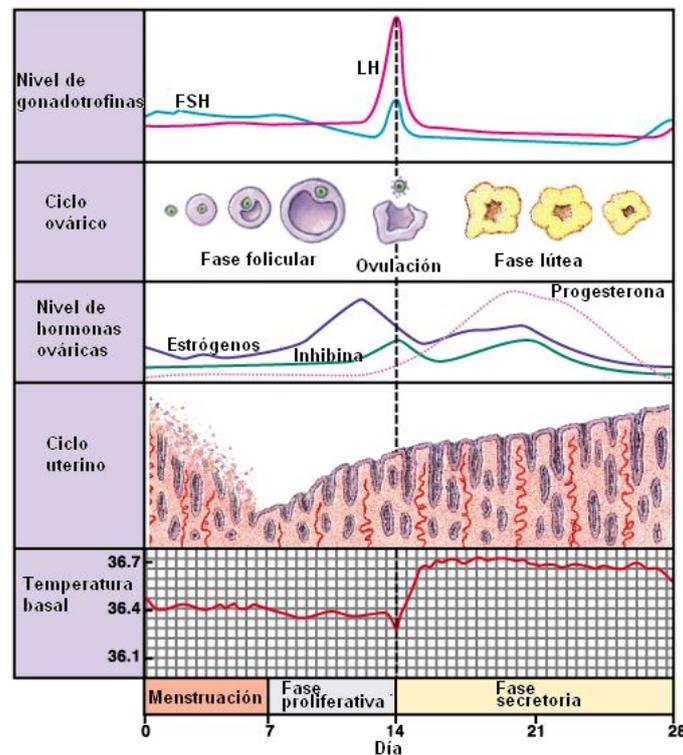


Figura 4. Representación de los niveles hormonales, ciclo ovárico, ciclo uterino y la variación de la temperatura basal. Imagen tomada de http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_17.htm#ciclo_ovarico.

1.3 Envejecimiento ovárico y estrés oxidativo.

El ovario es el principal regulador de la fertilidad de la mujer, constituyendo un reloj biológico que está ajustado para asegurar el éxito reproductivo durante una etapa determinada de la vida. De acuerdo con el concepto evolutivo, que los organismos maximizan el estado fisiológico del organismo para la promoción de la reproducción, la asignación de recursos entre las funciones reproductivas y somáticas están finamente reguladas durante la vida.

Se ha especulado que el envejecimiento prematuro del ovario en comparación con órganos somáticos puede derivarse del aumento de la demanda de energía para el mantenimiento del mismo y de los procesos de reparación durante el envejecimiento (Tatone and Amicarelli, 2013).

De acuerdo con el reloj biológico humano, la fertilidad de la mujer comienza a disminuir de manera significativa a partir de los 30 años y de forma pronunciada después de los 35 años, culminando en la menopausia a los 50-51 años de edad.

Actualmente, existe una tendencia a posponer la maternidad hasta la cuarta década de la vida, que ha hecho del envejecimiento reproductivo una alteración de la reproducción relacionada con la edad que implica una cuidadosa consideración en los sistemas sanitarios. Dada la variabilidad intrapoblacional de la duración de la vida reproductiva, en general se acepta que hacer frente a este problema requiere una cuidadosa orientación reproductiva basada en marcadores predictivos precisos.

Está bien establecido que la disminución funcional del ovario se relaciona con la pérdida gradual de folículos en reposo y la disminución de la competencia biológica de los que sobreviven a la atresia relacionada con la edad. Aunque las perturbaciones claras en la dinámica de crecimiento del folículo no parecen producirse, los ovocitos que alcanzan la ovulación durante el envejecimiento reproductivo son propensos a exhibir defectos celulares y cromosómicos que obstaculizan seriamente el proceso reproductivo (Tatone and Amicarelli, 2013).

Durante décadas, la investigación sobre el envejecimiento reproductivo se ha centrado en el llamado aspecto cuantitativo de envejecimiento ovárico, lo que ha dado lugar a modelos matemáticos para predecir la pérdida de folículos en función de la edad cronológica, sin tener en cuenta los marcadores biológicos. Cuando el concepto de envejecimiento ovocitario como el principal determinante del descenso de la fecundidad ha sido aceptado, se ha comenzado a ampliar las investigaciones en todo el microambiente del ovario en la búsqueda de los cambios relacionados con la edad, con los efectos potenciales sobre el folículo y la competencia de los ovocitos (Tatone and Amicarelli, 2013).

Se ha propuesto que las perturbaciones de energía podrían ser tanto la causa como el efecto de aumento de la producción de metabolitos tóxicos, tales como las especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden dañar seriamente las biomoléculas y deteriorar los mecanismos reguladores fundamentales. Sobre esta base, el proceso de envejecimiento ovárico puede ser visto como la acumulación progresiva e irreversible de daño a la integridad macromolecular que conduce a la pérdida de la homeostasis metabólica y la disminución de las funciones primarias (Devine et al., 2012).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son productos inevitables del metabolismo aeróbico. Las ROS incluyen radicales superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno. La principal fuente de ROS es la fuga de electrones de la membrana mitocondrial interna durante

la fosforilación oxidativa y la generación de ATP (Figura 5). En tejidos esteroideogénicos como el ovario, enzimas del citocromo P450 esteroideogénicas también son fuentes relevantes de ROS.

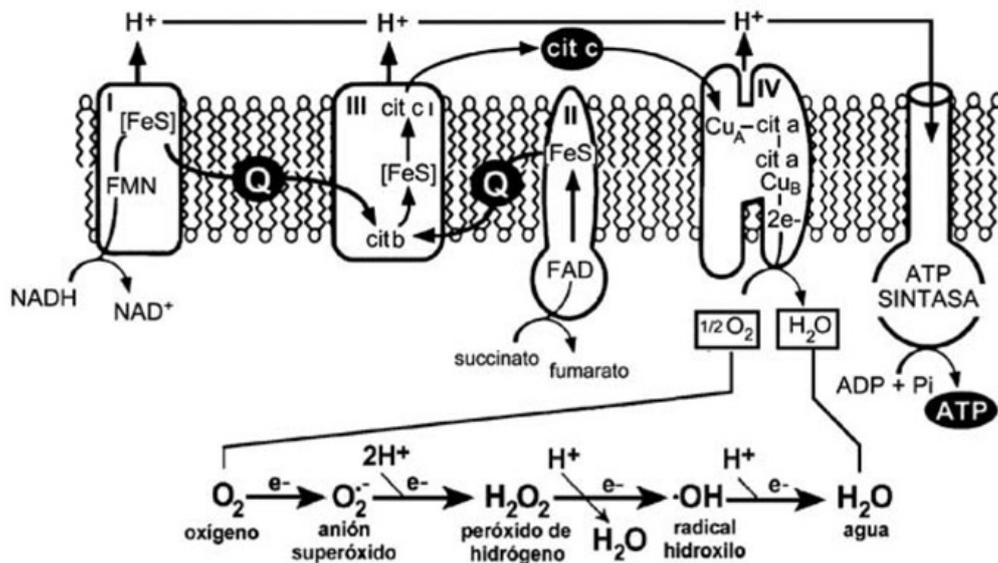


Figura 5. Generación de ROS por la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Imagen tomada de http://portal.uned.es/portal/page?_pageid=93,25140344&_dad=portal&_schema=PORTAL

Sistemas de defensa tanto enzimáticos como no enzimáticos permiten que las células vivan en un entorno oxidativo, realizando los procesos bioquímicos necesarios, incluso utilizando en ocasiones las ROS como moléculas de señalización. Gracias a su alta reactividad y su corta vida media, la medida de los niveles de ROS en el microambiente del folículo ha dado lugar a resultados contradictorios acerca de su papel en la fertilidad. Sin embargo, el aumento de las investigaciones en este campo ha confirmado que la modulación de los niveles de ROS a través de los sistemas de eliminación pueden regular el desarrollo folicular y/o la supervivencia. Además, las ROS podrían estar implicados en la iniciación de la apoptosis en los folículos antrales, proceso fisiológicamente regulado y necesario para la ovulación (Devine et al., 2012)

La investigación sobre el envejecimiento reproductivo femenino ha presentado pruebas convincentes acerca del papel clave del estrés oxidativo en la disminución de la función ovárica relacionada con la edad.

