

Máster Universitario en Biomedicina:

Identification of genes expressed in granulosa cells that can be used as markers of optimal human oocyte development.

Identificación de genes expresados en células de la granulosa que puedan utilizarse como marcadores de desarrollo oocitario óptimo en humanos

Memoria de Trabajo de Fin de Máster.

Alba Davinia Peraza Delgado
(alu0100976311@ull.edu.es)

Tutorizado por:

Julio T. Ávila Marrero
(javila@ull.edu.es)

Rebeca González Fernández
(refernan@ull.edu.es)

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética
Biología del desarrollo (LBD)

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

S/C de Tenerife, fecha 8 de junio de 2022

Dr. Julio T. Ávila Marrero, coordinador del Grupo de Investigación Biología del Desarrollo y
Dra Rebeca González Fernández adscritos a la Titulación Máster en Biomedicina por la ULL.

CERTIFICAN

- Que el Trabajo Fin de Máster (TFM) titulado Identificación de genes expresados en células de la granulosa que puedan utilizarse como marcadores de desarrollo oocitario óptimo en humanos ha sido realizado bajo nuestra supervisión por D^a Alba Davinia Peraza Delgado, matriculada en el Máster en Biomedicina, durante el cursoacadémico 2021/2022.
- Que una vez revisada la memoria final del TFM, damos nuestro consentimiento para ser presentado a la evaluación (lectura y defensa) por el Tribunal designado por la Comisión Académica de la Titulación.
- Que se ha indicado expresamente, a través del mecanismo de entrega de lamemoria TFM por sede electrónica ULL, el deseo de hacer público o no los resultados del TFM.

Para que conste, se firma el presente certificado en La Laguna a 7 de Junio de 2022

Dr. Julio T. Avila Marrero

Dra. Rebeca González Fernández

Escuela de Doctorado y Estudios de Posgrado. Edificio
Central. Campus Central. 38071 La Laguna.

C/ Delgado Barreto S/N. Tfno. (00 34)
922 31 9000
<http://www.esuelas.ull.es/view/centros/escueladoctorado/Inicio>

master@ull.es

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 4471243

Código de verificación: gP0WfbQh

Firmado por: Julio Tomás Ávila Marrero
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 07/06/2022 09:28:31

Rebeca González Fernández
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

07/06/2022 13:44:07

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

IL-1 β : Interleuquina-1 β .

IL6: Interleuquina-6.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α .

NF- κ B: Factor nuclear kappaB.

qRT-PCR: PCR a tiempo real semi-cuantitativa.

hGC: Células de granulosa humana

NOF: No ovarian factor

PR: Poor ovarian reserve

≥ 40 : Mayor / igual de 40 años.

FSH: Hormona foliculoestimulante.

LH: Hormona luteinizante.

E2: Estradiol.

FIVAP: Centro de Fecundación In Vitro Ángela Palumbo.

ESHRE: Sociedad Europea de reproducción Humana y Embriología.

ARN: Ácido ribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

SE: Error estándar.

FIV: Fecundación in vitro.

Índice

1. Abstract.....	pág. 1
2. Resumen	pág. 2
3. Introducción.....	pág. 3-7
3.1 Citoquinas	pág. 5-6
3.2 Factores relacionados con la infertilidad femenina	pág. 6-7
4. Hipótesis y objetivos.....	pág. 8
5. Material y métodos.....	pág. 9-12
5.1 Pacientes.....	pág. 9
5.2 Purificación de células de la granulosa humana a partir de líquido folicular.	pág. 10
5.3 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)	pág. 11
5.4 PCR a tiempo real semi-cuantitativa (qRT-PCR)	pág.11-12
5.5 Determinación de la expresión relativa de cada gen.	pág.12
5.6 Análisis estadístico.....	pág. 12
6. Resultados	pág. 13-17
6.1 Estadísticas descriptivas y variables clínicas.....	pág. 13
6.2 Expresión de los genes.....	pág. 14
6.3 Correlación de la expresión de los genes IL-1 β , IL6, TNF- α y NF- κ B en los grupos NOF, PR y ≥ 40 y su correlación con los diferentes parámetros clínicos.	pág. 15-17
7. Discusión	pág. 18-21
8. Conclusiones	pág. 22
9. Bibliografía.....	pág. 23-29

1. Abstract:

Cytokines such as IL-1 β , IL6, TNF- α and NF- κ B act as intra-ovarian regulators of folliculogenesis, ovulation and function of the corpus luteum, allowing the quality and viability of oocytes to be determined. We studied gene expression by qRT-PCR in hGC from different groups: NOF (control group), PR and ≥ 40 years. Significant expression levels of IL-1 β , IL6 and TNF- α were found in ≥ 40 years and no significant differences were found between NOF and PR, except for IL6. NF- κ B did not obtain significant differences between any of the groups. These suggest that they may have a physiological roll in follicular development, especially in women ≥ 40 years.

Key words: Granulosa cells, cytokines, follicular development, poor responders, infertility diagnosis.

2. Resumen:

Citoquinas como IL-1 β , IL6, TNF- α y NF- κ B actúan como reguladores intraováricos de la foliculogénesis, ovulación y función del cuerpo lúteo, permitiendo determinar la calidad y viabilidad de los ovocitos. Estudiamos la expresión génica mediante qRT-PCR en hGC de distintos grupos: NOF (grupo control), PR y ≥ 40 años. Se encontraron niveles de expresión significativos de IL-1 β , IL6 y TNF- α en ≥ 40 años y entre NOF y PR no se obtuvieron diferencias significativas, exceptuando en la IL6. NF- κ B no obtuvo diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Estos datos sugieren que podrían tener un papel fisiológico en el desarrollo folicular, especialmente en mujeres ≥ 40 años.

Palabras claves: Células de la granulosa, citoquinas, desarrollo folicular, baja respuesta ovárica, diagnóstico de infertilidad.

3. Introducción

En 1932, Carl Hartman desarrolló por primera vez un informe relacionado con el proceso de ovulación, donde propuso que el ciclo sexual femenino ocurría en dos fases: folicular y lútea¹. Tal y como se observa en la figura 1.

