

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Pluripotencialidad de las células de la granulosa luteinizadas  
de ovario humano: estrategias regenerativas en medicina  
reproductiva**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Sara García Cano**

Directores

**María Eugenia Fernández Santos**  
**Federico Pérez Milán**

Madrid

© Sara García Cano, 2022

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**PLURIPOTENCIALIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA  
LUTEINIZADAS DE OVARIO HUMANO. ESTRATEGIAS  
REGENERATIVAS EN MEDICINA REPRODUCTIVA**

TESIS DOCTORAL

**Sara García Cano**

Directores:

**María Eugenia Fernández Santos**

**Federico Pérez Milán**

Madrid, 2022



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**PROGRAMA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**PLURIPOTENCIALIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA  
LUTEINIZADAS DE OVARIO HUMANO. ESTRATEGIAS  
REGENERATIVAS EN MEDICINA REPRODUCTIVA**

TESIS DOCTORAL

**Sara García Cano**

Directores:

**María Eugenia Fernández Santos**

**Federico Pérez Milán**

Madrid, 2022



## Dedicatorias

A mis hijos, Ángel y Noa, *“Donde la vida comienza y el amor nunca termina”*.



Agradecimientos:

A mis directores de Tesis, María Eugenia Fernández Santos y Federico Pérez Milán, sin ellos esto no hubiera sido posible.

A mis Tutores, Óscar Palomares Gracia, pero también a María Antonia Lizarbe, por su ayuda inestimable.

A mis compañeras del Laboratorio, Susana, Virginia, Alejandra, Ana y Myriam, por estar siempre pendientes.

A todo el equipo de la unidad de FIV del Hospital Universitario Gregorio Marañón sin los cuales el reclutamiento de pacientes y el recuperado de líquidos foliculares hubiera sido imposible (Bea, Manuel, Elena, Teresa, Miguel, Fede, Laura).

A Rebeca, por compartir conmigo esos intensos inicios.

A Nereyda, por su apoyo incondicional en todo momento.

A mi familia y mi pareja por creer en mí y no parar de preguntar “y la tesis, ¿cómo va?”.

*“Siempre hay que encontrar tiempo para agradecer a las personas que marcan la diferencia en nuestra vida”*



## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>19</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>23</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>28</b>
1.1 REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE LA GRANULOSA FOLICULAR OVÁRICA .....	28
1.1.1 <i>Acciones de las gonadotropinas en fase folicular precoz</i> .....	31
1.1.2 <i>Acciones de las gonadotropinas en fase folicular avanzada y preovulatoria</i> .....	34
1.1.3 <i>Otros reguladores endocrinos y paracrinos</i> .....	37
1.1.4 <i>Cambios funcionales propios de la luteinización fisiológica: Inicio de la síntesis de progesterona</i> .....	39
1.2 EXPRESIÓN MOLECULAR DE LA DIFERENCIACIÓN FOLICULAR EN LAS CÉLULAS GRANULOSAS.....	41
1.2.1 <i>Asociada a modificaciones morfofuncionales</i> .....	41
1.2.1.1 Disminución de la cohesividad celular .....	41
1.2.1.2 Angiogénesis.....	45
1.2.2 <i>Asociada a cambios funcionales</i> .....	50
1.2.2.1 Síntesis de citoquinas citotróficas .....	50
1.2.2.2 Síntesis esteroidea .....	60
1.2.2.2.1 Enzima de Escisión de la Cadena Lateral del Colesterol (CYP11A1) .....	61
1.2.2.2.2 Citocromo P450 17A1 (CYP17A1) .....	61
1.2.2.2.3 3-β-Hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (HSD3B2).....	62
1.2.2.2.4 Aromatasa (CYP19A1) .....	66
1.3 EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN FARMACOLÓGICA SOBRE EL PERFIL FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA.....	67
1.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS GRANULOSAS LUTEINIZADAS .....	72
1.4.1 <i>Células granulosa luteinizadas diferenciadas</i> .....	72