1.4 Las sirtuínas y la respuesta a estrés metabólico.

Las sirtuínas son una clase de desacetilasas dependientes de NAD⁺, tanto histónicas como no histónicas, que tienen efectos beneficiosos para la salud (Figura 6) (Chang and Guarente, 2014). Los mamíferos presentan 7 sirtuínas, que muestran un alto grado de diversificación funcional incluyendo una amplia gama de sustratos y un patrón muy diverso de localización celular. En

eucariotas, gran parte de la función de las sirtuínas está asociada a un papel regulador de la estructura, la expresión y el mantenimiento de la integridad del genoma (Sack and Finkel, 2012)

De las siete sirtuínas sólo *SirT1*, *SirT2*, *SirT6* y *SirT7* parecen estar implicadas en la señalización de esta respuesta en la cromatina. De estas cuatro, serán objeto de estudio la *SirT1*, 6 y 7 dada su implicación en el control de la integridad genómica, su papel en el mantenimiento de la homeostasis metabólica a nivel celular y en la supervivencia en condiciones de estrés (Morris, 2013).

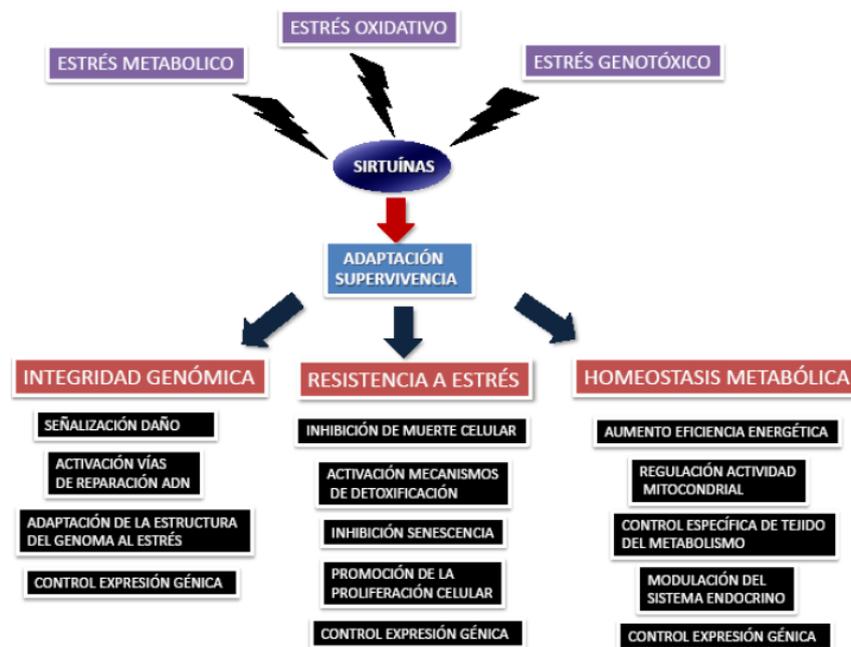


Figura 6. Las sirtuínas promueven la respuesta a estrés a diferentes niveles y a través de diferentes mecanismos. Tomado de: http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/acercate-a-nuestros-cientificos_107.

SirT1, *SirT6*, y *SirT7* se localizan en el núcleo, donde actúan como desacetilasas de histonas influyendo así la expresión de genes epigenéticamente (Chang and Guarente, 2014).

SirT1 se localiza en el núcleo, aunque en ciertas condiciones puede encontrarse en el citosol. De cualquier forma, actúa eliminando el grupo acetil del grupo ϵ -amino de los residuos de lisina en proteínas histónicas y otras proteínas, utilizando como dianas nucleares FOXO1, FOXO3, PGC-1 α o P53, o como dianas citoplasmáticas NF- κ B, Notch, HIF1 α , LXR, FXR, SREBP1c, entre otros. A nivel fisiológico, *SirT1* regula la expresión de genes diana así como la actividad de proteínas que controlan diversos procesos celulares tales como proliferación, diferenciación, apoptosis, metabolismo energético, daños en el DNA, respuesta al estrés, estabilidad genómica, etc (Mahlknecht and Zschoernig, 2012; Morris, 2013; Yuan et al., 2013).

Sirt6 posee doble actividad, por un lado actúa como desacetilasa, y por otro, como ADP-ribosiltransferasa. Los sustratos sobre los que actúa incluyen las histonas H3K9, H3K56, poli(ADP-ribosa) polimerasa 1, proteína quinasa dependiente de DNA, etc. *Sirt6* está implicada en la regulación de la transcripción, estabilidad genómica, metabolismo, etc (Mahlknecht and Zschoernig, 2012; Morris, 2013; Yuan et al., 2013). En presencia de estrés oxidativo, *Sirt6* se localiza en los focos de reparación de rotura de doble cadena del DNA, estimulando la reparación de los mismos tanto por mecanismos de unión directa de extremos de DNA como de reparación mediante recombinación homóloga.

Sirt7 se localiza exactamente en el nucléolo. Presenta alta selectividad por la histona H3K18 y actúa como regulador positivo de la transcripción de la ARN polimerasa I y la biogénesis de ribosomas, su disminución induce a la apoptosis en células humanas, lo que indica que Sirt7 se requiere para la supervivencia celular. Cabe destacar, que Sirt7 es el gen menos conocido dentro de la familia génica sirtuínas (Mahlknecht and Zschoernig, 2012; Morris, 2013; Yuan et al., 2013).

2. Objetivos

Los daños observados debido al estrés oxidativo son el resultado de una alteración en el balance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de las células tanto de neutralizar las especies reactivas intermedias como de reparar los daños resultantes. Se sabe que las sirtuínas son factores claves en la determinación y la coordinación de las respuestas al estrés. Por ello, nos planteamos como objetivos concretos en este trabajo:

- Analizar la expresión de los genes SirT-1, SirT-6 y SirT-7 en células de la granulosa humana procedentes de donantes de ovocitos.
- Analizar el efecto de FSH y el estrés oxidativo metabólico inducido por glucosa sobre la expresión de los genes SirT-1, SirT-6 y SirT-7.
- Realizar la construcción de un vector que permita la sobreexpresión de los genes sirtuínas en células eucariotas con objeto de ser utilizado en posteriores estudios funcionales en células de la granulosa.

3. Material y Métodos

3.1 Pacientes.

Se estudiaron células de la granulosa humana (GC) procedentes de 16 mujeres donantes de ovocitos con edades comprendidas entre los 18 y 22 años. La inducción de la ovulación fue llevada a cabo usando FSH recombinante (rFSH, Gonal F), combinada con LH recombinante (rLH, Luveris) o hMG (hMG-Lepori, Farma-Lepori o Menopur, Ferring). Las dosis de gonadotropinas administradas fueron ajustadas a la respuesta individual de cada paciente. La recuperación de ovocitos se realizó mediante aspiración transvaginal guiada por ultrasonido 36 horas después de la administración de 250µg de hCG (Serono). Las células de la granulosa fueron aisladas a partir del fluido folicular (FF) obtenido en la aspiración y tratadas siguiendo un protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de La Laguna. De esta manera, cada paciente firmó un consentimiento informado y sus datos fueron tratados de forma codificada y con un fin únicamente estadístico. Este proceso fue realizado por el personal clínico de Centro colaborador “Centro de Asistencia a la Reproducción Humana de Canarias”.