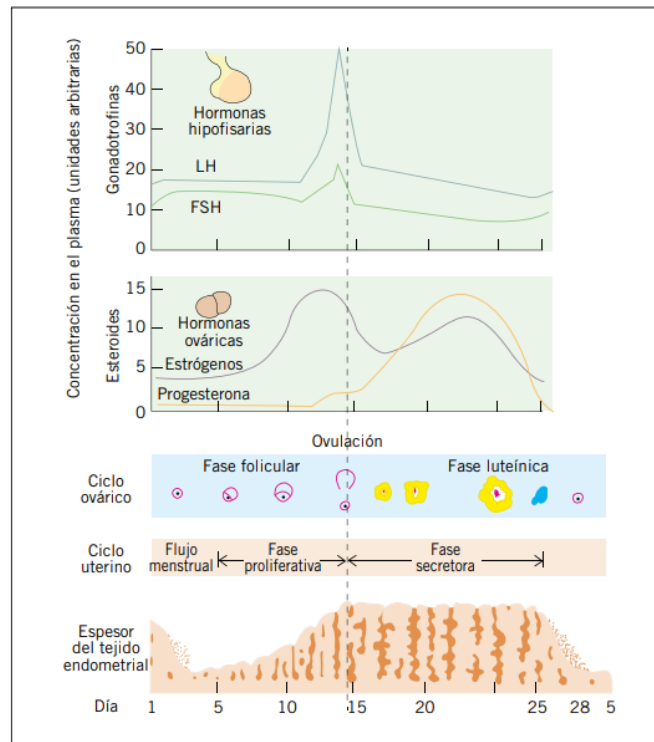


Fig.1 Ciclo menstrual de la mujer. Representación gráfica de los niveles hormonales durante el ciclo ovárico, dividido en tres fases: fase folicular, ovulación y fase lútea².

En la fase folicular se produce el desprendimiento del endometrio debido a los bajos niveles de estrógenos y progesterona³. Aquí, el nivel de la hormona foliculoestimulante (FSH) aumenta ligeramente y estimula los folículos de los ovarios^{3,4}. A medida que van disminuyendo los niveles de FSH, solo un folículo sigue su desarrollo, produciendo estrógenos^{2,4}. A continuación, se produce la fase ovulatoria que se inicia con un aumento de los niveles de la hormona luteinizante (LH) y FSH^{2,3}.

La LH estimula la ovulación que suele ocurrir sobre las 32-36 horas². Luego, el nivel de estrógenos llega a su punto máximo y el nivel de progesterona comienza a elevarse para dar lugar a la siguiente fase, denominada fase lútea, donde disminuyen las concentraciones de ambas hormonas³. El folículo roto se cierra después de liberar el óvulo y forma el cuerpo lúteo, que produce progesterona^{3,5}. Durante la mayor parte de esta fase la concentración de estrógenos es alta³. La progesterona y los estrógenos provocan un mayor engrosamiento del endometrio, que se prepara para una posible fertilización^{3,5,6}. Sin embargo, si no existe fertilización, se produce la degeneración del cuerpo lúteo y deja de producir progesterona, el nivel de estrógenos disminuye, se descomponen y desprenden las capas superiores del revestimiento y ocurre la menstruación (el inicio de un nuevo ciclo menstrual)^{4,5,6}.

El proceso de crecimiento del folículo y su pasaje a través de los distintos estadios de desarrollo se denomina foliculogénesis⁷. Cada una de sus etapas está caracterizada por la existencia de una comunicación entre el ovocito y las capas de las células de la granulosa y de la teca, mediada por una amplia gama de hormonas y citoquinas^{7,8,9}.

Por tanto, la participación de las citoquinas es fundamental para el correcto desarrollo de todas las etapas de la foliculogénesis, desde el reclutamiento folicular primordial hasta la ovulación y la luteinización⁹. En consecuencia, las citoquinas, cumplen un papel primordial en la determinación de la calidad y viabilidad de los ovocitos, y por consiguiente del éxito reproductivo^{10,11}.

En el ovario, las citoquinas son secretadas por células del sistema inmune que se encuentran en el estroma, por las células somáticas, incluyendo las de la granulosa y de la teca, y por el ovocito^{10,12}. Entre ellas, destacan: la interleuquina-1 β (IL-1 β)¹³, la interleuquina-6 (IL6)¹³, factor nuclear kappaB (NF- κ B)¹⁴ y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)¹³.

3.1 Citoquinas:

La IL-1 β , durante la foliculogénesis promueve la proliferación y suprime la diferenciación, mientras que, durante el proceso ovulatorio, aumenta la producción local de eicosanoides, esteroides, metaloproteasas y sustancias vasoactivas para promover la ovulación^{11,15}. Además, existe evidencia del rol de IL-1 β en la estimulación de células ováricas, supresión de la apoptosis y en el crecimiento folicular¹⁵. Asimismo, algunos estudios reflejan que la IL-1 β puede estar implicada en la inhibición de la producción de estradiol (E2)¹³.

La IL6 es producida por las células de la granulosa en los folículos preovulatorios y representa un enlace fisiológico entre el sistema endocrino e inmunológico durante la ovulación, actuando como modulador de la función ovárica¹⁶. Además, se encarga de inhibir la secreción de progesterona y estrógenos y tiene una función antiinflamatoria porque inhibe la IL-1 β y la síntesis de TNF- α e induce la producción o liberación de sus respectivos antagonistas^{10,11}.

TNF- α puede ser considerado un modulador paracrino del desarrollo folicular y puede estar implicada en la alteración de las funciones ováricas durante los procesos patológicos¹⁷. Además, inhibe la producción de E2 inducida por FSH en células de la granulosa y también inhibe la producción de androstenediona estimulada por LH en las células de la teca^{11,17}. Diversos estudios han sugerido que TNF- α participa en la regulación de la función de las células foliculares y, por consiguiente, en la ovulación^{11,17,18}.

