



Sección de Biología
Universidad de La Laguna

Estudio del patrón de expresión de las isoformas de PHF10 en células de la granulosa humana y su relación con distintos diagnósticos de infertilidad

Analysis of the expression pattern of PHF10 isoforms in human granulosa cells and their relationship with different diagnoses of infertility

Trabajo de Fin de Grado

Cristina María Rodríguez Hernández

Tutorizado por Julio Ávila Marrero y Rita Marleny Martín Ramírez

Grado en Biología

Junio de 2022

Índice

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| Palabras clave | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| Key words..... | 2 |
| 1. Introducción | 3 |
| 1.1. Modelo de estudio: folículo ovárico, desarrollo folicular y regulación hormonal .. | 3 |
| 1.2. Condiciones que afectan a la fertilidad de la mujer | 7 |
| 1.3. Complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF | 10 |
| 1.4. PHD Finger Protein 10..... | 11 |
| 2. Hipótesis..... | 13 |
| 3. Objetivos | 13 |
| 4. Material y métodos..... | 15 |
| 4.1. Obtención y clasificación de las muestras | 15 |
| 4.2. Purificación de las células de la granulosa | 16 |
| 4.3. Western Blot | 16 |
| 4.4. Cuantificación de la expresión..... | 17 |
| 4.5. Cálculo de los pesos moleculares | 17 |
| 5. Resultados | 18 |
| 5.1. Análisis cualitativo de la expresión de PHF10 en células de la granulosa humana | 18 |
| 5.2. Análisis cuantitativo de la expresión de PHF10 en células de la granulosa humana | 19 |
| 6. Discusión..... | 22 |
| 7. Conclusiones | 26 |
| Conclusions | 27 |
| 8. Bibliografía..... | 28 |

Resumen

La reproducción asistida es un campo en auge que precisa del avance tecnológico y científico para la mejora de sus técnicas y eficacia. Las técnicas actuales de valoración de los ovocitos mediante rasgos morfológicos no son suficientes para determinar su calidad y estado de madurez, por lo que se hace necesaria la búsqueda de métodos no invasivos que permitan conocer su estado fisiológico. Uno de los métodos propuestos es el estudio de patrones de expresión génica en células de la granulosa, ya que interactúan constantemente con el ovocito permitiendo su correcto desarrollo y maduración. En este trabajo, se estudia mediante Western-Blot la expresión de PHF10 en células de la granulosa humana, una proteína del complejo remodelador de la cromatina PBAF que juega un papel relevante en procesos de diferenciación y proliferación celular, y que por tanto, podría estar involucrada en procesos de desarrollo en el ovario. Los resultados muestran que los grupos de mujeres analizados con problemas de fertilidad presentan una expresión de PHF10 diferente a las mujeres del grupo control, lo cual podría estar causando problemas en el desarrollo del ovocito. Por tanto, dadas las diferencias encontradas, el estudio de la expresión de PHF10 promete como posible indicador del estado fisiológico del ovocito.

Palabras clave

Reproducción asistida, calidad ovocitaria, células de la granulosa, SWI/SNF, PBAF, PHF10.

Abstract

Assisted reproduction is a growing field that requires technological and scientific progress to improve its techniques and efficiency. Current techniques for assessing oocytes by morphological traits is not sufficient to determine their quality and state of maturity, so it is necessary to seek for non-invasive methods that allow us to know their physiological state. One of the proposed methods is the study of gene expression patterns in granulosa cells, as they constantly interact with the oocyte, allowing its correct development and maturation. This paper studies by Western-Blot the expression of PHF10 in human granulosa cells, a protein of the PBAF chromatin remodelling complex that plays a relevant role in cell differentiation and proliferation processes and, therefore, could be involved in developmental processes in the ovary. The results show that the groups of women analysed with fertility problems have a different expression of PHF10 than the women in the control group, which could be causing problems in oocyte development. Therefore, given the differences found, the study of PHF10 expression promises as a possible indicator of the physiological state of the oocyte.

Key words

Assisted reproduction, oocyte quality, granulosa cells, SWI/SNF, PBAF, PHF10.

1. Introducción

La reproducción asistida, que comprende técnicas médicas y biológicas dirigidas a sustituir o facilitar los procesos naturales de la reproducción, es un campo que se encuentra actualmente en auge en las sociedades más desarrolladas (Peigné y Epelboin, 2018), principalmente debido a la tendencia generalizada de posponer la maternidad más allá de los 30 años. Esta situación se ha visto propiciada por una serie de cambios en el estilo de vida de las últimas décadas, tales como el aumento de la educación de la mujer y su incorporación en el mercado laboral (García et al., 2018).

A pesar de que la reproducción asistida es un campo relativamente reciente, con apenas 40 años de desarrollo, el uso y la eficacia de las distintas técnicas que engloba han aumentado significativamente, lo cual es debido en gran medida a los diversos avances científicos y a la incorporación de tecnología más avanzada, que permiten su desarrollo y continua evolución (Sutcliffe y Ludwig, 2007).

Los constantes avances científicos abren la posibilidad de seguir mejorando ciertos aspectos de la reproducción asistida, como puede ser la valoración del estado de los gametos femeninos. Actualmente, la calidad y el estado de madurez de los ovocitos son valorados únicamente mediante parámetros morfológicos, como son algunas alteraciones citoplasmáticas (agrupación de orgánulos, granulosidad, presencia de vacuolas, ...) o extracitoplasmáticas (anomalías en la zona pelúcida o en el espacio perivitelino, ...) (Hurtado de Mendoza et al., 2015). No obstante, si bien se ha demostrado que existe correlación entre determinados rasgos de la morfología ovocitaria con variables reproductivas como la calidad embrionaria o la implantación, una simple valoración morfológica no es suficiente para dilucidar el estado del gameto, es necesaria la valoración de su estado fisiológico.

1.1. Modelo de estudio: folículo ovárico, desarrollo folicular y regulación hormonal

Los ovarios están constituidos por diversos tipos celulares, que en su conjunto funcionan para el desarrollo del gameto femenino, el óvulo. Los diferentes tipos de células somáticas se encuentran organizados en unas estructuras denominadas folículos ováricos, que son considerados la unidad funcional y anatómica del ovario (Figura 1), y cuya principal función es proporcionar las condiciones necesarias para el adecuado desarrollo del ovocito que contienen en su interior (De Tomasi, Crespo y Crespo, 2012).

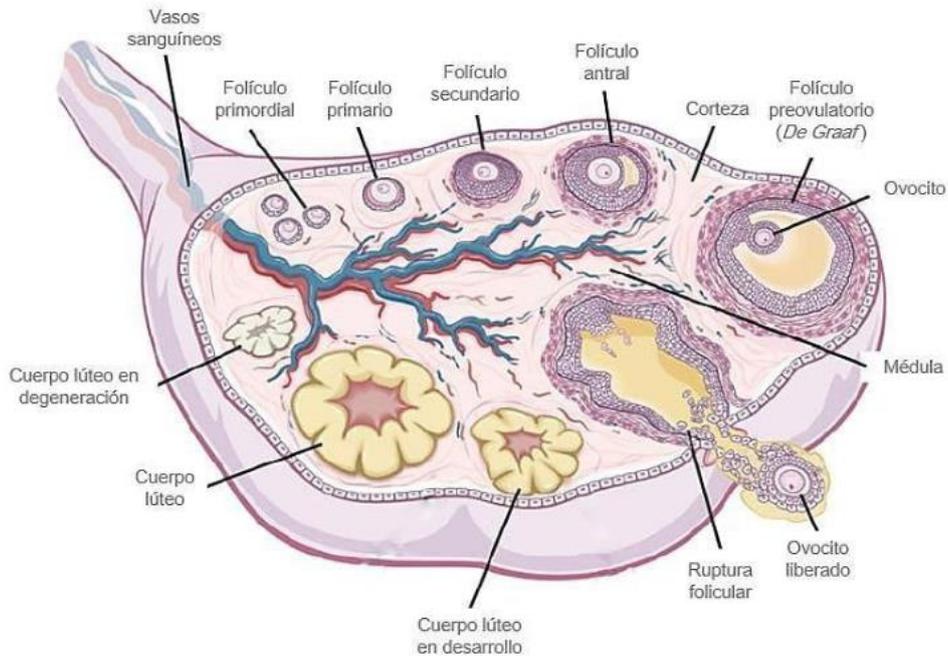


Figura 1. Esquema de la estructura del ovario de un mamífero. Los folículos ováricos en distintos estadios de desarrollo se distribuyen principalmente por la corteza ovárica. Imagen tomada de <https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/7839/413518T.pdf?sequence=1&isAlloved=y>

En cuanto a su estructura (Figura 2A), las células de la teca se encuentran rodeando al folículo, situadas en el exterior de la membrana basal. En el interior de esta membrana se encuentra un tipo de células epiteliales organizadas en capas alrededor del ovocito, las células de la granulosa. Las 2 o 3 capas más cercanas al gameto se denominan células del cúmulus, denominándose al resto células de la granulosa mural (Tresguerres et al., 2005).

Durante el desarrollo folicular, los folículos ováricos van a sufrir una serie de cambios que van a estar coordinados con el grado de diferenciación y maduración de los ovocitos que contienen, de manera que el desarrollo de folículo y ovocito ocurre de forma paralela. Este proceso está regulado cuidadosamente mediante la interacción física y paracrina entre los principales tipos celulares del folículo (Li y Albertini, 2013; Kidder y Vanderhyden, 2010). La comunicación y cooperación metabólica entre estas células, especialmente entre el ovocito y las células de la granulosa, son de vital importancia para el correcto desarrollo del gameto (Vantman y Vega, 2010), existiendo una dependencia mutua entre ambos tipos celulares. Esta interacción permite tanto el sustento del ovocito para su correcta maduración, como la proliferación y regulación de la función de las células somáticas a través de factores paracrinos liberados por el ovocito (Richani et al., 2021).