**Índices**

1.4.1	<i>Células de granulosa ovárica con características de pluripotencialidad</i> .....	77
1.5	EXPANSIÓN DE LAS CG CON CARACTERÍSTICAS DE PLURIPOTENCIALIDAD.....	84
1.6	INDUCCIÓN DE DIFERENCIACIÓN HACIA LÍNEAS MESENQUIMALES ESPECÍFICAS A PARTIR DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA PROGENITORAS EXPANDIDAS (CGPE).....	87
1.7	MECANISMOS DE PROTECCIÓN CELULAR Y REGENERACIÓN TISULAR .....	91
1.8	ESTRATEGIAS DE CITOPROTECCIÓN OVÁRICA.....	93
1.8.1	<i>Protección frente a estrés oxidativo</i> .....	94
1.8.2	<i>Protección frente a estrés carbonílico</i> .....	97
1.8.2.1	Fuentes de estrés carbonílico: biosíntesis y regulación del metabolismo de las especies reactivas de carbono.....	97
1.8.2.2	Mecanismos de disfunción y lesión celular mediadas por especies carbonílicas .....	101
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN GENERAL</b> .....	<b>107</b>
<b>3.</b>	<b>LIMITACIONES</b> .....	<b>108</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>112</b>
<b>5.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>113</b>
<b>6.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>116</b>
6.1	MATERIAL.....	116
6.1.1	<i>Reclutamiento de donantes de material celular. Criterios de selección</i> ...	116
6.1.2	<i>Fuentes de información clínica</i> .....	117
6.2	MÉTODOS.....	118
6.2.1	<i>Obtención y expansión de células de la granulosa luteinizada</i> .....	118
6.2.1.1	Estimulación ovárica y punción folicular .....	118
6.2.1.2	Aislamiento de la Células de la Granulosa Luteinizadas.....	121
6.2.1.3	Criopreservación y almacenamiento.....	122
6.2.1.4	Descongelación .....	123
6.2.1.5	Depleción de células CD3+.....	123
6.2.1.6	Cultivo y expansión de las Células de la Granulosa Luteinizadas.....	124

**Índices**

6.2.2	<i>Obtención de las Células Mesenquimales Multipotentes de Medula Ósea</i>	125
6.2.2.1	Aspiración de médula ósea	125
6.2.2.2	Aislamiento de las Células Mesenquimales Multipotentes de Medula Ósea	127
6.2.2.3	Determinación de concentración y viabilidad de las Células Mesenquimales Multipotentes de Medula Ósea	128
6.2.2.4	Cultivo y expansión de las Células Mesenquimales Multipotentes de Medula Ósea	129
6.2.2.5	Criopreservación y almacenamiento de las Células Mesenquimales Multipotentes de Medula Ósea	131
6.2.3	<i>Diseño experimental y metodología general</i>	131
6.2.3.1	Evaluación de la adhesividad y la morfología	131
6.2.3.2	Caracterización inmunofenotípica	131
6.2.3.3	Diferenciación <i>in vitro</i> inducida	135
6.2.3.3.1	Diferenciación osteogénica	135
6.2.3.3.2	Diferenciación condrogénica	135
6.2.3.3.3	Diferenciación adipogénica	136
6.2.3.4	Caracterización de la actividad funcional	137
6.2.3.5	Experimentos sobre protección frente a citotoxicidad experimental	142
6.2.3.5.1	Toxicidad experimental mediada por Peroxinitrito	142
6.2.3.5.2	Toxicidad experimental mediada por Glioxal	144
6.2.4	<i>Métodos específicos de caracterización y cuantificación</i>	147
6.2.4.1	Citometría de flujo	147
6.2.4.2	Depleción de células CD3+	149
6.2.4.3	Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	150
6.2.4.3.1	Extracción del RNA	150
6.2.4.3.2	Evaluación de la eficiencia de los cebadores	152
6.2.4.3.3	Amplificación de secuencias de cDNA	153