Por otro lado, el NF- κ B regula distintos procesos biológicos como el crecimiento y la supervivencia celular, el desarrollo de tejidos y órganos, la inflamación y la respuesta inmune innata y, además, estimula la expresión de citoquinas, receptores de citoquinas y genes de histocompatibilidad^{14,19}.

En base a lo anteriormente descrito, las alteraciones en el proceso inflamatorio asociado a la ovulación y su regulación, podrían estar implicados en algunas alteraciones del desarrollo folicular.

3.2 Factores relacionados con la infertilidad femenina

En España más de 55.000 parejas al año recurren a técnicas de fertilización in vitro como medida terapéutica²⁰. Sin embargo, antes de realizar este tipo de técnicas se debe tener en cuenta una serie de factores como por ejemplo la edad.

A diferencia de los hombres, las mujeres nacen con una determinada reserva ovárica²¹. Esta reserva ovárica va disminuyendo a medida que ocurren los ciclos menstruales (aproximadamente 300 y 400 óvulos durante la vida reproductiva de la mujer)^{21,22,23}, tal y como se muestra en la figura 2.

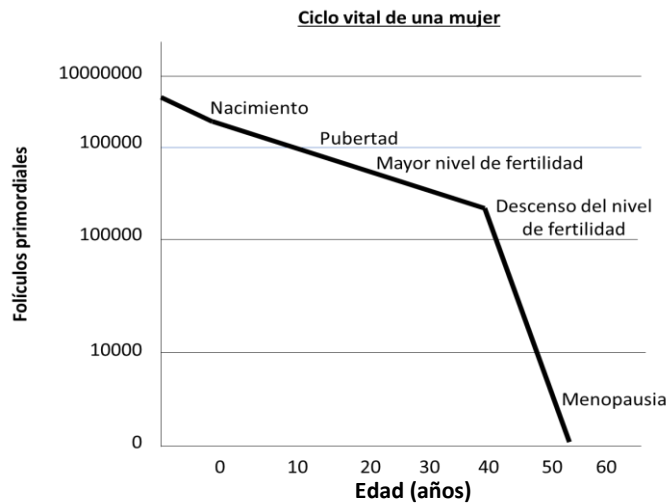


Figura 2. Representación gráfica del número de folículos a lo largo de las distintas etapas del ciclo vital de una mujer. En la figura podemos observar como a medida que avanza la edad disminuye el número de folículos de manera paulatina produciéndose un descenso drástico a partir de los 40 años hasta alcanzar la menopausia²².

En relación con la gráfica se puede observar como la edad es una de las principales causas por la que disminuye la reserva ovárica en la mujer, y por tanto está estrechamente relacionada con los problemas de infertilidad. Además de la edad, existen otras patologías que pueden afectar a la fertilidad. Algunas de ellas, como la baja permeabilidad de las trompas de Falopio, no están relacionadas con fallos ováricos (NOF)²⁴. Otras, como la baja respuesta ovárica (PR)²⁵, supone un decrecimiento en la reserva folicular y un envejecimiento prematuro que ocasiona una mala calidad ovocitaria, presentando una incidencia en torno al 7 y el 24 %²⁶. Este porcentaje aumenta si la edad de la mujer es más de 40 años²⁷.

Dada su importancia en el desarrollo folicular, en este estudio se pretende determinar el nivel de expresión de las citoquinas IL-1 β , IL6, NF- κ B y TNF- α en células de la granulosa humanas, con el fin de identificar alteraciones asociadas a los diagnósticos de infertilidad estudiados.

4. Objetivos:

El crecimiento folicular está regulado por interacciones entre las células del ovocito y las células de la granulosa y del cúmulo que lo rodean e interaccionan con él, interviniendo en el desarrollo de la respuesta ovárica. El objetivo general de este trabajo es la determinación del nivel de expresión de genes implicados en inflamación metabólica y su posible relación con el desarrollo folicular óptimo en células de la granulosa.

Para ello, se abordarán como objetivos específicos los siguientes:

1. Determinar la expresión de los genes marcadores inflamatorios, IL-1 β , IL6, TNF- α y NF- κ B, en células de la granulosa humanas de pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida.
2. Analizar y comparar el patrón de expresión de los genes estudiados en célula de granulosa de pacientes con distinto diagnóstico de infertilidad (NOF, PR y ≥ 40 años)
3. Identificar diferencias de expresión de los genes estudiados entre los distintos diagnósticos de infertilidad para tratar de establecer su papel en el desarrollo folicular óptimo en células de la granulosa.

5. Material y métodos

Se realizó un estudio caso-control, gracias a la contribución del Centro de Fecundación In Vitro Ángela Palumbo (FIVAP) y siguiendo el protocolo del Comité de Ética de la Universidad de La Laguna.

5.1 Pacientes.

Se emplearon células de la granulosa purificadas a partir del líquido folicular de 46 pacientes divididas en los siguientes grupos de diagnóstico:

- NOF (n: 17). Usado como control, este grupo incluye pacientes con edades comprendidas entre los 27 y los 39 años cuya causa de infertilidad no está asociada a patología ovárica (diagnóstico de infertilidad por factor masculino o tubárico).
- PR (n: 17). Pacientes entre 29 y 39 años diagnosticadas de baja respuesta según el criterio de la Sociedad Europea de reproducción Humana y Embriología (ESHRE)²⁵.
- ≥ 40 años (n: 12). Pacientes mayores de 40 años sin patologías ováricas cuya causa de infertilidad está asociada a su avanzada edad.

Los datos demográficos de las pacientes y las características clínicas más relevantes de estos grupos se muestran en la Tabla 1.