3.2 Purificación de células de la granulosa humana y cultivo.

Las GC fueron aisladas a partir del líquido folicular de cada donante. Este líquido folicular contiene, además de células de la granulosa, eritrocitos y células blancas, fundamentalmente leucocitos. Para separar las células de la granulosa de las células rojas de la sangre (hematíes) se empleó un gradiente de Percoll (Sigma) al 50%. El Percoll es un producto ideal para este paso ya que es no tóxico y es compatible con el mantenimiento de las células vivas. Tras la centrifugación del gradiente se recupera la interfase que contiene las células de la granulosa y las células blancas, que fueron posteriormente eliminadas mediante el uso de Dynabeads M-450 CD45 (Invitrogen). Las Dynabeads son partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti CD45, antígeno que se expresa en todas las células hematopoyéticas nucleadas como los leucocitos.

Tras la purificación, la viabilidad de las GC fue evaluada con Trypan Blue, haciendo uso del microscopio óptico y de la Cámara de Neubauer para el conteo.

Las células obtenidas de cada paciente se sembraron en placas de 4 pocillos (Corning), con medio McCoy's 5A modificado (Sigma). Los cultivos fueron mantenidos durante 48 horas en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ a 37°C. Los pocillos se clasificaron como:

- Control. Las células de la granulosa se mantuvieron en cultivo sin adición de ninguna sustancia.
- + Glucosa. En el momento del cultivo se añadió glucosa 20mM para inducir estrés oxidativo.
- + FSH. Tras 24 horas de cultivo a las células de la granulosa, sin tratamiento previo, se añadió FSH a 100ng/ml.
- + Glucosa + FSH. A las células de la granulosa se añadió glucosa 20mM en el momento de poner el cultivo y FSH 100ng/ml a las 24 horas.

3.3 Extracción de RNA.

Pasadas 48 horas desde la siembra de las células, éstas se recolectaron por rascado y se centrifugaron 5 minutos a 300g. La extracción de RNA se realizó mediante el kit Aurum total RNA mini kit (BioRad), según instrucciones del fabricante. Este kit proporciona un método rápido y eficiente para obtener RNA total de excelente calidad altamente purificado, libre de DNA genómico, sales, metabolitos y otros componentes celulares. La elución final del RNA obtenido se realizó en un volumen de 50µl.

3.4 Síntesis de cDNA.

El RNA purificado en el paso anterior se concentró mediante evaporación por centrifugación al vacío hasta un volumen máximo de 30 µL. Una vez concentrado, el RNA se usó en su totalidad para la síntesis de la primera cadena de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó usando el sistema iScript cDNA Synthesis (BioRad) según instrucciones del fabricante. La reacción se realizó en un volumen final de 40 µL que contenía 1X de iScript Reaction Mix y 2 µL de iScript Reverse Transcriptase.

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

El análisis de la expresión de los genes *Sirt1*, *Sirt6* y *Sirt7* se realizó mediante 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. Así, el incremento de DNA en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida.

Usando el programa Omiga, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la secuencia de humanos de cada uno de los genes estudiados así como para el gen de la β -actina que se usó como gen de referencia para estimar la expresión relativa de los anteriores (tabla 1).

Todas las reacciones se llevaron a cabo usando el sistema CFX-96 (BioRad). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos y 45 ciclos de PCR realizados a 95°C durante 5 segundos y 61°C durante 5 segundos. La reacción se realizó en un volumen final de 10 μ L y se usó 2x SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) y una concentración final de 0.4 μ M de cada oligonucleótido.

Cada gen fue analizado por triplicado en todas las muestras y se comprobó la amplificación de un producto único para cada pareja de cebadores mediante la curva de disociación (curva de Melting), verificándose la ausencia de señal fluorescente debida a contaminación por amplificaciones inespecíficas. El programa de la curva de disociación se llevó a cabo desde los 65°C a los 95°C, con una tasa de calentamiento de 0,1°C por segundo y lectura cada 0,5°C.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
<i>SirT1</i>	SirT1-F	CTATACCCAGAACATAGACACG	54.1
	SirT1-R	ACAAATCAGGCAAGATGC	54.5
<i>SirT6</i>	SirT6-F	AGGGACAAACTGGCAGAGC	60.4
	SirT6-R	TTAGCCACGGTGCAGAGC	61.1
<i>SirT7</i>	SirT7-F	GCAGAGCAGACACCATCC	57.7
	SirT7-R	G TTCACGATGTAAAGCTTCG	56.1
β -Actina	Act -F	CTTCCTTCCTGGGCATGG	61.6
	Act-R	GCCGCCAGACAGCACTGT	63.7

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por qRT-PCR de los genes estudiados.

3.6 Determinación de la expresión relativa de cada gen.

Para cuantificar los resultados obtenidos en los experimentos de qRT-PCR se utilizó el método comparativo del Cycle Threshold (método comparativo CT), determinando el ciclo umbral (Threshold Cycle, CT) para cada reacción de PCR mediante el software suministrado por la casa comercial (Bio-Rad).

El CT es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base. De manera práctica, el CT es el ciclo en el que la

3.8.1 Construcción del plásmido

A partir de cDNA de células de la granulosa humanas se amplificó la región codificante de la secuencia de del gen *SirT6* utilizando oligonucleótidos específicos que abarcan la ORF completa del gen y a los que se les ha añadido en su extremo 5' un fragmento con una diana de restricción para dirigir su clonaje en el vector correspondiente (tabla 2, figura 8).

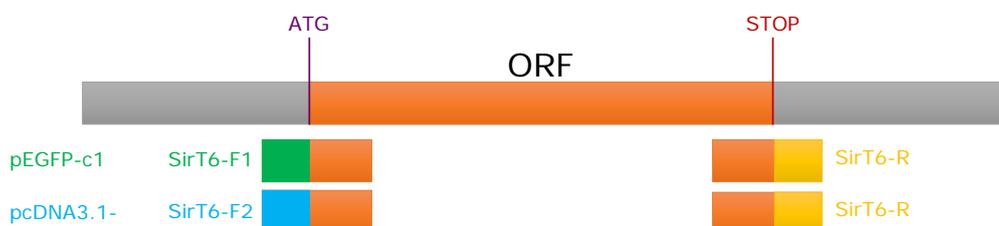


Figura 8. Esquema del diseño de amplificación del gen *SirT6* indicando las parejas de oligonucleótidos específicos para cada una de las construcciones.

La amplificación se realizó usando la Taq polimerasa de alta especificidad PCR BIO HiFi polymerase (Biosystems) según instrucciones del fabricante. Tras comprobar en un gel de agarosa que los fragmentos amplificados tenían el tamaño deseado, el producto de PCR se purificó mediante el kit Real Clean Spin (Real) según instrucciones del fabricante.

Se realizó la digestión del producto de PCR de SirT-6 con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso en un volumen final de 60µl: 51µl DNA, 6µl Buffer MultiCore10x y 1,5µl de cada enzima. También se digirieron 3µg de cada vector en un volumen final de 50µl. Para pcDNA3.1(-): 30µl de plásmido, 5µl Buffer MultiCore 10x, 1,5µl de cada enzima y 12µl H₂O. Para pEGFP-c1: 15µl de plásmido, 5µl Buffer MultiCore 10x, 1,5µl de cada enzima y 27µl H₂O. El fragmento digerido con las enzimas SacI y BamHI se ligó al vector pEGFP-c1 y el fragmento digerido con las enzimas NheI y BamHI al pcDNA3.1(-), ambos previamente digeridos con las mismas enzimas. La ligación se llevó a cabo en una proporción 1:3 usando la enzima T4 DNA ligasa (Promega) e incubando 2 horas a 22°C y toda la noche a 16°C.

El producto de la ligación se usó para transformar por choque térmico células competentes de *E.coli cepa XL2- Blue*. La mezcla de ligación se incubó con a las bacterias en hielo durante 20 minutos. A continuación, se incubaron 1 minuto a 42° y luego otros 2 minutos en hielo. Pasado este tiempo se añadió 1ml de medio SOC suplementado con glucosa 20 mM y MgCl₂ 10 mM. Se incubó 1 hora a 37° con agitación antes de crecer en placas de LB-ampicilina 0.1mg/ml (pcDNA3.1(-)) o LB-kanamicina 10mg/ml (pEGFP-c1) a 37°C durante toda la noche.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
<i>SirT6</i>	SirT6-F1	GCGAGCTCGCCAGTCGAGGATGTCGGTG
	SirT6-F2	GCGCTAGCGCCAGTCGAGGATGTCGGTG
	SirT6-R	GCGGATCCTGGTCAGCTGGGGACCGC

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de *SirT6*. Las dianas de las enzimas usadas para clonar aparecen en color: azul para SacI, violeta para NheI y verde para BamHI.