Esta comunicación bidireccional es posible gracias a complejos sistemas de unión ([Figura 2B](#)). Las células de la granulosa adyacentes al ovocito poseen unas finas prolongaciones citoplasmáticas, las proyecciones transzonales (TZPs), que hacen contacto con la superficie del ovocito. En los extremos de estas proyecciones se forman uniones adherentes o uniones comunicantes (gap junctions), siendo estas últimas las que permiten el paso de pequeñas moléculas como nucleótidos o aminoácidos (Russell et al., 2016). Además, estas proyecciones son estructuras dinámicas, que establecen conexiones entre ellas y que no son exclusivas de las células de la granulosa cercanas al oocito (Baena y Terasaki, 2019), lo cual refleja la complejidad de este sistema de comunicación.

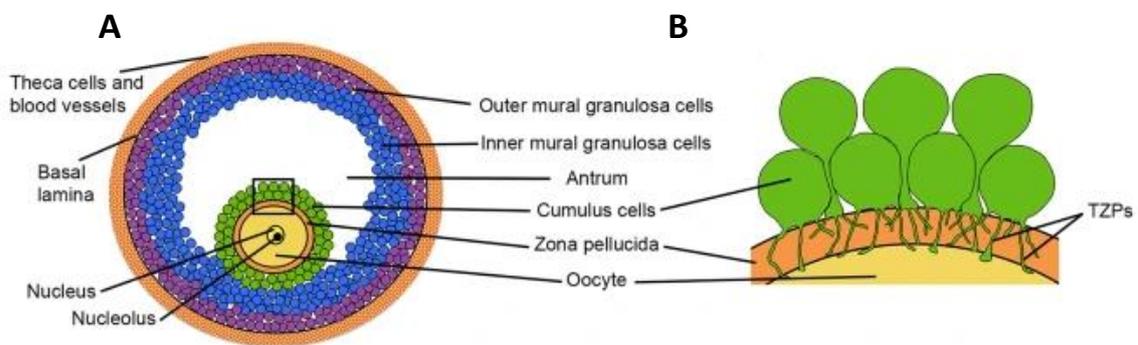


Figura 2. (A) Estructura de un folículo ovárico preovulatorio. (B) Representación simplificada de la comunicación entre las células de la granulosa con el ovocito a través de TZPs. Imagen tomada de Baena y Terasaki (2019).

Dado el estrecho contacto que existe entre las células de la granulosa y el ovocito, que permite su desarrollo y maduración de forma coordinada; es ampliamente aceptado el estudio del estado fisiológico de las células de la granulosa con el fin de obtener información acerca del estado del ovocito (Martín, 2014; Rodríguez, 2021).

En cuanto al **desarrollo folicular** ([Figura 3](#)), comienza con los folículos primordiales en el ovario embrionario. Estos pasan a denominarse folículos primarios cuando adquieren una capa de células epiteliales columnares (células de la granulosa). Una vez comienza la edad fértil de la mujer, debe ocurrir el proceso de foliculogénesis, de manera que cada mes varios folículos dejan la población de reserva y comienzan su desarrollo, pasando por los estadios de folículo secundario y folículo antral. Esto implica la proliferación de células de la granulosa y la aparición de las células de la teca y del antró. Tras la selección del folículo dominante, solo uno llegará al estadio de folículo de Graaf o preovulatorio, que tras la expulsión del ovocito y las células que lo rodean pasa a transformarse en cuerpo lúteo (De Tomasi, Crespo y Crespo, 2012; Pombo et al., 2010).

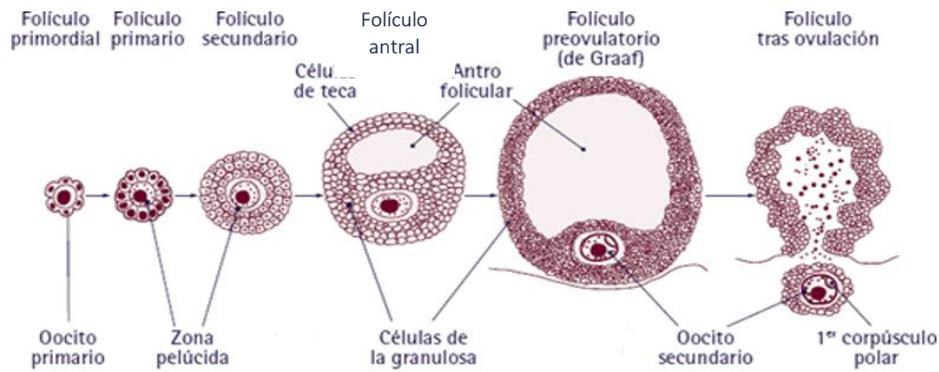


Figura 3. Esquema del desarrollo folicular desde los primeros estadios hasta después de la ovulación. Imagen modificada tomada de Pombo et al. (2010).

La **regulación hormonal** sigue un ciclo, el ciclo menstrual (**Figura 4**), que está compuesto por el ciclo uterino y el ovárico, y dura 28 días de media. Al inicio de cada ciclo comienza el desarrollo de varios folículos ováricos, aunque finalmente solo madura uno y ocurre la ovulación de un único ovocito. Este proceso involucra una serie de estadios secuenciales (iniciación, crecimiento, selección, ovulación y luteinización) regulados por la acción de diversas hormonas hipofisarias y gonadales.

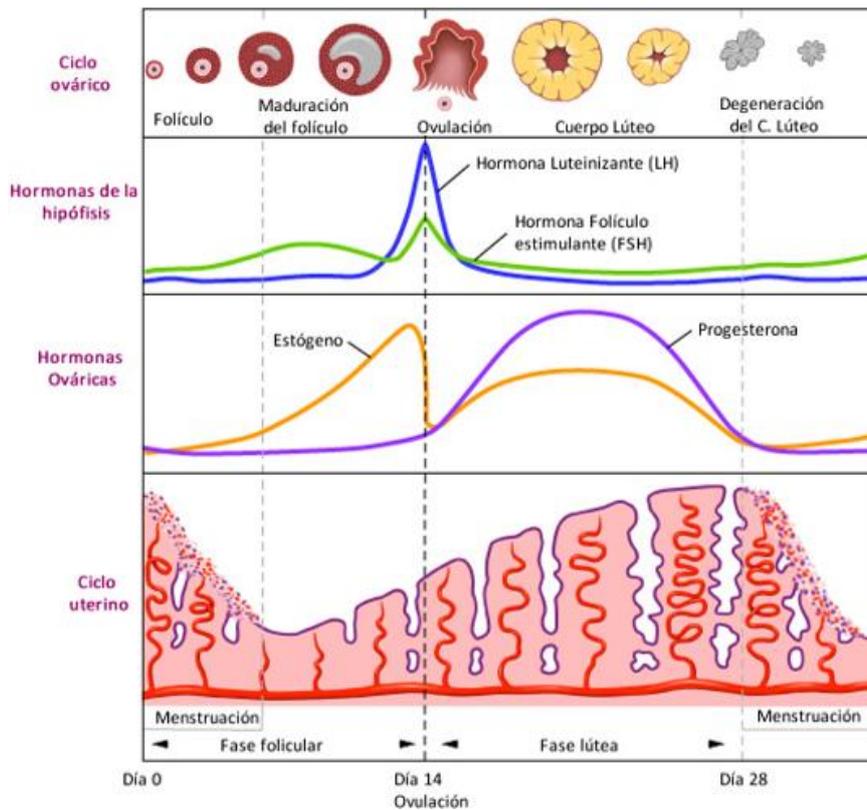


Figura 4. Esquema que representa los cambios en el ovario y en el útero durante el ciclo menstrual, así como la variación de las principales hormonas implicadas. Imagen modificada tomada de <https://www.portaleducativo.net/septimo-basico/783/El-ciclo-menstrual>

La secreción pulsátil del factor liberador de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo regula la secreción de las gonadotropinas en la hipófisis: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). FSH estimula el desarrollo de varios folículos y la producción de estrógenos en la granulosa, provocando a su vez un aumento de LH y la selección del folículo dominante. Tras el pico de LH, ocurre la ovulación y la degeneración del resto de folículos, dando paso a la formación del cuerpo lúteo, que secretará estrógenos y progesterona. Estas inhiben la liberación de gonadotropinas, evitando el comienzo de un nuevo ciclo hasta que el cuerpo lúteo degenere, a no ser que ocurra la fecundación (Jiménez y Aguilá, 2017).

1.2. Condiciones que afectan a la fertilidad de la mujer

Existen diversas condiciones, como ciertos trastornos o patologías, que afectan al sistema reproductor femenino y que por tanto, pueden tener efectos nocivos sobre la fertilidad. Destacaremos algunos de los más relevantes, los que se tendrán en cuenta en este estudio.

○ *Edad*

Existe una pérdida de fertilidad a medida que aumenta la edad de la mujer, lo cual se debe en gran medida a la disminución de la cantidad y calidad de los gametos. Se ha observado una ligera pérdida de fertilidad al comienzo de la tercera década de vida de la mujer, pero es a partir de los 35 cuando tiene lugar una disminución mucho más marcada. La edad avanzada es uno de los factores de riesgo no modificables más relevante a la hora de sufrir infertilidad y es la causa más común para recibir tratamientos de reproducción asistida (García et al., 2018).