5.2 Purificación de células de la granulosa humana a partir de líquido folicular.

Las hGC (células de granulosa humana) fueron aisladas a partir del líquido folicular mediante separación por densidad. Se sometieron las muestras a varios lavados mediante sucesivas centrifugaciones de 1500 rpm durante 10 minutos, utilizando Isolatium Medium (10 % Medium 199 (Sigma); 3,7 g/L Bicarbonato sódico; 59 mg/L Penicilina; 0,1 g/L Estreptomicina; 5,6 mg/L Anfotericina B; 0,29 g/L LGlutamina; 1 % Albumina de suero bovino). Después se añadió un volumen de Percoll al 45 % (GE Healthcare), y se centrifugó 30 minutos a 1700 rpm, para separar los hematíes de los leucocitos y las células de la granulosa. Tras la centrifugación se recuperó la interfase y se resuspendió en Tampón Fosfato Salino (PBS) 1x 0,1 % BSA. Posteriormente, se eliminaron los leucocitos mediante la incubación con Dynabeads M-450 CD45 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los Dynabeads contienen un anticuerpo contra el antígeno CD45, expresado en todas las células sanguíneas con núcleo, por lo que los leucocitos quedan unidos a estas partículas de forma específica. Por último, se llevó a cabo el recuento de hGC viables obtenidas mediante tinción con Trypan Blue (Sigma), que sólo es capaz de atravesar la membrana porosa de las células muertas, y se realizó un conteo de las células de granulosa viables haciendo uso de una Cámara de Neubauer y un microscopio óptico (Olympus).

5.3 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc).

Se realizó la extracción de ARN a través del Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después se llevó a cabo la síntesis de ADNc a partir del ARN extraído, empleando el iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad).

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

El análisis de la expresión de los genes IL-1 β , IL6, TNF- α y NF- κ B se realizó mediante qRT-PCR ya que permite visualizar el proceso de amplificación en todo momento.

Usando el programa Omiga, se diseñaron los oligonucleótidos específicos para la secuencia de humanos de cada uno de los genes analizados. Además, se incluyó el gen β -actina como gen de referencia, al ser un gen constitutivo. (ver tabla 2)

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
IL-1 β	IL1 β -F	TGTACGATCACTGAAGTGC
	IL1 β -R	AAGGACATGGAGAACACC
IL6	IL6-F	CAGAAAACAACCTGAACC
	IL6-R	CTCAAACCTCCAAAAGACC
TNF-α	TNF- α -F	CTCAAACCTCCAAAAGACC
	TNF- α -R	TCAGTATGTGAGAGGAAGAGAACC
NF-κB	NF κ B1-F	ACCCCTGCATATAGCAGC
	NF κ B1-R	CATTTTCCCAAGAGTCATCC
β-Actina	ACT β -F	CTTCCTTCCTGGGCATGG
	ACT β -R	GCCGCCAGACAGCACTGT

Tabla 2: RT-PCR primers para los genes IL1 β , IL6, TNF- α , NF κ B y β -actina

Las reacciones se llevaron a cabo con el sistema CFX96 (BioRad Laboratories) usando 2x SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) y una concentración final de 0.4 μM de cada oligonucleótido. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos y 45 ciclos de PCR a 95 °C durante 5 segundos y 61 °C durante otros 5 segundos. Finalmente, se realizó la curva de disociación o curva de Melting para corroborar la amplificación de un producto único para cada pareja de cebadores, comprobándose la ausencia de señal fluorescente debida a contaminación por amplificaciones inespecíficas.

5.5. Determinación de la expresión relativa de cada gen.

Tras realizar la qRT-PCR, se empleó el método comparativo Cycle Threshold²⁸ (método comparativo CT) para determinar el ciclo umbral (CT) para cada gen. Este CT determina el ciclo en el que se está produciendo una amplificación exponencial y, por tanto, podemos determinar la expresión de cada uno de nuestros genes en relación con la expresión del gen de referencia según el método $2^{-\Delta\text{CT}}$. Los valores de expresión de los genes se expresan como 1×10^5 en relación con la expresión de β -actina.

5.6 Análisis estadístico

Una vez obtenidos los datos de las distintas muestras, se analizaron los resultados con el software SPSS 21. Se presentan las estadísticas descriptivas (media y error estándar (SE)). Se utilizó una prueba T para muestras independientes y un coeficiente de correlación de rangos de Pearson para evaluar la relación entre las variables continuas. Se eligió un α de 0,05 para el experimento.

6. Resultados

Para determinar la relación entre los genes estudiados y los distintos tipos de patologías, se determinó su expresión en los grupos descritos anteriormente.

6.1 Estadísticas descriptivas y variables clínicas

Se observaron diferencias significativas entre la distribución de la edad del grupo ≥ 40 con el resto de los grupos ($p \leq 0.05$), pero no existieron diferencias de edad entre NOF y PR (ver tabla 1).

Parámetros clínicos	NOF	PR	≥ 40
N de pacientes	17	17	12
Edad	34 \pm 0.90	36 \pm 1.10	40.6 \pm 0.26
Días	11 \pm 0.37	11 \pm 0.47	13 \pm 0.60
FSH	3705.15 \pm 486.02	6250 \pm 424.78*	6406 \pm 569.86 *
LH	1407.35 \pm 206.95	3048.89 \pm 292.22 *	3043.75 \pm 348.43*
E2	3522.94 \pm 432.12	2009.33 \pm 175.62	2466.17 \pm 209.95
Ovocitos	17.24 \pm 2.25	6.67 \pm 0.77*	11.83 \pm 2.15
MII	13.82 \pm 1.72	4.89 \pm 0.68 *	10.25 \pm 1.95

*Tabla 1: Parámetros clínicos de los grupos diagnósticos. Medias \pm error típico de las variables analizadas. Con un * se marca aquellos valores que son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) del grupo control (NOF).*