3.8.2 Selección de clones positivos

Para la identificación de clones positivos se picaron 12 colonias de cada transformación que se crecieron en 5mL de LB-ampicilina o LB-kanamicina según la construcción a 37°C con agitación durante toda la noche. Tras realizar una extracción de plásmidos con el kit Real Plasmid Spin MiniPrep (REAL), las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para determinar el tamaño. Se seleccionaron como positivos aquellos clones con un tamaño superior al del correspondiente plásmido vacío. Para verificar la presencia del plásmido de interés, se digirieron los clones seleccionados como positivos con las mismas enzimas empleadas para el clonaje. De los 6 clones elegidos como positivos (3 clonados en pcDNA3.1(-) y 3 en pEGFP-c1), tras la digestión sólo uno liberó un inserto del tamaño deseado. Este único clon positivo correspondía con el gen *SirT6* clonada en el vector pEGFP-c1.

3.8.3 Transfección en células HeLa.

Una vez comprobada, la construcción se empleó para transfectar células HeLa crecidas en medio F12K (Kaighn's modification of Ham's F12 medium, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma) a 37°C con 5% de CO₂. La transfección se realizó cuando el cultivo alcanzó el 90-95% de confluencia utilizando lipofectamine 2000 (Invitrogen). Además de con el vector pEGFP-c1/*SirT6*, las células fueron transfectadas con el vector pEGFP-c1 vacío como control positivo. Como control negativo se usaron células HeLa sin transfectar, en las que se siguió el mismo protocolo que en las transfectadas pero añadiendo agua en lugar de plásmido. Tras 16 horas las células transfectadas se emplearon para comprobar la correcta expresión de la proteína de interés.

3.8.4 Comprobación de la expresión de pEGFP-c1/*SirT6*

La correcta expresión del gen de sirtuina 6 fusionada a GFP se comprobó por dos métodos distintos:

- qRT-PCR. Tras la transfección de los cultivos de HeLa, las células se levantaron por rascado. Después de la extracción de mRNA y síntesis de cDNA, se amplificó el gen *Sirt6* con los oligonucleótidos descritos en la tabla 1.
- Microscopio de fluorescencia. 16 horas después de la transfección se observó el cultivo in vivo con el microscopio de fluorescencia Olympus BX-50. Las fotografías se tomaron usando una cámara digital Olympus Camedia C-3030ZOOM, y las imágenes fueron ensambladas utilizando el programa informático Adobe PhotoShop.

4. Resultados

4.1 Purificación de células de la granulosa.

En relación al protocolo de purificación de células de la granulosa humana, se lograron aislar un elevado número de células por donante, alrededor de 1-2 millones de células. No obstante, los cultivos obtenidos no fueron considerados cultivos “puros” o “limpios” debido a que otros tipos celulares persistían, como pueden ser restos de células estromáticas, leucocitos, etc (figura 9). Además, también se observó un pequeño porcentaje de muerte celular en células de la granulosa, esto pudo revelarse con la adición de Trypan Blue a una muestra de las células purificadas (figura 10).

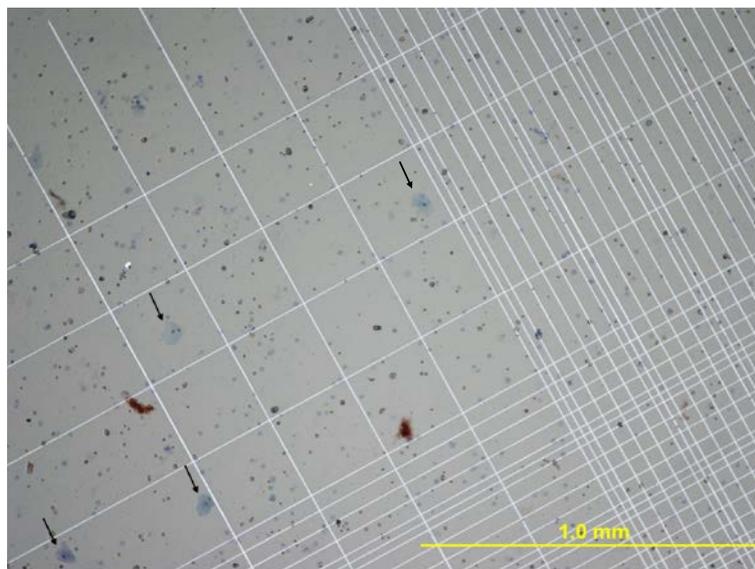


Figura 9. Las flechas señalan restos de células estromáticas presente en una muestra de preparación celular tras el protocolo de purificación de células de la granulosa humana.

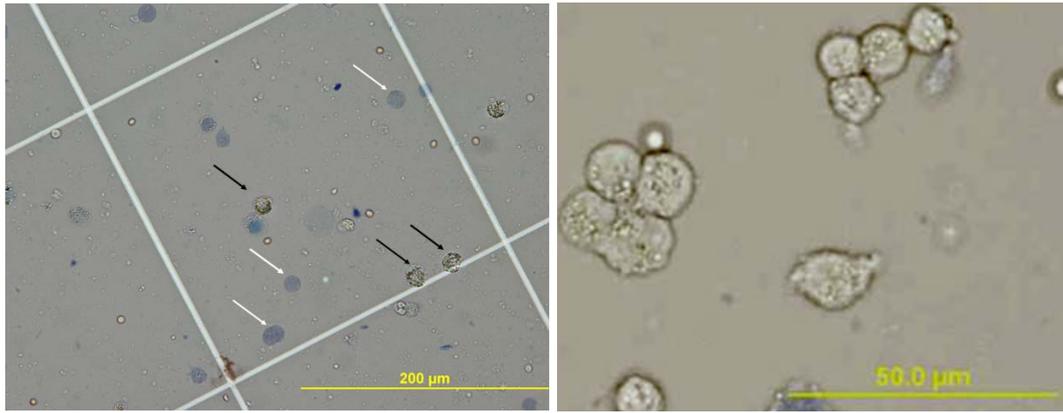


Figura 10. A la izquierda, las flechas de color negro señalan células de la granulosa humana vivas, mientras que las flechas de color blanco señalan células de la granulosa muertas. A la derecha, células de la granulosa purificadas.

4.2 Cuantificación de la expresión

Se cuantificó la expresión de los genes estudiados en células de la granulosa tras 48 horas en cultivo procedentes de 16 donantes diferentes. Las células de la granulosa de cada donante se dividieron en cuatro pocillos a los que se le aplicó distintos tratamientos como ya se mencionó en el correspondiente apartado de material y métodos, estos fueron: Control, Glucosa, FSH y Glucosa+FSH. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con el paquete estadístico Spss V20.

4.2.1 Expresión de los genes *SirT1*, *SirT6* y *SirT7* en células de la granulosa:

Se calcularon las medias de expresión de los tres genes de sirtuínas estudiados en las células control sin tratamiento. Como podemos observar en la tabla 3 y figura 11, el gen *SirT7* es el que tiene mayor expresión en células de la granulosa humana, expresándose dos veces más que la *SirT1* y 5 veces más que la *SirT6*.

	SirT1	SirT6	SirT7
Control	100 ^a ±16	40 ^b ±10	200 ^c ±34

Tabla 3. Medias de la expresión relativa a β -actina ($\times 10^{-5}$) de los diferentes genes de sirtuínas en el control. Las medias entre sí son estadísticamente diferentes, se señalan con un superíndice.