---

**Índices**

6.2.4.3.4	Cuantificación de la expresión génica.....	156
6.2.4.4	Cuantificación de apoptosis mediante Anexina V .....	157
6.2.5	<i>Definición de términos y variables</i> .....	158
6.2.5.1	Términos .....	158
6.2.5.2	Variables.....	161
6.2.6	<i>Métodos estadísticos</i> .....	164
6.2.6.1	Estadística descriptiva.....	164
6.2.6.2	Estadística inferencial.....	164
6.3	ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES.....	165
6.3.1	<i>Aprobación institucional</i> .....	165
6.3.2	<i>Evaluación riesgo-beneficio</i> .....	166
6.3.3	<i>Garantías de confidencialidad y ejercicio de derechos ARCO</i> .....	166
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>170</b>
7.1	ESTUDIOS PRELIMINARES DE FACTIBILIDAD.....	170
7.2	DESCRIPCIÓN DE VARIABLES BASALES.....	172
7.2.1	<i>Muestras celulares iniciales</i> .....	172
7.2.1.1	Células de la granulosa ovárica.....	172
7.2.2	<i>Evaluación de la eficiencia de la expansión de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas</i> .....	173
7.2.2.1	Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano frescas....	173
7.2.2.2	Células de la Granulosa criopreservadas .....	176
7.2.2.3	Comparación de la eficiencia de los cultivos de CGLOH frescas y criopreservadas .....	180
7.3	CARACTERIZACIÓN DE LAS CGPE.....	182
7.3.1	<i>Adhesión a superficie de cultivo</i> .....	182
7.3.2	<i>Diferenciación inducida</i> .....	186
7.3.2.1	Diferenciación osteogénica.....	186
7.3.2.2	Diferenciación condrogénica .....	187
7.3.2.3	Diferenciación adipogénica .....	188
7.3.3	<i>Inmunofenotipo</i> .....	189

## Índices

7.3.3.1	Expresión génica .....	199
7.3.4	<i>Evaluación de la capacidad protectora frente a citotoxicidad experimental</i> .....	210
7.3.4.1	Estrés oxidativo .....	210
7.3.4.2	Estrés carbonílico .....	217
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>226</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>250</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>252</b>

## Índices

### ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AGE</b>	Productos Finales de la Glicosilación Avanzada; <i>Advanced Glycation End-Products</i>
<b>HSD3B2</b>	3-Beta-Hidroxi-Esteroide-Deshidrogenasa; <i>3-<math>\beta</math>-Hydroxysteroid Dehydrogenase</i>
<b>AMH</b>	Hormona Antimulleriana
<b>ANPT</b>	Angiopoyetinas
<b>BMP-15</b>	Proteína Morfogenética ósea 15
<b>BMPs</b>	Proteínas Morfogenéticas ósea
<b>CD</b>	Grupo de Diferenciación; <i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CD31</b>	Molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas o Grupo de diferenciación 31
<b>CG</b>	Células de la Granulosa
<b>CGPE</b>	Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas
<b>CGLOH</b>	Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano
<b>CGM</b>	Células Granulosas Maduras
<b>CGP</b>	Células de la Granulosa Progenitoras
<b>CL</b>	Cuerpo Lúteo
<b>CMF</b>	Diacetato de 5-Clorometilfluoresceina
<b>COS</b>	Estimulación Ovárica Controlada
<b>CPI</b>	Células Pluripotentes Inducidas
<b>CP</b>	Células Progenitoras
<b>CS</b>	Estrés Carbonílico; <i>Carbonilic Stress</i>
<b>CT</b>	Células Tecaes
<b>Cx37</b>	Conexina 37
<b>Cx43</b>	Conexina 43
<b>Dil</b>	Perclorato de 1,1'-Dioctadecil 3,3,3'3' Tetrametilindocarbocianina
<b>DMEM</b>	Modificación Simple del Medio Basal de Eagle; <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