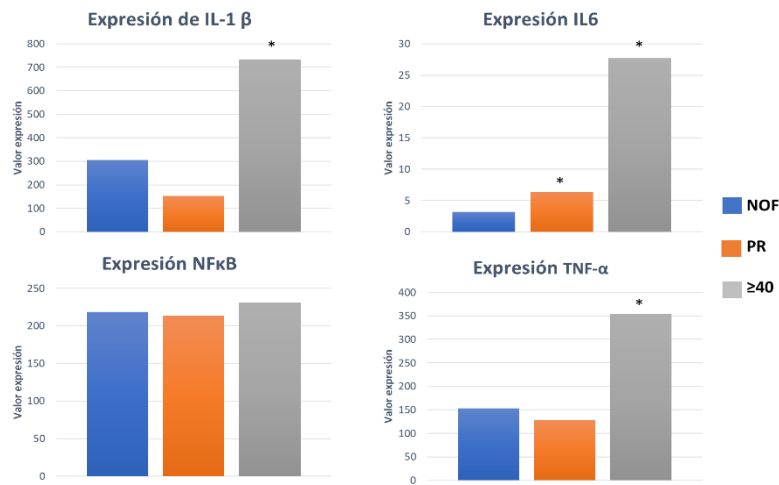
En relación con la cantidad de gonadotropinas administradas durante el tratamiento, el grupo NOF recibió dosis significativamente menores en comparación con PR y ≥ 40 ($p \leq 0.05$). El número de ovocitos totales y maduros recuperados varió entre los grupos, siendo menor en el grupo PR. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el valor medio del pico de E2 ni en los días que duró el tratamiento hormonal (Tabla 1).

6.2 Expresión de los genes

En cuanto a los valores de expresión de los genes analizados (tabla 3, fig.3) podemos observar que la expresión de IL-1 β , IL6 y TNF- α en ≥ 40 fue significativamente mayor que en NOF y PR. Entre los grupos NOF y PR no existen diferencias significativas en la expresión de los genes analizados, excepto en la IL6 en la que encontramos una expresión significativamente mayor. No existen diferencias significativas en la expresión de NF- κ B entre ninguno de los grupos estudiados.

Genes	NOF	PR	≥ 40
IL-1 β	305.22 \pm 69.52	152.69 \pm 35.69	733.76 \pm 163 *
IL6	3.2 \pm 0.76	6.38 \pm 1.42*	27.7 \pm 7.74 *
NF-κB	218.38 \pm 47.13	213.92 \pm 34.95	231.44 \pm 39.37
TNF-α	153.61 \pm 49.85	128.35 \pm 25.17	355.05 \pm 77.10 *

Tabla 3: *Expresión de los genes de estudio en los distintos diagnósticos. Medias \pm error típico de la expresión de IL-1 β , IL6, NF- κ B y TNF- α en los distintos grupos diagnósticos (NOF, PR y ≥ 40). Los valores se muestran como expresión relativa a actina $\times 10^5$. Con un * se marca aquellos valores que muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) con el grupo control NOF.*



*Fig.3 Representación gráfica de los valores de expresión de los genes analizados en los distintos grupos diagnósticos. Con un * se marca aquellos valores que son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) al grupo control NOF.*

6.3 Correlación de la expresión de los genes IL-1 β, IL6, TNF-α y NF-κB en los grupos NOF, PR y ≥ 40 y su correlación con los diferentes parámetros clínicos.

Al analizar la correlación de la expresión de los distintos genes encontramos una correlación positiva entre IL6 - TNF-α en NOF (Fig. 4A), mientras que en ≥ 40 dicha correlación se pierde y aparece una correlación positiva entre IL-1 β e IL6 (Fig. 4B). En PR se muestra una correlación positiva entre IL-1 β con TNF-α e IL6 (Fig. 4C y 4D, respectivamente).

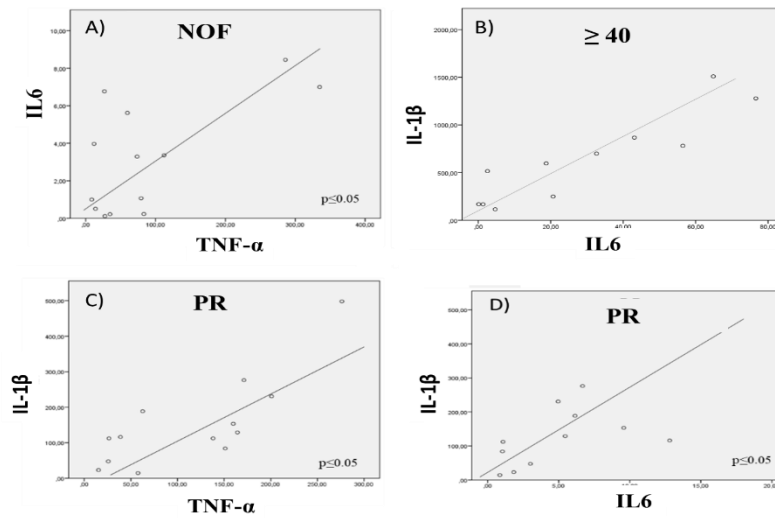


Fig.4 Gráfica de dispersión por puntos de la Correlación entre los genes estudiados. En la gráfica se muestran las correlaciones existentes en la expresión de los distintos genes. Se pueden observar las correlaciones estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre la expresión de los genes $IL-1 \beta$, $IL6$, $NF-\kappa B$ y $TNF-\alpha$ en los distintos grupos diagnósticos.

En cuanto a la correlación entre los genes estudiados y los parámetros clínicos observamos que en NOF existe una correlación positiva entre la expresión de $TNF-\alpha$, el nivel de estradiol y el número de ovocitos recuperados (Fig. 5A, 5B), mientras que en PR son la $IL-1 \beta$ y la $IL6$ las que se correlacionan con el número de ovocitos (Fig. 5C, 5D). En pacientes mayores de 40 años no existe ninguna correlación entre los genes estudiados y los parámetros clínicos.