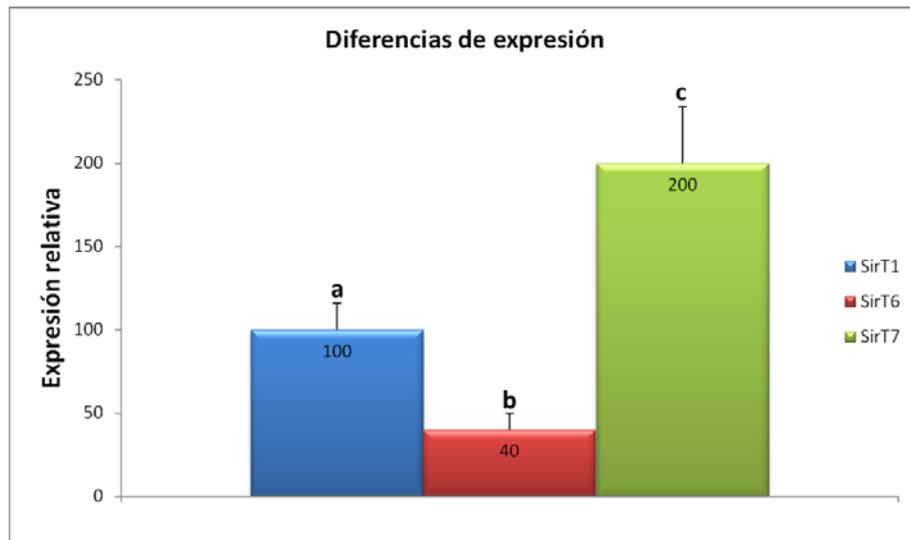


Figura 11. Representación de las medias de expresión relativa a β -actina ($\times 10^{-5}$) en células control de los tres genes sirtuínas estudiados. Diferentes letras sobre las barras indican medias estadísticamente distintas.

4.2.2 Expresión de los genes *SirT1*, *SirT6* y *SirT7* en células de la granulosa en los diferentes tratamientos:

En la tabla 4 se muestra el valor de la diferencia de medias de expresión de los tres tratamientos estudiados respecto al cultivo sin tratamiento o control. Se ha considerado diferencias estadísticamente significativas para una $p < 0,05$ en el test T de Student.

GEN	TRATAMIENTO			
	Control	Glucosa	FSH	Glucosa + FSH
SirT1	1	1,52 \pm 0,38	1,87 \pm 0,34*	2,93 \pm 0,67*
SirT6	1	0,84 \pm 0,13	1,38 \pm 0,35	1,35 \pm 0,37
SirT7	1	1,26 \pm 0,22	1,37 \pm 0,35	1,72 \pm 0,43

Tabla 4. Medias \pm error típico de la variación de expresión con respecto al control de los genes analizados en los diferentes tratamientos aplicados. Con un * se marca aquellos valores que son estadísticamente diferentes al control ($p < 0,05$).

La variación de expresión de los 3 genes sirtuínas estudiados con respecto al control es mayor en todos los tratamientos aplicados, excepto en la expresión del gen *SirT6* en el tratamiento con glucosa, en la que se observa una ligera disminución respecto al control. El tratamiento

Glucosa+FSH es el que obtiene mayor variación en la *SirT1* y *SirT7*, mientras que en la *SirT6* el tratamiento con FSH y con Glucosa+FSH muestra una diferencia de expresión similar para ambos tratamientos. Respecto a la expresión en el control, los únicos valores estadísticamente significativos son los de la variación de expresión de *SirT1* con FSH y Glucosa+FSH, como se puede observar en la figura 12.

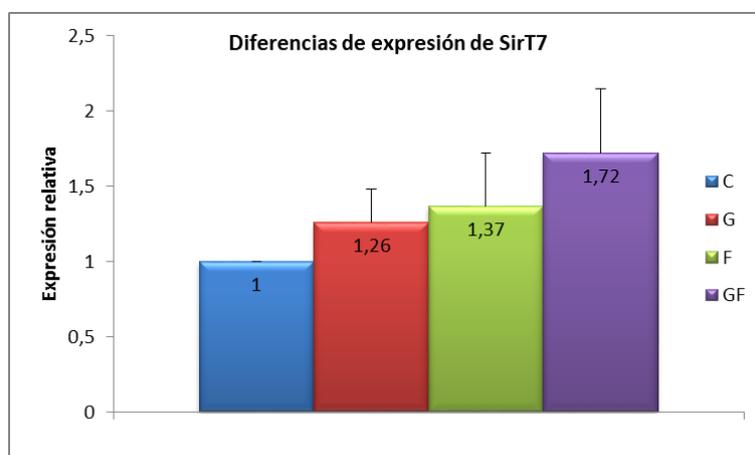
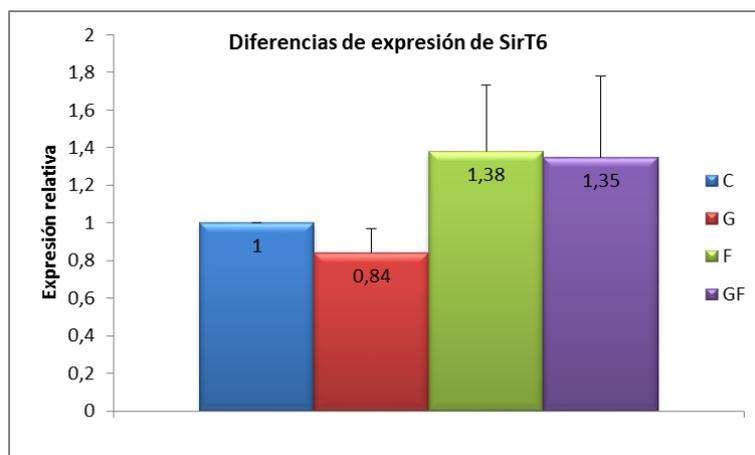
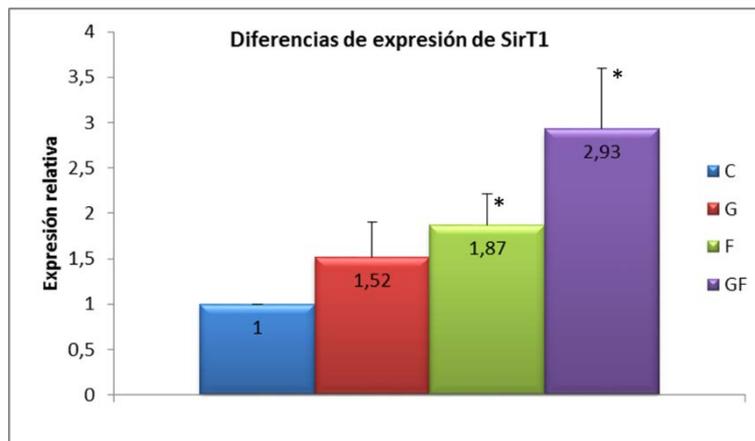


Figura 12. Variación de la expresión de los genes sirtuínas 1, 6 y 7 con respecto al control en los diferentes tratamientos aplicados: Control (C), Glucosa (G), FSH (F) y Glucosa+FSH (GF). Se marca con un * aquellos valores que son estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

4.3 Clonaje de la sirtuína 6 (*SirT6*)

Con el fin de amplificar la secuencia codificante (1067 pb) del gen *SirT6* humana para clonarla dentro de los vectores pcDNA3.1(-) y pEGFP-c1, se amplificó por PCR el fragmento que contiene la ORF completa del gen *SirT6* usando parejas de oligonucleótidos específicos para este gen y modificados en su extremo 5' para permitir el clonaje dirigido en los vectores mencionados. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. En ambos casos se obtuvo una banda con un peso molecular equivalente al esperado para la ORF del gen *SirT6* (figura 13).