El envejecimiento no solo implica la reducción progresiva de la reserva ovárica, también compromete la calidad de los ovocitos y los embriones, dando como resultado una merma del desarrollo del embrión y una elevada tasa de anomalías cromosómicas. Uno de los factores que subyacen a esta pérdida de calidad es la disfunción de las mitocondrias. Una edad avanzada provoca pérdida de integridad del ADN mitocondrial, disminución de la producción de ATP y cambios en su morfología que afectan a su función. En el ovocito, esto compromete al adecuado desarrollo del embrión, mientras que en las células de la granulosa puede afectar negativamente en la maduración del ovocito (Cimadomo et al., 2018).

Ligado a la disfunción de las mitocondrias, el estrés oxidativo también juega un papel muy importante. Aunque la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado del metabolismo aeróbico es inevitable, las células cuentan con mecanismos para mantener el

balance redox y la homeostasis. No obstante, una edad avanzada implica una mayor producción de ROS y disminución de la capacidad antioxidante del ovocito, que provoca un aumento del estrés oxidativo. Este causa daños en múltiples componentes celulares, lo que conlleva a la escasez de ATP, daños en el ADN, errores en la segregación de cromosomas y anomalías en la degradación de proteínas. En definitiva, el estrés oxidativo conduce a una reducción de la competencia de los ovocitos (Sasaki et al., 2019).

- *Síndrome del ovario poliquístico*

El síndrome del ovario poliquístico (PCOS, por sus siglas en inglés) es un trastorno metabólico y reproductivo complejo que se caracteriza principalmente por la presencia de ovarios poliquísticos, irregularidades menstruales e hiperandrogenismo. Su prevalencia varía entre el 2 y el 26% de las mujeres en edad reproductiva, siendo la endocrinopatología más común en mujeres y una causa frecuente de infertilidad (Notaro y Neto, 2022).

En las mujeres con PCOS, muchos de los mecanismos que permiten la correcta maduración del ovocito pueden encontrarse alterados. El hiperandrogenismo surge por una producción excesiva de precursores de la testosterona por las células de la teca y las glándulas adrenales. Estos andrógenos promueven el crecimiento temprano de los folículos, así como un aumento en el número de folículos que se desarrollan; pero estos serán folículos antrales con un tamaño disminuido y con oocitos cuya expresión génica no es normal, que además no alcanzarán la ovulación, formando quistes en el ovario. Otro de los efectos de los andrógenos es su interferencia en las vías de señalización dependientes de estrógenos que participan en la maduración del ovocito (Dumesic y Abbott, 2008; Patel, 2018).

Se ha comprobado que el funcionamiento de las células de la granulosa es diferente en pacientes con PCOS, observándose una sobrerregulación en la proliferación de estas células. Además, en estudios realizados con miRNAs, pequeños fragmentos de ARN que actúan como reguladores postranscripcionales, se ha visto que las mujeres con PCOS presentan una mayor expresión de miRNAs que pueden estar relacionados con una deficiencia relativa de estrógenos (Tu et al., 2019).

- *Endometriosis*

La endometriosis es una patología caracterizada por la proliferación de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, el cual induce sangrados y una respuesta inflamatoria crónica que puede derivar en síntomas como el dolor y la infertilidad. Su prevalencia puede llegar hasta un

50% en las mujeres que experimentan dolor o infertilidad (Araya, 2019; Falcone y Flyckt, 2018).

Molecularmente, en mujeres con endometriosis se han encontrado algunas mutaciones somáticas en genes relacionados con el cáncer, como el oncogén viral del sarcoma de la rata de Kirsten (KRAS, por sus siglas en inglés), a pesar de que las células del tejido endometrial tienen una capacidad proliferativa limitada. Esto se debe a que la carcinogénesis requiere de un mínimo de tres mutaciones impulsoras del cáncer para desarrollarse, y en todos los casos estudiados se encontraba como máximo una mutación de estas características. Además, se ha comprobado que estas mutaciones aisladas no inducen la proliferación celular, aunque sí que pueden contribuir a otros fenotipos de la enfermedad, como contribuir a la supervivencia del endometrio ectópico.

Otro gen que se encuentra mutado o no se expresa en mujeres con endometriosis es ARD1A, el cual codifica una proteína que participa en la remodelación de la cromatina mediada por SWI/SNF, jugando un papel crítico en procesos biológicos como la transcripción o la metilación del ADN. Este gen puede contribuir en el fenotipo de la endometriosis incrementando la invasividad y afectando a la vía de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que a su vez afecta a la señalización de la progesterona. Además, se han encontrado diferencias en los patrones de metilación de diversos genes entre mujeres con y sin endometriosis, así como diferentes perfiles de miRNAs (Wang, Nicholes y Shih, 2020). Cabe destacar que el ambiente folicular también se encuentra alterado en mujeres con endometriosis, afectando a la calidad del ovocito y del embrión (Garrido et al., 2000).

- *Baja respuesta ovárica*

La baja respuesta ovárica (PR, por sus siglas en inglés) se caracteriza por una reducida respuesta folicular ante la estimulación por gonadotropinas durante los procedimientos de fecundación in vitro, recuperando una cantidad reducida de ovocitos (Del Campo-Audelo, Barros-Delgadillo y Muñoz-Manrique, 2022), además de presentar altos niveles basales de FSH y niveles más reducidos de la hormona antimulleriana (AMH). Se estima que entre un 5,6 y un 35% de las mujeres que se someten a protocolos de estimulación ovárica presentan una baja respuesta (Zhang et al., 2020).

Se han descrito diferentes posibles causas para esta patología. El principal factor de la baja respuesta ovárica es una reserva ovárica disminuida, aunque también juegan un papel importante las alteraciones en la angiogénesis folicular ovárica, la presencia de inhibidores que

no permiten la unión de FSH en sus receptores específicos y la disminución de la cantidad de receptores de FSH, entre otros factores.

En cuanto al papel de los receptores de FSH (FSHR), se ha observado que a pesar del aporte exógeno de FSH existen ineficiencias en el desarrollo folicular, lo que puede deberse a una expresión de FSHR insuficiente en las células de la granulosa, o incluso a deficiencias en su actividad, afectando a la transmisión en las vías de señalización. Se ha demostrado que pacientes con baja respuesta ovárica presentan una cantidad menor de ARNm para FSHR, así como de proteína, lo que significa que la cantidad de estos receptores pueden tener un papel clave en el desarrollo del ovocito, y que su alteración puede afectar a la diferenciación de las células de la granulosa (Estrada, 2014). Cabe destacar que en mujeres con baja respuesta ovárica la calidad de los ovocitos no se ve afectada, por lo que los mecanismos que controlan la baja respuesta y los parámetros de calidad parecen ser diferentes (Morin et al., 2018).

1.3. Complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF

SWI/SNF (switching/sucrose non-fermenting) es una familia de complejos remodeladores de la cromatina presentes en eucariotas, que juegan un papel clave en la proliferación y diferenciación de una gran variedad de tejidos y tipos celulares. Se trata de un complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP, por lo que utiliza la energía resultante de su hidrólisis para provocar la movilización de los nucleosomas, alterando la accesibilidad al ADN y con ello regulando la expresión de diversos genes (Figura 5A). En concreto, actúa predominantemente como activador de la transcripción, facilitando el acceso al ADN de factores de unión transcripcionales, coactivadores y ARN polimerasa.

El complejo está formado por diversas subunidades (Figura 5B), entre las que encontramos BRM/BRG1, BAF155, BAF170 y SNF5; que se encuentran en todos los complejos SWI/SNF formando un núcleo catalítico activo. Además, cuentan con otras subunidades asociadas, que van a diferir entre las dos subclases que presenta SWI/SNF en mamíferos: BRG1/BRM associated factor (BAF) y polybromo BRG1-associated factors (PBAF) (Ruijtenberg y Van den Heuvel, 2016). Entre las subunidades específicas del complejo PBAF, encontramos la subunidad PHF10/BAF45A, que presenta un rol esencial en el funcionamiento del complejo.

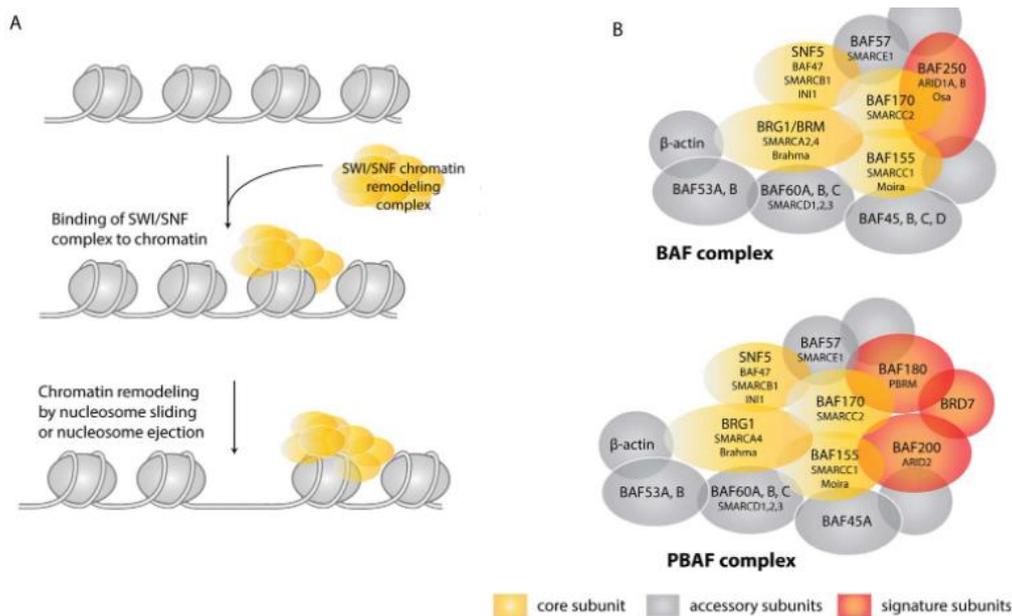


Figura 5. (A) Funcionamiento del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF. (B) Vista esquemática de la composición de los complejos BAF y PBAF. Imagen tomada de Ruijtenberg y Van den Heuvel (2016).