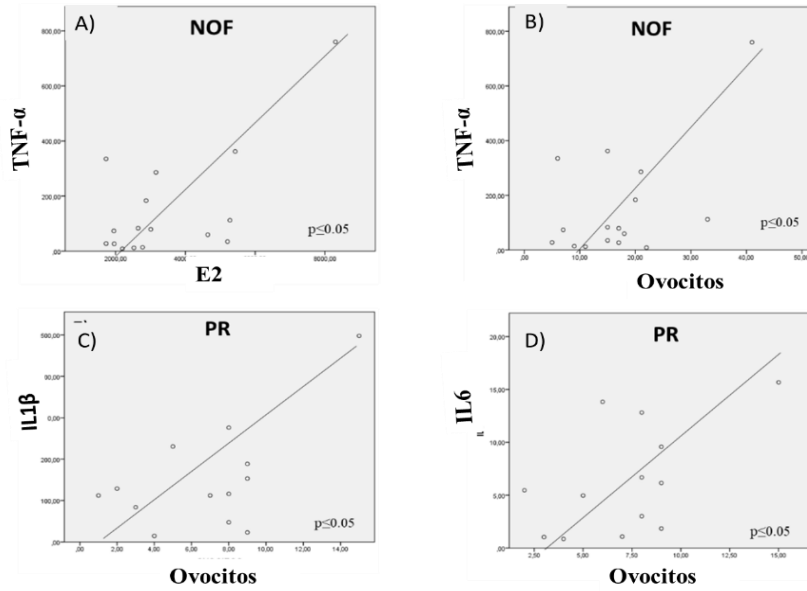


Fig.5 Representación gráfica de las Correlaciones entre la expresión de los genes y los parámetros clínicos analizados en los diferentes grupos.

7. Discusión

Según los estudios epidemiológicos, un 15 % de la población en edad reproductiva es estéril, es decir, una de cada seis parejas se ve obligada a recurrir a tratamientos de reproducción asistida para poder quedarse embarazada, lo que conlleva graves problemas emocionales y grandes gastos económicos^{29,30}. A pesar de que algunas investigaciones abordan que el sistema inmunitario actúa sobre la función ovárica y el proceso de implantación del embrión, aún queda mucho por investigar sobre su papel en los tratamientos de reproducción asistida¹⁰. Por ello, este estudio analiza los niveles de expresión de los genes IL-1 β , IL6, TNF- α y NF- κ B, reguladores intraováricos de la foliculogénesis, la ovulación y la función del cuerpo lúteo^{31,32,33}, con el fin de establecer su papel en la maduración ovárica y su relación con distintos diagnósticos de esterilidad³⁴.

Algunos estudios muestran que, tanto IL-1 β como TNF- α , inducen la producción de mediadores ovulatorios como progesterona y prostaglandinas, además de promover la ovulación^{10,35}. Otros estudios han reflejado que la IL6 actúa como modulador de la función ovárica¹⁶ y posee una función antiinflamatoria al inhibir la IL-1 β y la síntesis de TNF- α ^{10,11}, asociando los niveles altos de IL6 con procesos inflamatorios agudos y con alteraciones de la calidad ovocitaria que pueden provocar un decrecimiento de la tasa de embarazo³⁶. Respecto al NF- κ B está relacionado con los procesos de crecimiento, proliferación, diferenciación y muerte celular^{14,19}.

Nuestros resultados (ver tabla 3) indican que el aumento de inflamación está principalmente relacionado con la edad ya que el nivel de expresión de IL-1 β , IL6 y TNF- α en ≥ 40 fue significativamente mayor que en NOF y PR.

Con la edad la tasa de fertilización va disminuyendo y uno de los procesos implicados podría ser la inflamación. Algunos estudios realizados en modelos bovinos, añaden que las células endometriales de los animales más viejos poseen niveles más altos de señalización inflamatoria y daños en el ADN^{21,37}. Otros autores, como Blumel et al³⁸ y Zavatta et al³⁹ establecen que los niveles de expresión elevados de estos genes están relacionados a una estimulación de la senescencia de las trompas de Falopio, lo que conlleva una alteración de la función uterina afectando a la formación de células deciduales epiteloideas (decidualización) en el endometrio y perjudicando el desarrollo del embarazo.

La existencia de una respuesta inflamatoria alta en mujeres mayores de 40 años podría afectar negativamente al éxito de la fecundación in vitro (FIV) y a la implantación del embrión³⁹. Varios autores como Reis Soares et al⁴⁰ han mostrado en sus estudios que el porcentaje de implantación del embrión se reduce aproximadamente a la mitad en mujeres mayores de 40 años sometidas a técnicas de reproducción asistida (sólo el 11 % logran la implantación, a diferencia de los menores de 40 años que es mayor al 22 %). Es posible que esta disminución de la implantación esté relacionada con una mayor expresión de IL-1 β , IL6 y TNF- α encontrada en este grupo.

Entre los grupos NOF y PR no se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes analizados, exceptuando en la IL6 en la que encontramos una expresión significativamente mayor. Esto provoca que los niveles de IL-1 β y TNF- α tiendan a ser menores, aunque no significativos, lo que puede conducir a un decrecimiento en la tasa de fertilización y por tanto a una menor probabilidad de embarazo³⁵.

En cuanto a NF- κ B no existen datos suficientes que establezcan su papel en el éxito o fracaso reproductivo. Aunque algunos autores como Walsh et al⁴¹ realizaron un estudio en bovinos sobre las vías relacionadas con la inflamación en la ovulación y determinaron que NF- κ B se encontraba en niveles altos después de un aumento de LH en células de la granulosa; otros autores como Fleming et al⁴² y Altinoz et al⁴³ reportaron que la actividad de NF κ B está relacionada con el cáncer de ovario epitelial, lo que demarca la importancia de los mecanismos reguladores.

Otro aspecto para destacar en nuestra investigación es la existencia de correlaciones importantes entre los genes estudiados en los distintos diagnósticos.

En el grupo NOF se obtuvo una correlación positiva entre la IL6 y TNF- α , así como, entre la expresión de TNF- α , el nivel de estradiol y el número de ovocitos recuperados. IL6 y TNF- α , actúan sobre la esteroidogénesis ovárica y la angiogénesis⁴⁴. La correcta regulación llevada a cabo por IL6 y TNF- α es importante ya que durante la ovulación se produce la descomposición del tejido, su remodelación y la angiogénesis activa para formar el cuerpo lúteo^{44,45}. El hecho de que estas correlaciones encontradas en el grupo control no se mantengan en los otros dos grupos podría indicar la existencia de algún fallo en las vías de regulación de estos que podría afectar al desarrollo folicular.