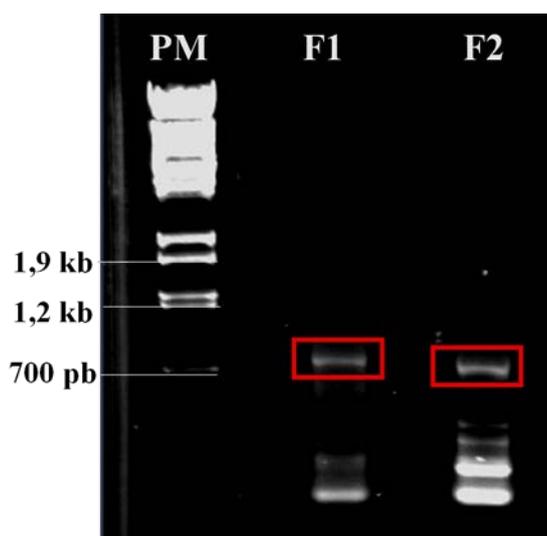


Figura 13. Electroforesis del producto de PCR para la *SirT6* con las parejas de oligonucleótidos diseñadas para el clonaje en los vectores pEGFP-c1 (F1) y pcDNA 3.1(-) (F2). Resaltadas en cajas rojas las bandas que presentan la altura adecuada esperada para la región codificante de la *SirT6*.

Tras purificar el fragmento de interés y clonarlo en su correspondiente vector se transformaron células competentes de *E. coli* cepa XL-2 Blue. Para seleccionar los clones positivos (aquellos que contienen el inserto) se chequearon 12 colonias para cada construcción (figura 14). Se seleccionaron como clones positivos aquellos que presentaron un tamaño mayor al de los plásmidos vacíos, representados en la figura 13 con un número en rojo.

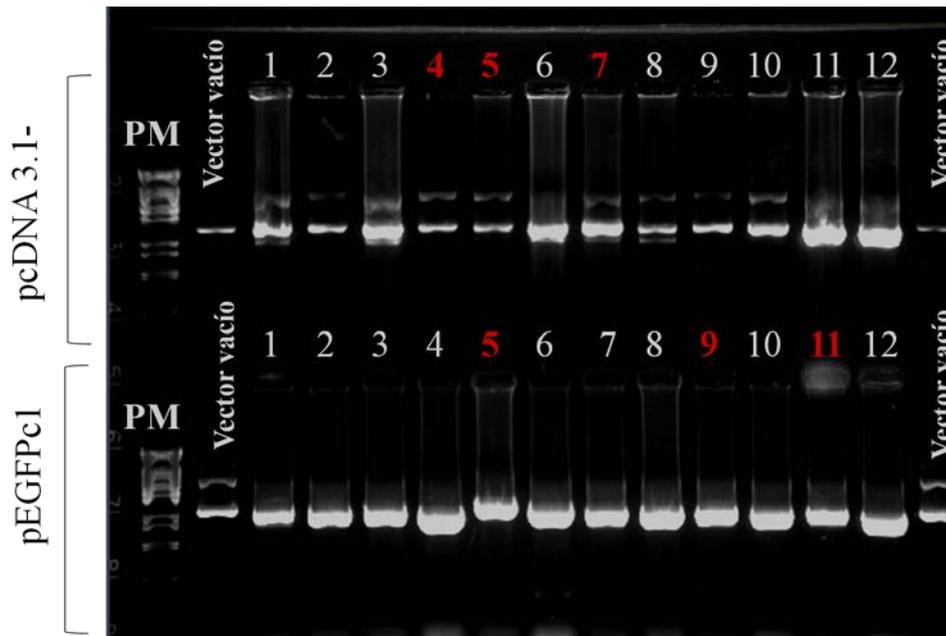


Figura 14. Electroforesis del DNA plasmídico purificado a partir de los clones analizados de cada transformación. En rojo se marcan aquellos que se seleccionaron como posibles positivos. Se eligieron como positivos 3 clones de cada construcción. Para comprobar que el inserto clonado correspondía con el fragmento amplificado a partir del gen *SirT6* se llevó a cabo la digestión de cada uno de los clones seleccionados con las mismas enzimas empleadas para su clonación. De los 6 clones analizados solo la digestión del clon 5 de la construcción pEGFP-c1/*SirT6* liberó un fragmento de un tamaño igual al correspondiente a la ORF de *SirT6* (figura 15).

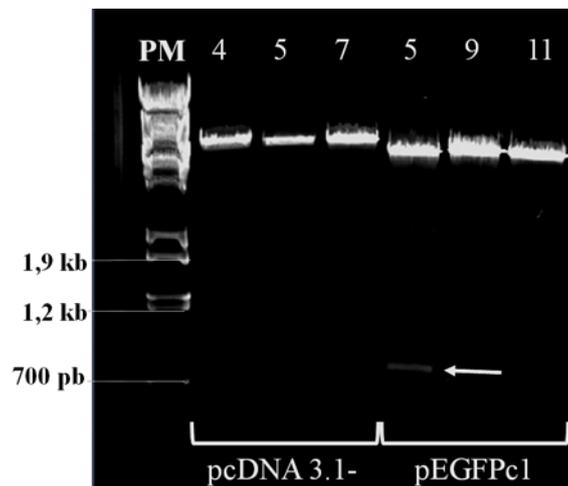


Figura 15. Digestión de los clones seleccionados como posibles positivos. Solo en el carril correspondiente al clon 5 de la construcción de pEGFP-c1/*SirT6* aparece una banda a la misma altura que la ORF de *SirT6* amplificada para el clonaje (señalada con una flecha).

4.3.1 Comprobación de la funcionalidad de la construcción pEGFP-c1/SirT6-5.

Para comprobar la funcionalidad de la construcción pEGFPc1/SirT6-5 y la correcta expresión de la proteína fusión GFP-SirT6 se transfectaron células HeLa y se analizó la expresión de *SirT6* por qRT-PCR (tabla 5) y la abundancia de fluorescencia en las células por microscopia óptica de fluorescencia (figura 15).

En la tabla 5 aparece la expresión relativa a β -actina del gen *SirT6* en células transfectadas con la construcción pEGFP-c1/SirT6-5 y en células control sin transfectar. Como podemos observar, la transfección de las células con la construcción pEGFP-c1/SirT6-5 incrementó la expresión de *SirT6* algo más de 5 veces respecto a las células control.

SIRT6	
Sin transfectar	25
Transfectadas	143

Tabla 5. Valores de expresión relativo a β -actina (por 10^5) de *SirT6* en células transfectadas con pEGFP-c1/SirT6-5 y células sin transfectar.

En la figura 16 podemos observar la intensidad de fluorescencia de GFP en células sin transfectar y transfectadas tanto con el vector vacío y como con la construcción pEGFP-c1/SirT6-5. En el control negativo constituido por células sin transfectar no pudimos detectar fluorescencia en las células. En las células transfectadas con el vector pEGFP-c1 sin inserto observamos la expresión de GFP como fluorescencia verde distribuida uniformemente por toda la célula. Sin embargo, en las células transfectadas con la construcción pEGFP-c1/SirT6-5 se observa expresión de la proteína fusión mediante fluorescencia verde localizada preferentemente en el interior del núcleo de la célula.