## Índices

<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico, Deoxyribonucleic Acid
<b>FGF-B</b>	Factor de Crecimiento Fibroblástico-Básico; <i>Fibroblast Growth Factor-Basic</i>
<b>FIV</b>	Fecundación <i>In Vitro</i>
<b>FSH</b>	Hormona Folículo-Estimulante; <i>Follicular Stimulating Hormone</i>
<b>DAZ</b>	Proteína DAZ-Like
<b>G6P</b>	Glucosa-6-Fosfatodeshidrogenasa
<b>GDF-9</b>	Factor de Crecimiento Diferenciador 9; <i>Growth differentiation factor-9</i>
<b>GJ</b>	Uniones Intercelulares en Hendidura; <i>GAP Junctions</i>
<b>H</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>hCG</b>	Gonadotropina Coriónica Humana
<b>HGF</b>	Factor de Crecimiento Hepatocítico; <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
<b>HLA-DR</b>	Antígeno de Histocompatibilidad; <i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>IGF-1</b>	Factor de Crecimiento Insulínico Tipo 1; <i>Insulin-Like Growth Factor 1</i>
<b>IGF-2</b>	Factor de Crecimiento Insulínico Tipo 2; <i>Insulin-Like Growth Factor 2</i>
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>ISCT</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular; <i>Internacional Society Cellular Therapy</i>
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante; <i>Luteinizing Hormone</i>
<b>LIF</b>	Factor inhibidor de Leucemia; <i>Leukemia Inhibiting Factor</i>
<b>MO</b>	Médula Ósea
<b>MSC</b>	Célula Precursora Mesenquimal; <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
<b>MSCMO</b>	Células Mesenquimales de Medula Ósea
<b>OS</b>	Estrés Oxidativo; <i>Oxidative Stress</i>
<b>PBS</b>	Solución De Tampón Fosfato, Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PM</b>	Mostaza Fosforamida, <i>Phosphoramidate Mustard</i>

## Índices

<b>RAGE</b>	Receptor de Los Productos Finales de la Glicosilación Avanzada
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNAm</b>	Ácido Ribonucleico Mensajero
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>SC</b>	Células Madre; <i>Stem Cell</i>
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa
<b>sRAGE</b>	Receptor de Los Productos Finales de la Glicosilación Avanzada Soluble
<b>StAR</b>	Steroid Acute Regulatory Protein, Proteína reguladora de la esteroidogénica aguda
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformador $\beta$
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal dUTP Nick End-Labeling</i>
<b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento Endotelial; <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## Índices

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características basales de las pacientes fuente de las células de la granulosa y de la estimulación ovárica. ....	120
Tabla 2: Anticuerpos específicos para la detección de la expresión de proteínas de membrana celular consideradas como marcadores positivos, cuya presencia constituye el criterio para la caracterización de las células progenitoras mesenquimales adultas.....	132
Tabla 3: Anticuerpos específicos para la detección de la expresión de proteínas de membrana celular consideradas como marcadores negativos, cuya ausencia constituye el criterio para la caracterización de las células progenitoras mesenquimales adultas. ....	133
Tabla 4: Anticuerpos adicionales específicos para la detección de la expresión de proteínas de membrana celular consideradas como marcadores positivos, cuya presencia constituye el criterio para la caracterización de las células progenitoras mesenquimales adultas.....	134
Tabla 5: Anticuerpos adicionales específicos para la detección de la expresión de proteínas de membrana celular consideradas como marcadores negativos, cuya ausencia constituye el criterio para la caracterización de las células progenitoras mesenquimales adultas.....	134
Tabla 6: Genes relacionados con la Memoria Funcional de Origen.....	138
Tabla 7: Genes relacionados con la Multipotencialidad de las Células Progenitoras Adultas Hematopoyéticas. ....	138
Tabla 8: Genes relacionados con la Estirpe Celular Hematopoyética.....	139
Tabla 9: Genes relacionados con Multipotencialidad de Células Progenitoras Adultas Mesenquimales.....	139
Tabla 10: Genes relacionados con Pluripotencialidad Embrionaria.....	140
Tabla 11: Genes relacionados con Pluripotencialidad Germinal.....	140
Tabla 12: Genes relacionados con Actividades Citoprotectoras.....	141
Tabla 13: Gen Control.....	141