1.4. PHD Finger Protein 10

La proteína PHF10 (PHD Finger Protein 10), también conocida como BAF45A, es una de las subunidades específicas del complejo PBAF, que se encuentra implicada en la interacción con la cromatina y juega un rol muy importante en la regulación transcripcional. Se ha demostrado que, en ratones, PHF10 es esencial para el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas adultas, además de que su delección es letal en embriones (Krasteva, Crabtree y Lessard, 2017). También es necesario para el mantenimiento de las células madre neurales durante el desarrollo cerebral de ratón, y en células humanas se ha observado que el agotamiento de PHF10 conduce a la degradación de otras subunidades del complejo, así como una disminución de la presencia de PBAF en los promotores de los genes (Tatarskiy et al., 2017).

En cuanto a su estructura, cuenta con un dominio SAY (supporter of activation of yellow) altamente conservado, que es responsable de la incorporación de la proteína al complejo PBAF. Además, presenta un dominio enlazador, así como dos dominios PHD (plant homeodomain fingers) en su extremo C-terminal, aunque este último puede estar sustituido por el dominio PDSM (phosphorylation-dependent sumoylation motif) en otras isoformas. Concretamente, PHF10 presenta 4 isoformas en mamíferos (Figura 6), las cuales son producto de la expresión de un mismo gen, formadas como resultado de un splicing alternativo. Las isoformas PHF10-P

presentan dos dominios PHD, los cuales contienen dedos de zinc capaces de reconocer los extremos N-terminales modificados de las histonas H3. Por otro lado, en las isoformas PHF10-S, este dominio está sustituido por PDSM, que regula la sumoilación dependiente de fosforilación. En adición, las isoformas pueden diferir en su extremo N-terminal, por la presencia (PHF10-PI y PHF10-SI) o ausencia (PHF10-Ps y PHF10-Ss) de un fragmento de 46

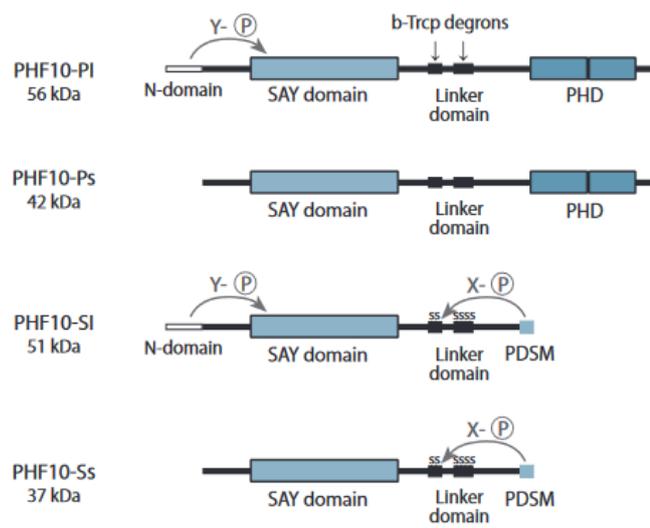


Figura 6. Estructura isoformas de PHF10 con sus relativos pesos moleculares. Imagen tomada de Sheynov et al. (2019).

aminoácidos. Las distintas isoformas se unen alternativamente al complejo, desempeñando diferentes funciones en la transcripción génica (Brechalov, Georgieva y Soshnikova, 2014; Sheynov et al., 2019; Chugunov et al., 2021).

Funcionalmente, solo las isoformas con el dominio PHD son capaces de regular positivamente la transcripción de genes involucrados en proliferación celular, de manera que en aquellas células en las que se sobreexpresa PHF10-P se ha observado un incremento del número de divisiones celulares por unidad de tiempo. En los complejos PBAF que interactúan con los promotores de genes de proliferación celular ZMIZ1 y NOV, se identificaron las isoformas PHF10-PI y PHF10-SI, aunque solo la primera fue capaz de incrementar la cantidad de ARN polimerasa II (Sheynov et al., 2019). Respecto a las isoformas PHF10-S, ejercen un efecto diferente, ya que causan una leve disminución de la capacidad de proliferación de las células (Brechalov, Georgieva y Soshnikova, 2014).

Cabe destacar que las modificaciones postraduccionales juegan un papel muy importante en la regulación de la función de PBAF, así como su sensibilidad en diferentes vías de señalización. Esta regulación recae sobre todo en PHF10, la cual es una de las proteínas más fosforiladas del complejo (Tatarskiy et al., 2017). Sus distintas isoformas se encuentran fosforiladas diferencialmente, lo que afecta en gran medida a su estabilidad. Mantener los distintos niveles de estabilidad de las isoformas es de gran relevancia, ya que regula su nivel celular y por tanto su tasa de incorporación en el complejo PBAF, lo que puede alterar la regulación de la expresión génica por parte de este complejo (Sheynov et al., 2020).

2. Hipótesis

Los complejos remodeladores de la cromatina de la familia SWI/SNF juegan un papel relevante en procesos de proliferación y diferenciación de diferentes tejidos y tipos celulares. Entre los distintos componentes del complejo destaca la proteína PHF10, que no solo está involucrada en la interacción del complejo con el ADN, sino que además participa en la regulación transcripcional. Se ha demostrado que esta proteína es capaz de aumentar la transcripción de genes implicados en procesos de proliferación celular, siendo esencial para el mantenimiento de células madre hematopoyéticas y neuronales.

En base a lo anteriormente expuesto, PHF10 podría estar implicada en los distintos procesos de proliferación y diferenciación que experimenta el ovario, los cuales presentan una gran importancia para el correcto funcionamiento de este órgano. Entre estos procesos, PHF10 podría participar en el desarrollo de los folículos ováricos, jugando por tanto un rol en el desarrollo y maduración del ovocito. De esta manera, cabría la posibilidad de que PHF10 presente un papel relevante, y por consiguiente es una proteína candidata a ser estudiada en distintos grupos de mujeres con diferentes grados de infertilidad. Tras el análisis de su expresión, se espera que existan diferencias en la expresión de las distintas isoformas entre los distintos grupos. En concreto, puede que exista una expresión anómala de las isoformas P en aquellos trastornos en los que existen irregularidades en la proliferación celular.

3. Objetivos

El estudio del ovocito basado únicamente en rasgos morfológicos brinda cierta información sobre el estado de madurez del gameto y su calidad. Sin embargo, esta valoración morfológica no es suficiente para determinar el estado del ovocito, de manera que es de vital importancia conocer también su estado fisiológico. Para ello, se hace necesario el desarrollo de técnicas no invasivas, como puede ser el estudio de patrones de expresión génica en células de la granulosa. Estas se encuentran en estrecho contacto con el ovocito y presentan un desarrollo coordinado, por lo que nos pueden aportar información interesante sobre el estado del folículo, y a su vez, del gameto. Por todo esto, el principal objetivo del presente estudio es recabar información sobre la expresión de PHF10 en células de la granulosa humana, con el fin de determinar si el nivel de expresión de esta proteína podría ser usado como un indicador del estado fisiológico del gameto femenino.

Con este propósito, los objetivos específicos a alcanzar en el trabajo fueron los siguientes:

1. Analizar el patrón de expresión de la proteína PHF10 en células de la granulosa humana.
2. Determinar si existen diferencias en el nivel de expresión de esta proteína entre distintos grupos de mujeres con diferentes diagnósticos.

4. Material y métodos

4.1. Obtención y clasificación de las muestras

El estudio se llevó a cabo con células de la granulosa humana procedentes de diferentes grupos de mujeres incluidas en programas de reproducción asistida en el Centro de Reproducción Humana de Canarias (FIVAP, centro colaborador de este estudio) y cuenta con la aprobación del comité de ética de la Universidad de La Laguna. Con el fin de promover el desarrollo de los folículos ováricos, estas mujeres fueron sometidas a estimulación ovárica inducida por administración de una combinación de FSH y LH recombinantes. Las muestras se obtuvieron mediante punción transvaginal guiada por ultrasonido, realizada por el personal médico del centro colaborador. En este procedimiento se extrae el líquido folicular, el cual contiene al ovocito así como diferentes tipos celulares, entre los que se encuentran las células de la granulosa.