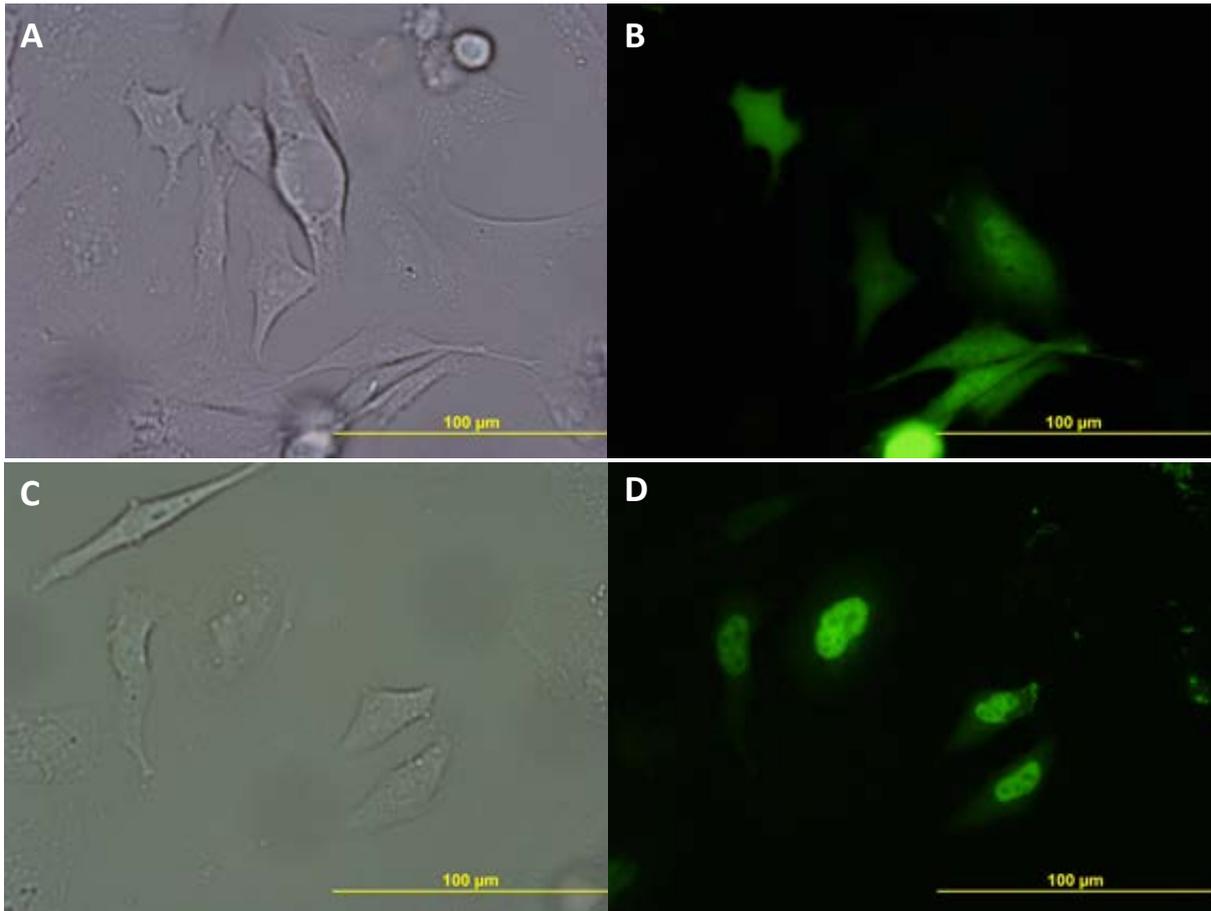


Figura 16. Células HeLa no transfectadas (A, visible y B, fluorescencia) y transfectadas (C, visible y D, fluorescencia) con la construcción pEGFP-c1/SirT6-5. En la imagen B se puede observar la fluorescencia homogénea en toda la célula, mientras que en D la fluorescencia se presenta principalmente en el núcleo.

5. Discusión

5.1 Metodología de purificación de células de la granulosa humana.

Tras la realización del protocolo de purificación de células de la granulosa humana se obtuvieron cultivos con un alto porcentaje de células de la granulosa viables y en menor cantidad otros tipos celulares. No obstante, considerando la proporción de otros tipos celulares en el líquido folicular de partida, la proporción de restos celulares frente a las células de la granulosa después del procedimiento de purificación fue mínima. Además, como se puede observar en la figura 9, la mayor parte de los restos celulares que persisten tras la purificación se identifican como muertas con el colorante Trypan Blue. Estas células muertas no se adhieren a la superficie de la placa de cultivo y, por tanto, son eliminadas al realizar los cambios de medio de cultivo. En resumen, los resultados obtenidos de número de células purificadas y viabilidad celular muestran que la metodología utilizada para la purificación celular

proporciona una población de células de la granulosa purificada y óptima para la realización de los tratamientos celulares y las determinaciones de expresión génica.

5.2 Expresión de los genes estudiados.

El análisis de la expresión de las tres sirtuínas estudiadas (*SirT1*, *SirT6* y *SirT7*) en el control muestra que en células de la granulosa *SirT7* es el gen que más se expresa con respecto a los otros dos, siendo su expresión dos veces mayor que la expresión de *SirT1* y cinco veces mayor que *SirT6*. Los niveles de expresión de los diferentes genes de sirtuínas varían con el tejido, tipo celular y estado metabólico. En condiciones en las que se observa una alteración de la homeostasis metabólica, tales como en algunos tipos de células cancerosas o células en cultivo, se observa un incremento de la expresión de *SirT7* (Kim and Kim, 2013). Por tanto, no podemos descartar que el nivel de expresión más alto de *SirT7* respecto a *SirT1* y *SirT6* pueda estar mediado por el proceso de purificación y establecimiento del cultivo de las células de la granulosa. Actualmente no existen estudios previos comparativos sobre la expresión de esta familia génica en células de la granulosa, por lo que los resultados presentados en este trabajo constituyen una primera referencia de las diferencias de expresión de estos genes en células de la granulosa.

En el tratamiento con glucosa, se pretende observar el efecto de una alta disponibilidad de carbohidratos por las células, así como el posible estrés oxidativo metabólico generado por el incremento de la actividad de la respiración mitocondrial, sobre la expresión de los genes de sirtuínas. En estas condiciones de cultivo se observa una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, a un aumento de la expresión de *SirT1* y *SirT7* con respecto al control y a una disminución de la expresión de *SirT6*. Dado que *SirT1* tiene un papel principal en la regulación del metabolismo energético, con función reguladora según el tipo de tejido de las rutas de glicolisis, gluconeogénesis, degradación de lípidos, etc, pensamos que este incremento de expresión constituye una respuesta a una alta disponibilidad de glucosa que persigue adaptar la maquinaria enzimática para un óptimo consumo de glucosa mediante activación de glicolisis y respiración mitocondrial. Aunque sin ser estadísticamente significativo, la menor expresión de *SirT6* observada también está acorde con su papel en la regulación de la gluconeogénesis y transporte de glucosa al interior de la célula. Dado que en ratones con deficiencia de *SirT6* se detecta una hipoglucemia y un incremento de transporte de glucosa, se deduce su implicación como regulador positivo de la gluconeogénesis durante la ausencia de glucosa y, por tanto, la

disponibilidad de glucosa por la célula en el medio de cultivo puede regular negativamente la gluconeogénesis, al menos en parte, a través de la disminución de expresión del *SirT6* (Gertler and Cohen, 2013; Kim and Kim, 2013; Morris, 2013).

Adicionalmente, tanto *SirT1* como *SirT7* están implicadas en la activación de los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo, por lo que el incremento de metabolismo respiratorio producido por el aumento del catabolismo de la glucosa puede estimular el incremento de los mecanismos de protección contra las especies reactivas de oxígeno generadas en la mitocondria. En este proceso, el incremento de expresión de *SirT1* y *SirT7* puede estar mediando la activación de estos mecanismos de respuesta (Chang and Guarente, 2014).

La ausencia de diferencia de expresión estadísticamente significativa observada en estas tendencias de cambios de expresión de los genes de sirtuínas estudiados puede estar relacionada en parte a que los mecanismos de adaptación metabólica al tipo de fuente de carbono disponible para mantener la homeostasis energética de la célula requieren solo cambios sutiles en la actividad de los elementos reguladores, más que a un cambio significativo de su nivel de expresión.

El papel de la FSH como inductor de la proliferación celular en el ciclo reproductivo implica tanto un aumento del metabolismo general de la célula como un incremento de los mecanismos antiapoptóticos y de respuesta a los daños a estrés oxidativo y agentes genotóxicos. El tratamiento de las células de la granulosa con FSH muestra un incremento de la expresión de los 3 genes estudiados, siendo estadísticamente significativo el incremento de *SirT1*. Dado que en otros tejidos y tipos celulares se ha descrito el papel funcional de las 3 sirtuínas estudiadas en diferentes procesos relacionados con supervivencia celular, el incremento de expresión de los genes de sirtuínas y de *SirT1* en particular, puede estar mediando parte de la respuesta de proliferación celular a la estimulación con FSH.