A diferencia del grupo control, en el grupo PR se puede apreciar una correlación positiva entre IL-1 β con IL6 y TNF- α , además la IL-1 β y la IL6 se correlacionan con el número de ovocitos. A pesar de que la distribución de la edad de las pacientes en el grupo PR posee mayor similitud con el grupo control, se puede observar que tanto el grupo PR como ≥ 40 muestran una correlación positiva entre IL-1 β e IL6, lo que podría implicar la existencia de un decrecimiento en la reserva folicular y un envejecimiento prematuro que ocasiona una mala calidad ovocitaria^{26,46}.

En base a lo anteriormente descrito y a los últimos artículos publicados, las alteraciones en el proceso inflamatorio asociado a la ovulación y su regulación, podrían participar en el desarrollo de algunos trastornos reproductivos. Aunque aún faltan más datos, nuestros resultados reflejan que, efectivamente, podrían estar implicados en un desarrollo folicular alterado, especialmente en mujeres mayores de 40 años.

8. Conclusiones:

1. Se observan diferencias significativas en el nivel de expresión de los genes analizados entre los distintos grupos de mujeres estudiadas.
2. Comparados con NOF, el grupo ≥ 40 presenta niveles de expresión significativamente más altos para IL6, IL-1 β y TNF- α y el grupo PR solo para IL6. El nivel de expresión para el gen NF- κ B es similar en todos los grupos.
2. Mujeres sin patología ovárica (NOF) presentan una correlación positiva en la expresión de los genes IL6 y TNF- α y entre la expresión de TNF- α y los niveles de estradiol y oocitos recuperados tras la estimulación ovárica. Estas correlaciones se pierden en los grupos ≥ 40 y PR.
3. En el grupo de mujeres ≥ 40 se observan nuevas correlaciones positivas de expresión entre los genes IL6 e IL-1 β , un cambio de patrón de expresión que puede tener un papel fisiológico relevante en el desarrollo folicular ovárico relacionado con la edad.
4. En grupo PR se observan correlaciones positivas en la expresión entre IL6 e IL-1 β , IL-1 β y TNF- α y correlación entre IL-1 β e IL6 y número de oocitos recuperados.
5. Nuestros datos preliminares indican que el patrón de expresión de genes implicados en inflamación metabólica podría jugar un papel importante en el desarrollo folicular.

9. Bibliografía

1. Diaz Flores M, Ortega Camarillo C, Rosales Torres AM. El óxido nítrico como principal efector del sistema de la Interleucina-1 en la ovulación. Medigraphic. Gaceta médica de México. 2001. 137 (4):291-301
2. Hawkins SM, Matzuk MM. The menstrual cycle: basic biology. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008 Jun. 1135(1):10–8. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1429.018>
3. Knudtson J. Ciclo menstrual: Endocrinología reproductiva femenina Manual MSD. 2019. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es/professional/ginecolog%C3%ADa-y-obstetricia/endocrinolog%C3%ADa-reproductiva-femenina/endocrinolog%C3%ADa-reproductiva-femenina>
4. Comité Nacional de Endocrinología, Escobar ME, Pipman V, Arcari A, Boulgourdjian E, Keselman A, et al. Menstrual cycle disorders in adolescence. Arch Argent Pediatr. 2010. 108(4):363–9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0325-00752010000400018>
5. Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. Animal Reproduction Science. 2011 Apr 1. 124(3–4):229–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.030>
6. Lambalk CB, de Koning CH. Interpretation of elevated FSH in the regular menstrual cycle. Maturitas. 1998. 30(2):215–20. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5122\(98\)00076-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5122(98)00076-0)
7. Peralta Delgado I, Velázquez PN. Foliculogénesis: Camino hacia la sobrevivencia o la muerte celular. Asociación Mexicana De Bioquímica. Unam.mx. 2013 Dec. 32 (4): 128-136.

8. Dekel N. Master Regulators of Female Fertility. *New England Journal of Medicine*. 2009 Aug 13;361(7):718–9. Doi: 10.1056/NEJMcibr0904558
9. Andrade Souza F, Pérez Osorio J, D'Oliveira-Sousa A, et al. Foliculogénesis y ovulación en la especie equina. *Rev Med Vet*. 2011 (22):43. <http://dx.doi.org/10.19052/mv.563>
10. Inza D, Van Thillo G. Cytokines and ovulation. *Rev SAEGRE*. 2011 Nov; 18 (3): 44-53
11. Baravalle ME, Stassi A, Velazquez MML, Belotti M. La falla en la ovulación como un componente de la patogenia de la enfermedad quística ovárica bovina: rol de citoquinas. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*. 2014 Dec 2. 12(1/2):113–27. <http://dx.doi.org/10.14409/favecv.v12i1/2.4550>
12. Jones R, Lopez K. The ovaries. *Human Reproductive Biology*. 2013 Sept. 28; 4: 39-53
13. Cheong YC, Shelton JB, Laird SM, Richmond M, Kudesia G, Li TC and Ledger WL. IL-1, IL6 and TNF-alpha concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions. *Hum. Reprod*. 2002. 17:69-75. Doi: 10.1093/humrep/17.1.69
14. Bustami A, Lestari WP, Hayuningrum CF, Wuyung PE, Wibowo H, Natadisastra RM. The anti-inflammatory effect of octyl gallate through inhibition of nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway in rat endometriosis model. *J Reprod Infertil*. 2020. 21(3):169–75.
15. Brännström M. Potential role of cytokines in ovarian physiology: the case for interleukin-1. *The Ovary*. 2004. 2:261-271.

16. Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A and Freedman RS. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary review. *Endocrine-related Cancer*. 1999; 6:93-107. doi: 10.1677/erc.0.0060093
17. Ma CH, Yan LY, Qiao J, et al. Effects of tumor necrosis factor-alpha on porcine oocyte meiosis progression, spindle organization, and chromosome alignment. *Fertil Steril*. 2010. 93(3):920-6. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.131>
18. Fedrocsak P, Ráki M, Storeng R. Characterization and depletion of leucocytes from cells isolated from preovulatory ovarian follicle. *Hum Reprod* 2007 Apr; 22(4):989-99. Doi: 10.1093/humrep/del491
19. Poulsen L la C, Englund ALM, Wissing MLM, Yding Andersen C, Borup R, Grøndahl ML. Human granulosa cells function as innate immune cells executing an inflammatory reaction during ovulation: a microarray analysis. *Mol Cell Endocrinol*. 2019. 486:34-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2019.02.014>
20. Mejjide de la Fuente S. Estado antioxidante del líquido folicular en mujeres sometidas a estimulación ovárica: implicaciones en la maduración folicular y en la fertilidad. *Addiehues*. 2017.
21. Shirasuna K, Iwata H. Effect of aging on the female reproductive function. *Contracept Reprod Med*. 2017. 2:23. <http://dx.doi.org/10.1186/s40834-017-0050-9>
22. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. 2002;8(2):141-54.

23. Huang Y, Hu C, Ye H, Luo R, Fu X, Li X, Huang J, Chen W, Zheng Y. Inflamm-Aging: A New Mechanism Affecting Premature Ovarian Insufficiency. *J Immunol Res.* 2019 Jan 2;2019:8069898. doi: 10.1155/2019/8069898.
24. Peña O, Palumbo A, González-Fernández R, Hernández J, Naftolin F, Avila J. Expression of angiotensin II type 1 (AT1) and angiotensin II type 2 (AT2) receptors in human granulosa-lutein (GL) cells: correlation with infertility diagnoses. *Fertil Steril.* 2010 Mar 15;93(5):1601-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.092.
25. Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of “poor response” to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod.* 2011. 26(7):1616–24. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der092>
26. Jeve YB, Bhandari HM. Effective treatment protocol for poor ovarian response: A systematic review and meta-analysis. *J Hum Reprod Sci.* 2016 9(2):70–81. <http://dx.doi.org/10.4103/0974-1208.183515>
27. Lonegro N, Napoli N, Pesce R, Chacón C. Recuento de folículos antrales como predictor de la respuesta ovárica. *Rev. argent. radiol.* 2016 Dic; 80(4): 252-257.
28. Schmittgen TL. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols.* 2008. 3:1101-1108.
29. Perez Milan F. Fertilidad y reproducción asistida. 2011. 18; 68-74.

30. Tasas de éxito. IVI. Disponible en: <https://ivi.es/preguntas-frecuentes/tasas-de-exito/>
31. Bréard E, Delarue B, Benhaim A, Feral, C. & Leymarie, P. Inhibition by rabbit granulosa and theca cells: effects on gonadotropin-induced progesterone production. *Euro J Endocrinol*. 1998 Marzo. 138: 328-336.doi: 10.1530/eje.0.1380328
32. Cavaillon JM. Cytokines in inflammation. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1995. 189(4):531–44.
33. Liu Z, Castrillon D, Zhou W, Richards J, et al. FOXO1/3 Depletion in Granulosa Cells alters follicle growth, death and regulation of Pituitary FSH. *Molecular Endocrinology*. 2013. 27(2): 238-252
34. Fortin CS, Leader A, Mahutte N, et al. Gene expression analysis of follicular cells revealed inflammation as a potential IVF failure cause. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2019. 36(6), 1195–1210. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01447-4>
35. Saúl V, Reyes V, Téllez Velasco S, Carlos J, Cruz H, De Jesús M, et al. Concentraciones séricas de IL-1 β , IL6 y TNF- α en pacientes infértiles con disfunción ovárica. *Ginecología y Obstetricia de México*. 2005. 73: 604-10
36. Cohen García, I. Marcadores de la exposición a tóxicos en líquido folicular de pacientes estériles, sometidas a FIV y su relación con la tasa de gestación. Málaga. Riumaumaes. 2016.

37. Tanikawa N, Ohtsu A, Kawahara-Miki R et al. Age-associated mRNA expression changes in bovine endometrial cells in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017. 15:63. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0284-z>
38. Blumel JE. Estrogens prevents osteoporotic fractures. In *How do anti-osteoporotic agents prevent fractures?* E. J. A. Roldán, J. L. Ferretti. (eds) *Bone* 2000; 26: 393-6.
39. Zavatta A, Parisi F, Mandò C, Scaccabarozzi C, Savasi VM, Cetin I. Role of inflammaging on the reproductive function and pregnancy. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2022. <http://dx.doi.org/10.1007/s12016-021-08907-9>
40. Reis Soares S, Garcia Velasco J, Fernandez M, Bosch E, Remohí J, Pellicer A, et al. Clinical factors affecting endometrial receptiveness in oocyte donation cycles. *Fertil Steril*. 2008; 89(3): 491-501.
41. Walsh SW, Fair T, Browne JA, Evans ACO, McGettigan PA. Physiological status alters immunological regulation of bovine follicle differentiation in dairy cattle. *J. Reprod. Immunol*. 2012. 96, 34– 729 44. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.07.002>
42. Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. At the Cutting Edge Incessant 573 ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Mol. Cell*. 574 *Endocrinol*. 2006. 247, 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.09.014>
43. Altinoz, M.A., Korkmaz, R. NF-kappaB, macrophage migration inhibitory factor and cyclooxygenase-inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen- and NSAID-prevention of the ovarian cancer. *Neoplasma*. 2004. 51, 239–47.

44. Samir M, Glister C, Mattar D, Laird M, & Knight PG. Follicular expression of pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α (TNF α), interleukin 6 (IL6) and their receptors in cattle: TNF α , IL6 and macrophages suppress thecal androgen production in vitro, *Reproduction*. 2017. 154(1), 35-49.
45. Uribe-Velásquez LF, Osorio JH, Correa-Orozco A. El cuerpo lúteo: una visión inmunológica. *Biosalud*. 2011 Dec; 10 (2): 87-100.
46. Ku SY, Suh CS, Kim SH, Choi YM, Kim JG, Moon SY. A pilot study of the use of low dose human menopausal gonadotropin in ovulation induction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2003 Jul;109(1):55–59.