Las muestras (líquido folicular) se clasificaron según las características y diagnóstico de las pacientes, estableciendo los siguientes grupos de estudio:

- Donantes (grupo control): mujeres con una edad comprendida entre 18 y 30 años que han participado en programas de donación de óvulos.
- Mujeres con infertilidad no asociada a factor ovárico (Non ovarian factor, NOF): pacientes menores de 40 años que no presentan afectación ovárica.
- Mayores de 40 años (>40): mujeres con más de 40 años y sin afectación ovárica por patología que han sido sometidas a tratamientos de reproducción asistida.
- Mujeres con baja respuesta ovárica (PR): Mujeres menores de 40 años con baja respuesta ovárica en base a los criterios de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología.
- Mujeres con endometriosis: mujeres diagnosticadas histológicamente con endometriosis en fases III y IV, según la sociedad Americana de Medicina Reproductiva.
- Mujeres con síndrome del ovario poliquístico (PCOS): Mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico de acuerdo al criterio de Rotterdam.

Para el estudio se analizaron tres muestras diferentes de cada grupo de pacientes, lo que hace un total de 18 muestras analizadas.

4.2. Purificación de las células de la granulosa

Con el objetivo de aislar las células de la granulosa del resto de componentes del líquido folicular se llevó a cabo un protocolo de aislamiento y purificación basado en diferentes técnicas. Primero, las muestras se sometieron a centrifugación en un gradiente de Percoll (Sigma) al 50%, separando a los eritrocitos del resto de células. En la interfase resultante se encontraban tanto las células de la granulosa como los leucocitos, que fueron eliminados mediante el uso de Dynabeads M-450 CD45 (Invitrogen), pequeñas partículas magnéticas con anticuerpos en su superficie que reconocen a CD45, antígeno presente en los leucocitos. Tras la purificación, las células fueron conservadas en pellets a -80°C.

4.3. Western Blot

El Western Blot es una técnica ampliamente usada para la detección de proteínas específicas en una mezcla compleja, por lo que se llevó a cabo esta técnica para detectar PHF10 en las células de la granulosa. Para ello, los pellets celulares guardados a -80° fueron recuperados y se descongelaron en hielo para la posterior preparación de las muestras, que fueron resuspendidas en Laemmli Sample Buffer (LSB) e incubadas a 95°C durante 10 minutos en un bloque térmico para asegurar la desnaturalización de las proteínas.

Una vez preparadas las muestras, se sometieron a una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con el fin de separar a las proteínas por su peso molecular. Para ello se prepararon geles, con un porcentaje de acrilamida del 8% (gel de separación) y 4% (gel de compactación). Se cargó una muestra por cada grupo de pacientes, todas con el mismo número de células; así como el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards #1610375 Bio-Rad Laboratories, USA), realizándose este procedimiento por triplicado utilizando muestras de pacientes distintas para cada grupo. La electroforesis se desarrolló a 100 V, hasta que el frente, marcado por el azul de bromofenol presente en el LSB, llegara al extremo del gel.

Tras el SDS-PAGE se llevó a cabo la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Este proceso se realizó en húmedo sumergiendo el sándwich (papel wattman-membrana-gel-papel wattman) en Buffer de Transferencia Tris-Glicina y en frío durante 1 hora a 100 V. Una vez finalizada la transferencia se procedió al bloqueo de la membrana, usando una solución de bloqueo al 5% consistente en leche desnatada en polvo disuelta en Tampón Fosfato Salino (PBS) con 0.1% de Tween-20

(P94126, Sigma) o PBST. La membrana se sumergió en esta solución durante 1 hora con agitación.

A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario (Anti-PHF10 antibody [ab154637] Abcam) a una dilución de 1:1500. Tras 12 horas de incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBST y se incubó durante 50 minutos con el anticuerpo secundario (Anti-Mouse IgG [whole molecule]-Peroxidase antibody. A5906 Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:10000. Pasado el tiempo se hicieron tres lavados de 10 minutos con PBST y se procedió al revelado de la membrana usando para ello el reactivo Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (WBKLS0100, Merk Millipore, USA) y el equipo ChemiDoc XRS+ de Bio-Rad, que recogió imágenes de la membrana cada minuto durante una hora. Tras el proceso de revelado, las membranas fueron teñidas con azul de Coomassie, lo que permite visualizar todas las proteínas presentes en la membrana, y se obtuvieron imágenes de la membrana teñida. Esto es necesario para la posterior normalización en el proceso de cuantificación de expresión proteica.

4.4. Cuantificación de la expresión

La cuantificación de la cantidad relativa de proteínas en cada banda se llevó a cabo mediante el software Image Lab versión 6.1 de Bio-Rad. Este software permite el análisis de cada banda a través de la cuantificación de los píxeles que la componen en la imagen de revelado. Con esta información, el programa realiza una normalización en función del número de píxeles que se corresponden con la cantidad de proteína total en ese carril, usando para ello las imágenes de las membranas teñidas con azul de Coomassie. Por tanto, el resultado de la cuantificación es un valor relativo que nos informa de la expresión de PHF10 en cada banda.

4.5. Cálculo de los pesos moleculares

El peso molecular para cada banda fue calculado mediante interpolación. Para ello se usó una recta patrón elaborada a partir de las bandas obtenidas en el carril donde se cargó 5 μ l del marcador de peso molecular, cuyos pesos moleculares son conocidos. Con esta recta se interpoló los pesos moleculares de las bandas del resto de los carriles, dada la relación lineal que existe entre el logaritmo del peso molecular y la distancia que recorre la proteína en relación al frente de avance de la electroforesis.

5. Resultados

5.1. Análisis cualitativo de la expresión de PHF10 en células de la granulosa humana

Con el objetivo de estudiar la expresión de la proteína PHF10 en las células de la granulosa humana de diferentes grupos de pacientes, se aplicó la técnica de Western Blot (n=3). Tras el revelado de las membranas, se observaron numerosas bandas de diferentes pesos moleculares y con diferentes intensidades, como se muestra en la [Figura 7A](#).

Al analizar y comparar las imágenes obtenidas de los diferentes Western Blot, se observaron un total de 7 bandas diferentes dentro del rango de pesos moleculares (PM) en el que esperaríamos encontrar las distintas isoformas de PHF10. Según datos teóricos y experimentales de la bibliografía, este rango varía en torno a los 30 y 80 kDa, aunque fuera de este también se han observado bandas adicionales.

Las bandas se enumeraron del 1 al 7 en función del PM estimado de las proteínas que la conforman, como se muestra en la [Tabla 1](#). Además podemos ver la disposición de estas bandas para cada uno de los grupos en la [Figura 7B](#).

Tabla 1. Peso molecular estimado en kDa para cada una de las bandas observadas en los Western Blot.

| | PM estimado |
|---------|-------------|
| Banda 1 | 80 |
| Banda 2 | 70 |
| Banda 3 | 60 |
| Banda 4 | 55 |
| Banda 5 | 50 |
| Banda 6 | 40 |
| Banda 7 | 35 |

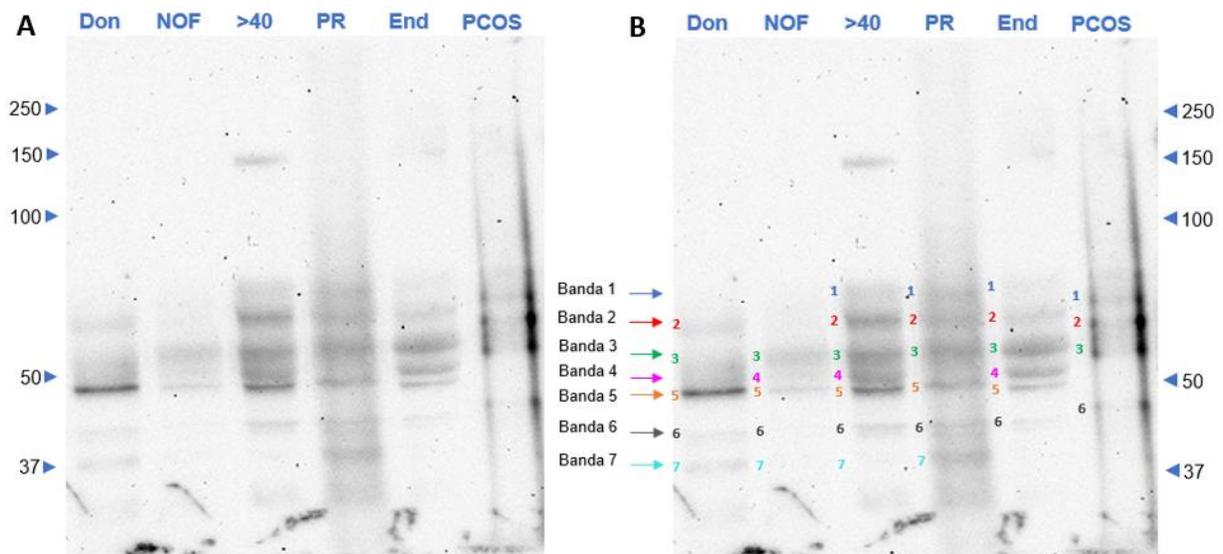


Figura 7. Western Blot de PHF10 en distintos grupos de pacientes. **A.** Imagen sin modificar junto a los pesos moleculares (kDa). **B.** Se representan las 7 bandas en cada carril de diferentes colores.

En cuanto a las diferencias de expresión de PHF10 entre los distintos grupos de pacientes analizados, podemos observar que aunque el total de bandas contempladas fueron 7, estas no se encuentran igual de representadas en todos los grupos, a excepción de tres bandas que son comunes en todos ellos: la banda 3, la 5 y la 6 (Figura 7B).