En el tratamiento combinado de glucosa y FSH produce la mayor variación de expresión con respecto al control tanto para *SirT1* y *SirT7*, mientras que *SirT6* no varía considerablemente en relación al tratamiento con FSH. Se observa un efecto sinérgico entre la estimulación con FSH y la disponibilidad de glucosa como fuente de energía en los dos genes con un papel regulador positivo en la estimulación del consumo de glucosa y de proliferación celular. De nuevo, el incremento de expresión en *SirT1* observado es el único estadísticamente significativo.

En resumen, podríamos concluir que la disponibilidad de niveles alto de glucosa como fuente de carbono afecta a la expresión principalmente de *SirT1*, que podría estar relacionado con una mayor estimulación de las rutas metabólicas de degradación de la glucosa y un incremento de la actividad de los procesos de respuesta al estrés oxidativo producido por un aumento del metabolismo respiratorio en mitocondrias.

5.3 Clonaje y transfección de *SirT6*.

En el clonaje de la secuencia codificante de *SirT6* en los dos vectores elegidos (pcDNA3.1(-) y pEGFP-c1) se obtuvieron resultados diferentes. No se obtuvieron clones positivos al usar pcDNA3.1(-). Esto probablemente se deba a que solo se analizaron 12 clones. Aumentando el número de clones analizados aumentaría la posibilidad de encontrar algún clon positivo.

Se obtuvo un clon positivo para la construcción pEGFP-c1/*SirT6* que pudo ser comprobado cuantitativamente por qRT-PCR observándose una expresión de *SirT6* en células HeLa transfectadas 5 veces superior a la encontrada en células sin transfectar. Además, se comprobó cualitativamente mediante microscopia de fluorescencia, observando la expresión de la proteína fusión fluorescente en células transfectadas con la construcción (figura 16). En la imagen B, en la que se muestra células transfectadas con el vector vacío, la fluorescencia de GFP presenta una distribución uniforme por toda la célula. En la imagen D, que corresponde a células transfectadas con la construcción pEGFP-c1/*SirT6*, se observa que la fluorescencia producida por la proteína fusión GFP-*SirT6* se localiza principalmente en el núcleo de la célula, lo que indica una expresión funcional de *SirT6* correcta, ya que es capaz de dirigir la proteína fusión a su ubicación natural en la célula.

6. Conclusiones

- I. Las células de la granulosa en cultivo expresan *SirT1*, *SirT6* y *SirT7*, siendo la expresión relativa de cada gen respecto a β -actina de 100 ± 16 , 40 ± 10 y $200 \pm 34 \times 10^{-5}$ respectivamente.
- II. El tratamiento de las células de la granulosa con glucosa provoca un aumento de la expresión de *SirT1* y *SirT7* y una disminución de la expresión de *SirT6* respecto a las células control, aunque las diferencias observadas no han podido ser confirmadas como estadísticamente significativas con el número de cultivos analizados.

- III. El tratamiento con FSH provoca un incremento de la expresión de los tres genes de sirtuína analizados con respecto al control. Siendo este aumento estadísticamente significativo sólo en el caso de *SirT1*.
- IV. Existe un efecto sinérgico entre la estimulación con FSH y la disponibilidad de glucosa como fuente de carbono en la expresión de *SirT1*, ya que se observa una mayor variación de expresión de *SirT1* con respecto al control. Aunque, en menor medida, también se observa un incremento en la expresión de *SirT7*.
- V. Los resultados obtenidos indican que la respuesta proliferativa inducida por FSH y la regulación de la homeostasis del metabolismo energético en células de la granulosa puede, en parte, estar mediada principalmente por el gen *SirT1* y en menor medida por *SirT6* y *SirT7*.
- VI. Se comprueba la sobreexpresión de SirT6 fusionada a GFP al transfectar células HeLa con la construcción pEGFPc1/SirT6 tanto por el aumento de la transcripción con respecto al control de células sin transfectar como por la localización de la proteína fusión en el núcleo de las células, ubicación natural de SirT6.

Conclusions

- I. Cultured granulosa cells express *Sirt1*, *Sirt6* and *Sirt7*, with a β -actin relative expression level of 100 ± 16 , 40 ± 10 y $200\pm 34 \times 10^{-5}$, respectively.
- II. In presence of glucose, granulosa cells increased the *Sirt1* and *Sirt7* expression, but decreased the *Sirt6* expression. However, the observed difference in gene expression compared to control was not confirmed as statistically significant with the number of experiments analyzed.
- III. The FSH treatment increased the expression of the three sirtuin genes tested in this study. This increase was only statistically significant in the case of *Sirt1*.
- IV. A synergistic effect was observed in combined treatment with FSH and glucose in the expression of *Sirt1*. This effect was also observed in the case of *Sirt7*, but at a lesser extent.
- V. The results obtained indicate that proliferative response induced by FSH and the regulation of the energy metabolism of the granulosa cells might be, in part, mediated by *Sirt1* and, at a lesser extent, by *Sirt6* and *Sirt7*.
- VI. GFP-*Sirt6* overexpression in pEGFPc1/*Sirt6* transfected HeLa cells was determined by both qRT-PCR analysis and by fluorescent localization of the fusion protein in the nucleus - the normal localization of *Sirt6*.

7. Bibliografia

- Buccione,R., Schroeder,A.C., and Eppig,J.J.** (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction* 43:543-547.
- Chang,H.C., and Guarente,L.** (2014). SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25:138-145.
- Devine,P.J., Perreault,S.D., and Luderer,U.** (2012). Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biology of Reproduction* 86:27.
- Emori,C., and Sugiura,K.** (2014). Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. *Animal Science Journal* 85:627-633.
- Gertler,A.A., and Cohen,H.Y.** (2013). SIRT6, a protein with many faces. *Biogerontology*. 14:629-639.
- Hennet,M.L., and Combelles,C.M.** (2012). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International Journal of Developmental Biology* 56:819-831.
- 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* 88:399-413.
- Kim,W., and Kim,J.E.** (2013). SIRT7 an emerging sirtuin: deciphering newer roles. *Journal of Physiology and Pharmacology* 64:531-534.
- 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* 14:141-152.
- Mahlknecht,U., and Zschoernig,B.** (2012). Involvement of sirtuins in life-span and aging related diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 739:252-61. doi: 10.1007/978-1-4614-1704-0_16.:252-261.
- Messinis,I.E., Messini,C.I., and Dafopoulos,K.** (2010). The role of gonadotropins in the follicular phase. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1205:5-11. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05660.x.:5-11.
- Morris,B.J.** (2013). Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine* 56:133-71. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.525. Epub;%2012 Oct 24.:133-171.
- Pfaffl,M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:e45.
- Sack,M.N., and Finkel,T.** (2012). Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4:a013102.
- Schmittgen,T.D., and Livak,K.J.** (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols* 3:1101-1108.
- Sobinoff,A.P., Sutherland,J.M., and Mclaughlin,E.A.** (2013). Intracellular signalling during female gametogenesis. *Molecular Human Reproduction* 19:265-278.
- Su,Y.Q., Sugiura,K., and Eppig,J.J.** (2009). Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Seminars in Reproductive Medicine* 27:32-42.
- Tatone,C., and Amicarelli,F.** (2013). The aging ovary--the poor granulosa cells. *Fertility and Sterility* 99:12-17.
- Yuan,H., Su,L., and Chen,W.Y.** (2013). The emerging and diverse roles of sirtuins in cancer: a clinical perspective. *OncoTargets and Therapy* 6:1399-416. doi: 10.2147/OTT.S37750.:1399-1416.

Páginas webs consultadas:

http://www.fertilab.net/ginecopediia /fertilidad/anatomia_de_los_genitales/femeninos/ovarios_1

http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro /capitulo_17.htm

http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_17.htm.

http://portal.uned.es/portal/page?_pageid=93,25140344&_dad=portal&_schema=PORTAL.

http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/acercate-a-nuestros-cientificos_107.