El resto de las bandas no se encontraron en todos los grupos (Tabla 2). La banda 1 se encuentra presente en todos los grupos exceptuando a los grupos Donantes y NOF, que son aquellos que no presentan patologías por afectación ovárica ni por la edad. La banda 2 se encontró en todos los diagnósticos excepto en NOF, mientras que la banda 4 no aparece en las donantes ni en PCOS. En cuanto a la banda 7, se observa en todos los grupos a excepción de las pacientes con endometriosis y PCOS.

| | Don | NOF | >40 | PR | End | PCOS |
|----------------|-----|-----|-----|----|-----|------|
| <i>Banda 1</i> | - | - | + | + | + | + |
| <i>Banda 2</i> | + | - | + | + | + | + |
| <i>Banda 3</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Banda 4</i> | - | + | + | + | + | - |
| <i>Banda 5</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Banda 6</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Banda 7</i> | + | + | + | + | - | - |

Tabla 2. Distribución de las bandas en los distintos grupos. El símbolo + indica la presencia de esa banda y el símbolo – su ausencia.

5.2. Análisis cuantitativo de la expresión de PHF10 en células de la granulosa humana

Con el fin de poder analizar de forma cuantitativa las diferencias de expresión de PHF10 entre los diferentes grupos diagnósticos, se calculó la cantidad relativa de proteína para cada una de las bandas en función del total de proteína presente en el carril, obteniendo una cantidad de proteína expresada en unidades arbitrarias.

Los resultados de la cuantificación de la cantidad de proteína para las bandas comunes en todos los diagnósticos se muestran en la Figura 8, donde podemos apreciar que existen diferencias de expresión entre los diferentes grupos. En la banda 3, los grupos de Donantes, NOF y Endometriosis presentan una cantidad de proteína similar, mientras que los grupos >40, PR y PCOS presentan una cantidad mayor, aproximadamente el doble que el grupo control. Respecto a la banda 5, son los grupos Donantes, >40 y PCOS los que muestran una expresión similar de PHF10. Por otro lado, el grupo PR presenta en torno a la mitad de proteína que el

grupo control y los grupos NOF y Endometriosis aproximadamente un cuarto. En cuanto a la banda 6, todos los grupos presentan una cantidad relativamente baja, a excepción de PCOS, que presenta una cantidad de proteína unas 10 veces mayor que las donantes.

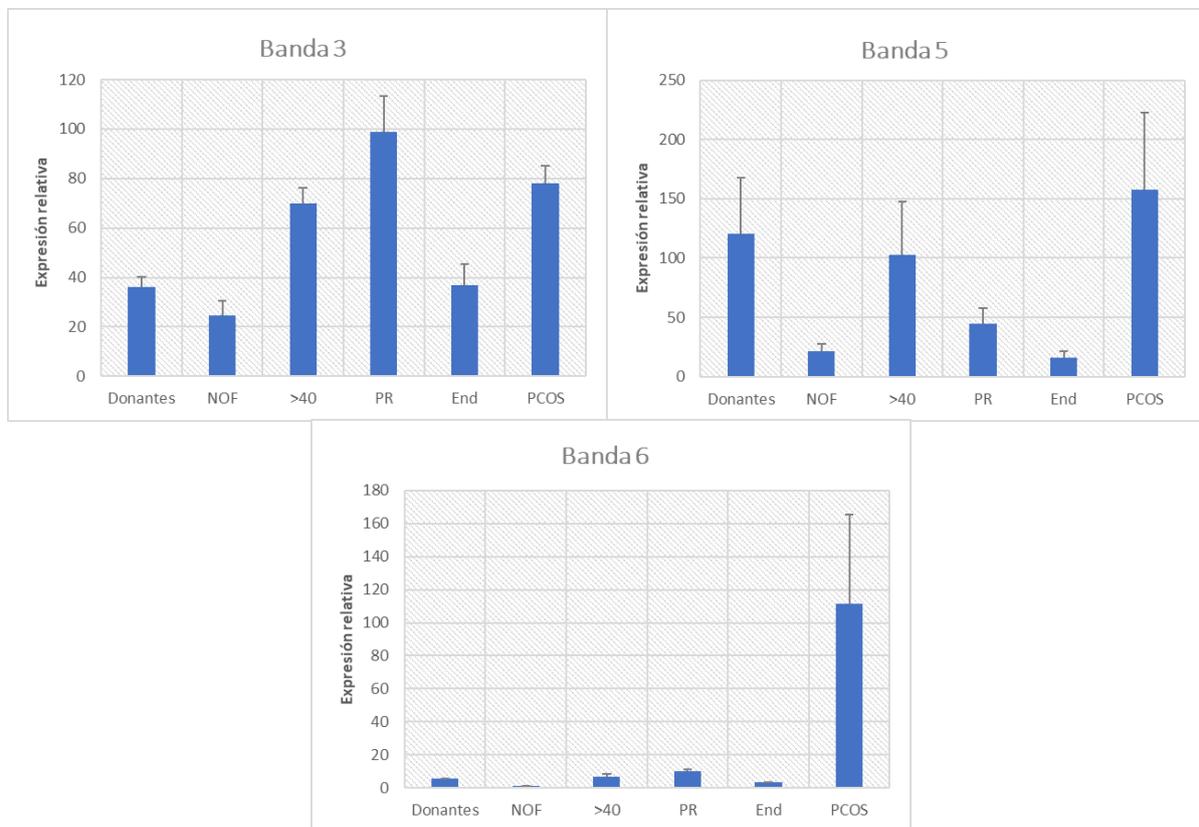


Figura 8. Gráficas de la cantidad media de proteína que contienen las bandas 3, 5 y 6 en cada uno de los grupos diagnósticos. La cantidad de proteína viene dada en unidades arbitrarias $\cdot 10^5$.

También se cuantificó la cantidad de proteína relativa para el resto de las bandas ([Figura 9](#)). La banda 1, que no se encuentra ni en Donantes ni en NOF (grupos control), presenta una cantidad menor en el grupo >40, mientras que los grupos PR y Endometriosis presentan casi el doble. Por otra parte, el grupo PCOS presenta mayor expresión de esta banda, con unas tres veces más cantidad de proteína que el grupo Endometriosis. En la banda 2, que no está presente en NOF, hay una expresión elevada en todos los grupos respecto a las donantes. En pacientes con endometriosis la expresión se ve duplicada con respecto al grupo control, mientras que en >40, PR y PCOS la expresión es casi el triple. En cuanto a la banda 4 (ausente en Donantes y PCOS), los grupos NOF, >40 y Endometriosis presentan una cantidad de proteína semejante, pero en el grupo PR la expresión es hasta 4 veces mayor que en NOF. Por último, con relación a la banda 7, el grupo NOF destaca por tener una expresión de hasta 5 veces mayor que Donantes y PR, mientras que las pacientes mayores de 40 años presentan apenas la mitad de proteína que las donantes.

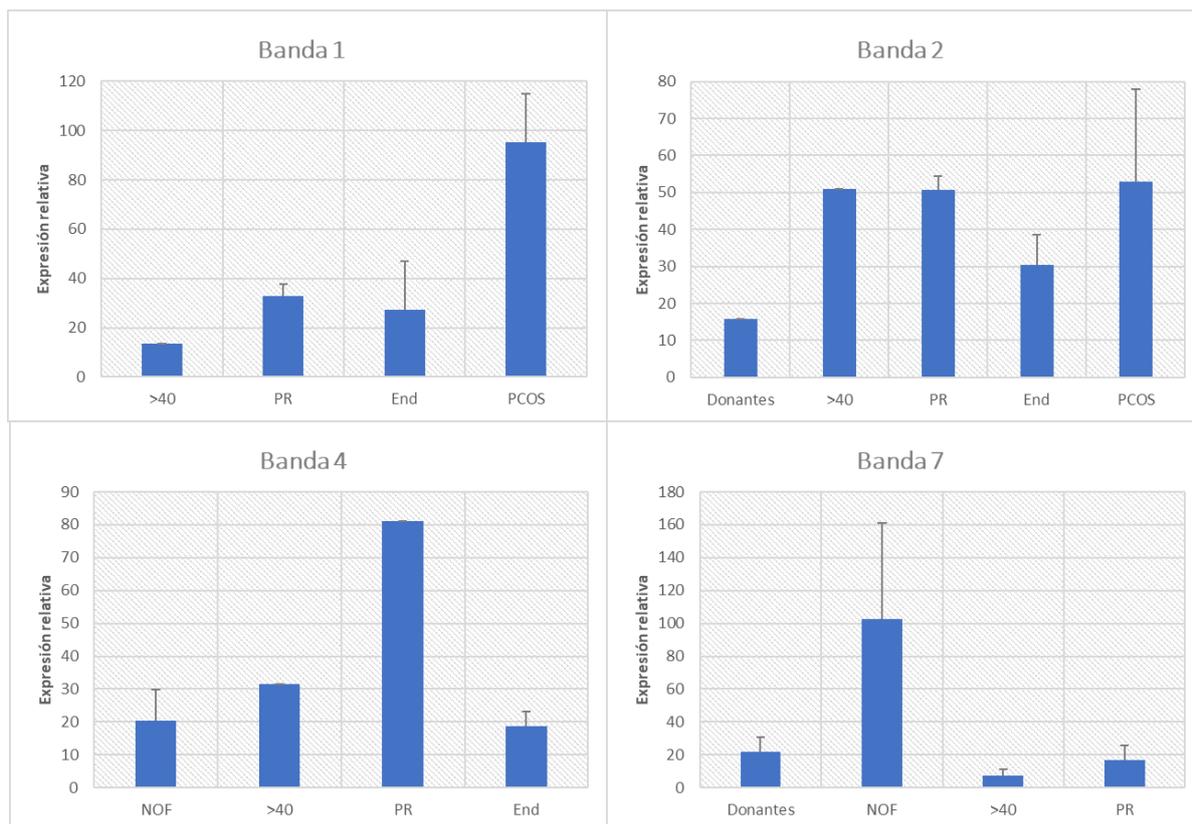


Figura 9. Gráficas de la cantidad media de proteína que contienen las bandas 1, 2, 4 y 6 en cada uno de los diagnósticos que presentan dichas bandas. La cantidad de proteína viene dada en unidades arbitrarias $\cdot 10^5$.

6. Discusión

La determinación del estado fisiológico de ovocito es de gran relevancia y podría mejorar notablemente los tratamientos de reproducción asistida. Con el fin de hallar un indicador de la calidad y estado del ovocito, se ha realizado el análisis de la expresión de la proteína PHF10 en las células de la granulosa humana, dado que esta proteína podría estar implicada en los distintos procesos de diferenciación y proliferación que tienen lugar en el ovario. Los resultados del análisis de la expresión de PHF10 en células de la granulosa muestran que el patrón de expresión de esta proteína está compuesto por numerosas bandas, en concreto 7. El hecho de que existan más bandas que isoformas es algo que se ha reportado en otros estudios (Brechalov, Georgieva y Soshnikova, 2014; Sheynov et al., 2019; Tatarskiy et al., 2017) y es debido a las numerosas modificaciones postraduccionales que presenta esta proteína, mayormente fosforilaciones. Además, también se ha propuesto que la presencia de estas modificaciones postraduccionales implica un cambio en el peso molecular de las diferentes isoformas. De esta manera, en la bibliografía, las bandas correspondientes a PHF10 se encuentran entre los 55 y 80 kDa aproximadamente, y no entre 37 y 56 como indicarían los datos teóricos.

En este estudio, de las 7 bandas en las que se expresa PHF10, 4 de ellas se encuentran entre los 55 y 80 kDa: las bandas 1, 2, 3 y 4. Estas cuatro bandas podrían corresponderse a las cuatro isoformas de PHF10 (PHF10-Pl, PHF10-Sl, PHF10-Ps y PHF10-Ss respectivamente), aunque para una mejor identificación sería necesario el uso de anticuerpos específicos para detectar cada isoforma por separado. En cuanto a la banda 5, que se encuentra muy cercana a los 55 kDa, también podría corresponderse a la isoforma PHF10-Ss sin fosforilaciones, aunque de nuevo haría falta una identificación más precisa. Revisando la bibliografía, no se han encontrado bandas de pesos moleculares inferiores a 50 kDa en los Western-Blot realizados para identificar PHF10. Sin embargo, en este estudio se han encontrado las bandas 6 y 7, con unos pesos moleculares de 40 y 35 kDa aproximadamente. Estos se asemejan bastante a los pesos moleculares teóricos de las isoformas PHF10-Ps y PHF10-Ss, por lo que una posible explicación sería que estas bandas se corresponden a dichas isoformas, las cuales carecerían totalmente de modificaciones postraduccionales. Sería interesante el estudio a profundidad de estas últimas bandas ya que no se han descrito en anteriores estudios, y de esta manera poder analizar correctamente las diferencias encontradas en su expresión entre los distintos grupos y determinar si podría tener un sentido biológico.

Uno de los resultados más interesantes es la expresión diferencial de PHF10 en las células de la granulosa entre los distintos grupos de pacientes analizados. La expresión de PHF10 en el grupo de Donantes es considerada como la expresión normal de PHF10 en las células de la granulosa, y en base a la correspondencia entre bandas e isoformas que hemos establecido, estas solo expresan las isoformas PHF10-SI y PHF10-Ps, además de las bandas 5, 6 y 7. En cuanto al grupo NOF, cabría esperar una expresión similar a las donantes, como ocurre con la isoforma PHF10-Ps. Sin embargo, al contrario que las donantes, estas expresan la variante corta de la isoforma S en lugar de la larga, además de presentar también diferencias en las bandas 5 y 7.

El grupo de mujeres mayores de 40 años presenta una cantidad elevada de las isoformas PHF10-SI y PHF10-Ps respecto a las donantes. Se ha demostrado que el estrés oxidativo asociado a la edad que sufre el ovocito provoca irregularidades en la degradación de proteínas, como por ejemplo la disminución de la actividad del proteosoma (Sasaki et al., 2019). Esto podría causar anomalías en la degradación de los complejos PBAF, de manera que la elevada cantidad de estas isoformas puede deberse a una acumulación de complejos por la deficiencia en su degradación. Además, a diferencia del grupo control, expresan PHF10-PI y PHF10-Ss, pero en una cantidad relativamente baja en relación con el resto de los grupos que las expresan. Quizás una pequeña cantidad de la isoforma PHF10-Ss no conlleva ningún problema, ya que el grupo NOF también presenta una cantidad similar de esta isoforma. En cuanto a las bandas 5, 6 y 7, las dos primeras tienen una cantidad similar de proteína a las donantes, mientras que en la 7 es algo menor.

En el grupo de pacientes con baja respuesta ovárica también encontramos las 4 isoformas. PHF10-SI y PHF10-Ps se encuentran en una cantidad muy elevada con respecto a las donantes, siendo el grupo PR el que presenta una mayor expresión de la isoforma Ps. Además, presenta la isoforma PHF10-PI en una cantidad media y PHF10-Ss en una gran cantidad, siendo también el grupo con mayor expresión de esta isoforma. La sobreexpresión de todas las isoformas podría estar relacionada con las ineficiencias en el desarrollo folicular y la baja reserva ovárica que suele encontrarse ligada a la baja respuesta ovárica (Estrada, 2014), ya sea como una posible causa o consecuencia, por lo que habría que profundizar más en ello. Las bandas 6 y 7 presentan una cantidad de proteína similar al grupo control, mientras que la banda 5 presenta una cantidad menor de proteína en relación al grupo control.

Al igual que en los dos grupos anteriores, en las mujeres con endometriosis se han hallado las cuatro isoformas. Presentan una cantidad semejante de PHF10-Ps a las donantes y al grupo

NOF, pero la isoforma PGF10-SI se encuentra en mayor cantidad, aunque no tanta como en los grupos PCOS, >40 y PR. La sobreexpresión de esta isoforma puede ser debida a los bajos niveles o falta de ARD1 en mujeres con endometriosis (Wang, Nicholes y Shih, 2020), que probablemente dificulta la función de los complejos PBAF y por tanto hay una mayor cantidad para compensar esta carencia. Además, al contrario que las donantes, presenta PHF10-PI y PHF10-Ss, aunque de nuevo, no en tanta cantidad como otros grupos. La presencia de estas isoformas puede estar afectando a la regulación de la transcripción en las células de la granulosa, alterando el ambiente folicular y por tanto la calidad del gameto. En cuanto al resto de bandas, presenta una expresión mucho menor en la banda 5, en la banda 6 no hay apenas diferencias con el grupo control, y la banda 7 no está presente.

Por otro lado, las mujeres con PCOS destacan por ser el grupo con una mayor expresión de la isoforma PHF10-PI, la cual no se encuentra en las donantes, además de tener una expresión de PHF10-Ps elevada. Se conoce que la sobreexpresión de las isoformas P provoca un aumento de las divisiones celulares, por lo que la elevada cantidad de estas isoformas en las células de la granulosa podría ser el motivo de la sobrerregulación de la proliferación que se ha encontrado en estas células en mujeres con PCOS (Tu et al., 2019). Además, también presenta una cantidad de PHF10-SI mucho mayor que en las donantes, lo que también puede tener relación con las anomalías del desarrollo folicular que se dan en estas mujeres, como el aumento en el número de folículos que se desarrollan o su disminuido tamaño (Dumesic y Abbott, 2008; Patel, 2018). En cuanto al resto de bandas, no se observó la banda 7, la 5 presenta una cantidad de proteína similar al grupo control, y destaca la banda 6, ya que el grupo PCOS presenta hasta 10 veces más proteína que las donantes.

En general, se observa que la presencia de las isoformas PHF10-PI y PHF10-Ss, las cuales no aparecen en el grupo control, así como la sobreexpresión o infraexpresión de PHF10-Ps y PHF10-SI, podrían estar asociadas a problemas en el correcto funcionamiento de las células de la granulosa. Estos problemas podrían estar provocando irregularidades en el desarrollo folicular, alterando la maduración del ovocito y en consecuencia generando problemas de fertilidad. Considerando que el grupo NOF no presenta este tipo de problemas, podríamos especular que la ausencia de la isoforma PHF10-SI o una mayor expresión de PHF10-Ss no tienen un efecto a considerar, por lo que puede ser que los problemas subyacentes a los trastornos estudiados estén más relacionados con las diferencias de expresión en las isoformas P que las S, ya que son las primeras las que tienen la capacidad de alterar la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular.

Los resultados obtenidos deben de tomarse como preliminares, ya que este estudio ha contado con diferentes limitaciones, como la escasez de muestras de algunos de los diagnósticos estudiados. Sería conveniente para futuras investigaciones el aumento del tamaño muestral, con el fin de poder realizar análisis estadísticos y obtener unos resultados más precisos y fiables. En cuanto a la metodología empleada, también se podrían aplicar ciertas mejoras, como el uso de fosfatasa para reducir el número de bandas a cuatro y así facilitar el análisis y la comprensión de los resultados.

En este estudio se ha comprobado la existencia de una expresión diferencial de la proteína PHF10 en las células de la granulosa de los diferentes grupos estudiados, lo cual abre la posibilidad de desarrollar en un futuro una técnica basada en el estudio de PHF10 que permita determinar de forma sencilla el estado fisiológico del ovocito, con sus consecuentes beneficios en los tratamientos de reproducción asistida. Para este fin, se requiere de más estudios que permitan verificar los resultados obtenidos de forma estadística, así como profundizar en la relación entre estas diferencias de expresión y las diferentes enfermedades y trastornos estudiados.

7. Conclusiones

- i. El patrón de expresión de la proteína PHF10 en células de la granulosa humana es diferente para los distintos grupos de mujeres analizados.
- ii. Los grupos estudiados con trastornos de fertilidad (>40, PR, Endometriosis y PCOS) presentan la isoforma PHF10-P1 en parte de sus complejos PBAF, en contraposición al grupo control que no expresa esta isoforma.
- iii. Los grupos >40, Endometriosis y PR presentan la isoforma PHF10-Ss al contrario que el grupo control, aunque también está presente en las mujeres sin afectación ovárica.
- iv. En todos los grupos estudiados con trastornos de fertilidad se encontró una sobreexpresión o infraexpresión de las isoformas PHF10-Ps y PHF10-Sl con respecto al grupo control.
- v. Se requiere de más estudios para verificar si el análisis de la expresión de PHF10 en las células de la granulosa humana puede aportar información sobre el estado fisiológico del ovocito, aunque los resultados obtenidos apuntan a que puede ser un método prometedor.

Conclusions

- i. The expression pattern of PHF10 protein in human granulosa cells is dissimilar for the different groups of women analysed.
- ii. The groups studied with fertility disorders (>40, PR, Endometriosis and PCOS) present the PHF10-PI isoform in part of their PBAF complexes, in contrast to the control group that does not express this isoform.
- iii. The >40, Endometriosis and PR groups have the PHF10-Ss isoform in contrast to the control group, although it is also present in women without ovarian involvement.
- iv. In all the groups studied with fertility disorders, an overexpression or underexpression of the PHF10-Ps and PHF10-Sl isoforms was found with respect to the control group.
- v. Further studies are needed to verify whether the analysis of PHF10 expression in human granulosa cells can provide information on the physiological status of the oocyte, although the results obtained suggest that it may be a promising method.

8. Bibliografía

- Araya, N. M. U. (2019). Actualización en los puntos clave de la endometriosis. *Revista Médica Sinergia*, 4(05), 35-43.
- Baena, V., & Terasaki, M. (2019). Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13.
- Brechalov, A. V., Georgieva, S. G., & Soshnikova, N. V. (2014). Mammalian cells contain two functionally distinct PBAF complexes incorporating different isoforms of PHF10 signature subunit. *Cell Cycle*, 13(12), 1970-1979.
- Chugunov, A. O., Potapova, N. A., Klimenko, N. S., Tatarskiy, V. V., Georgieva, S. G., & Soshnikova, N. V. (2021). Conserved Structure and Evolution of DPF Domain of PHF10—The Specific Subunit of PBAF Chromatin Remodeling Complex. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 11134.
- Cimadomo, D., Fabozzi, G., Vaiarelli, A., Ubaldi, N., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2018). Impact of maternal age on oocyte and embryo competence. *Frontiers in endocrinology*, 9, 327.
- De Tomasi, J. B., Crespo, A. A., & Crespo, A. F. (2012). Desarrollo folicular en el ovario. *Rev Sal Quintana Roo*, 5, 12-18.
- Del Campo-Audelo, M., Barros-Delgadillo, J.C., Muñoz-Manrique, C. (2022). Respuesta ovárica y tasa de nacido vivo en pacientes con cuenta folicular antral y hormona antimülleriana alteradas en ciclos de reproducción asistida. *Ginecología y Obstetricia de México*, 90(02), 119-133.
- Dumesic, D. A., & Abbott, D. H. (2008). Implications of polycystic ovary syndrome on oocyte development. *Seminars in reproductive medicine* Vol. 26, No. 01, pp. 053-061
- Estrada, M. M. (2014). Modulación de expresión génica y proteica de los receptores de FSH y de andrógenos en las células foliculares en pacientes con baja respuesta ovárica debida a la preparación folicular (Tesis Doctoral, Universidad de Valencia).
- Falcone, T., & Flyckt, R. (2018). Clinical management of endometriosis. *Obstetrics & Gynecology*, 131(3), 557-571.
- García, D., Brazal, S., Rodríguez, A., Prat, A., & Vassena, R. (2018). Knowledge of age-related fertility decline in women: a systematic review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 230, 109-118.
- Garrido, N., Navarro, J., Remohí, J., Simón, C., & Pellicer, A. (2000). Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Human reproduction update*, 6(1), 67-74.
- Hurtado de Mendoza, M., Cuadros, J., Arroyo, G., Ten, J., Pons, M., Prados, F., ... & De los Santos, M. (2015). Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Cuadernos de Embriología Clínica.
- Jiménez, M. R., & Aguilá, N. C. (2017). El ciclo menstrual y sus alteraciones. *Pediatría Integral*, 304.
- Kidder, G. M., & Vanderhyden, B. C. (2010). Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 88(4), 399-413.
- Krasteva, V., Crabtree, G. R., & Lessard, J. A. (2017). The BAF45a/PHF10 subunit of SWI/SNF-like chromatin remodeling complexes is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *Experimental Hematology*, 48, 58-71.
- Li, R., & Albertini, D. F. (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(3), 141-152.
- Martín, R. M. (2014). Estudio de expresión de la familia génica sirtuínas en células de la granulosa humana, y su relación con la calidad oocitaria en técnicas de fecundación in vitro. (TFG, Universidad de La Laguna)

- Morin, S. J., Patounakis, G., Juneau, C. R., Neal, S. A., Scott Jr, R. T., & Seli, E. J. H. R. (2018). Diminished ovarian reserve and poor response to stimulation in patients < 38 years old: a quantitative but not qualitative reduction in performance. *Human Reproduction*, 33(8), 1489-1498.
- Notaro, A. L. G., & Neto, F. T. L. (2022). The use of metformin in women with polycystic ovary syndrome: an updated review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1-7.
- Patel, S. (2018). Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 182, 27-36.
- Peigné, M., & Epelboin, S. (2018). Reproducción asistida. EMC-Tratado de Medicina, 22(4), 1-11.
- Pombo, M., Audí, L., Bueno, M., Calzada, R., Cassorla, F., Diéguez, C., ... & Tojo, R. (2010). Gónadas: regulación de la biosíntesis esteroidea y de la gametogénesis. Métodos de exploración. *Tratado de endocrinología pediátrica*.
- Richani, D., Dunning, K. R., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2021). Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. *Human reproduction update*, 27(1), 27-47.
- Rodríguez, P. (2021). Estudio de la expresión de PHF10 en células de la granulosa humana. (TFG, Universidad de La Laguna)
- Ruijtenberg, S., & van den Heuvel, S. (2016). Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell cycle*, 15(2), 196-212.
- Russell, D. L., Gilchrist, R. B., Brown, H. M., & Thompson, J. G. (2016). Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: old hands and new players?. *Theriogenology*, 86(1), 62-68.
- Sasaki, H., Hamatani, T., Kamijo, S., Iwai, M., Kobanawa, M., Ogawa, S., ... & Tanaka, M. (2019). Impact of oxidative stress on age-associated decline in oocyte developmental competence. *Frontiers in endocrinology*, 10, 811.
- Sheynov, A. A., Tatarskiy, V. V., Azieva, A. M., Georgieva, S. G., & Soshnikova, N. V. (2019). Different functions of PHF10 isoforms-subunits of the PBAF chromatin remodeling complex. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 23(2), 184-189
- Sheynov, A. A., Tatarskiy Jr, V. V., Tatarskiy, E. V., Nabirochkina, E. N., Georgieva, S. G., & Soshnikova, N. V. (2020). The sequential phosphorylation of PHF10 subunit of the PBAF chromatin-remodeling complex determines different properties of the PHF10 isoforms. *Biology Open*, 9(1)
- Sutcliffe, A. G., & Ludwig, M. (2007). Outcome of assisted reproduction. *The Lancet*, 370(9584), 351-359.
- Tatarskiy, V. V., Simonov, Y. P., Shcherbinin, D. S., Brechalov, A. V., Georgieva, S. G., & Soshnikova, N. V. (2017). Stability of the PHF10 subunit of PBAF signature module is regulated by phosphorylation: role of β -TrCP. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Tresguerres, J. A. F., Ariznavarreta, C., Cachafeiro, V., Cardinali, D., Estriche, E.E., Gil-Loyzaga, P., ... & Menéndez, J.T. (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. *Fisiología humana*, 1007-1023.
- Tu, J., Cheung, A. H. H., Chan, C. L. K., & Chan, W. Y. (2019). The role of microRNAs in ovarian granulosa cells in health and disease. *Frontiers in endocrinology*, 10, 174.
- Vantman, B. D., & Vega, B. M. (2010). Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Revista médica clínica las condes*, 21(3), 348-362.
- Wang, Y., Nicholes, K., & Shih, I. M. (2020). The origin and pathogenesis of endometriosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, 71-95.
- Zhang, Y., Zhang, C., Shu, J., Guo, J., Chang, H. M., Leung, P. C., ... & Huang, H. (2020). Adjuvant treatment strategies in ovarian stimulation for poor responders undergoing IVF: a systematic review and network meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 26(2), 247-263.