## Índices

Tabla 14: Distribución de anticuerpos y de los fluorocromos utilizados para determinar la expresión de los marcadores de membrana de las CGLOH y de las CGPE.....	148
Tabla 15: Cebadores utilizados para la amplificación de los genes analizados. ....	155
Tabla 16: Distribución del recuento basal de las muestras de células de la granulosa según su procedencia. ....	172
Tabla 17: Distribución del recuento basal de las muestras de células de médula ósea según su procedencia. ....	173
<i>Tabla 18: Caracterización inmunofenotípica de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) (% expresión).....</i>	<i>190</i>
<i>Tabla 19: Caracterización inmunofenotípica de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (% expresión).....</i>	<i>194</i>
Tabla 20: Caracterización de las <i>Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH)</i> vs <i>Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE)</i> (% expresión) .....	198

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Desarrollo folicular. Valdevane R Araújo, 2014. ....	29
Figura 2: Contribución de los componentes del folículo antral a la diferenciación del ovocito. Modificado de Margo L. Hennes, 2012.....	31
Figura 3: Esteroidogénesis durante la fase folicular temprana. Modificado de Charlotte Sonigo et al., 2014.....	33
Figura 4: Esteroidogénesis durante la fase folicular tardía. Modificado de Charlotte Sonigo et al., 2014.....	36
Figura 5: Implicación de la superfamilia de los TGF- $\beta$ en la comunicación entre las Células de la Teca y las Células de la Granulosa y las Células de la Granulosa y el ovocito. Modificado de Phil G. 2006. ....	38
Figura 6: Acción de los andrógenos en las Células de la Granulosa de los folículos preantrales. Modificado de Didier Dewailly, 2016.....	40
Figura 7: Angiogénesis. Modificado de Leo Speroff 7ª Edición. ....	50
Figura 8: Esteroidogénesis. Modificado de Charlotte Sonigo et al., 2014.....	67
Figura 9: Experimento para el cálculo de la Dosis Letal 50 del Peroxinitrito.	142
<i>Figura 10: Experimento para la determinación del efecto tóxico del Peroxinitrito, a la dosis escogida (350 <math>\mu</math>M). (Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH); Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE); Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO)).</i> .....	144
Figura 11: Experimento para el cálculo de la Dosis Letal 50 del Glioxal.....	145
<i>Figura 12: Experimento para la determinación del efecto tóxico del agente oxidante, Glioxal, a la dosis escogida (100 <math>\mu</math>M). (Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH); Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE); Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO)).</i> .....	146
Figura 13: Recuento celular en función del número de pase en 5 muestras distintas de CGLOH frescas.....	174
Figura 14: Evolución de la celularidad en función del número de pase de cultivo en CGLOH frescas. ....	175

**Índices**

Figura 15: Ratios de expansión en 5 muestras de Células de la Granulosa frescas. ....176

Figura 16: Evolución del recuento celular a lo largo del cultivo para expansión selectiva en seis muestras de Células de la Granulosa descongeladas (A-F)..177

Figura 17: *Distribución de la duración de los periodos inicio de cultivo-primer pase y primer pase-segundo pase de cultivo de expansión de Células de la Granulosa descongeladas. Los diagramas de cajas representan mediana, intervalo intercuartil y valores extremos.* .....178

Figura 18: Evolución de la celularidad en función de pase de cultivo de Células de la Granulosa descongeladas.....179

Figura 19: Ratios de expansión en 6 muestras de Células de la Granulosa descongeladas (A-F).....180

Figura 20: Expansión de Células de la Granulosa frescas vs Células de la Granulosa descongeladas. Las barras representan el error estándar. ....181

Figura 21: *Ratios de expansión en primer y segundo pase en cultivos de CGLOH frescas y criopreservadas. Las barras representan el error estándar.*.....182

Figura 22: Población de Células de la Granulosa en día 0 de cultivo. Se observan las células en suspensión (Microscopía de contraste de fases, 100x). .....183

Figura 23: Población de Células de la Granulosa en día 3 en cultivo. Se observan las células adheridas al sustrato junto con células en suspensión (Microscopía de contraste de fases, 100x).....184

Figura 24: Población de Células de la Granulosa en día 6 de cultivo. Se observa aproximadamente un 40% de adhesión celular (Microscopía de contraste de fases, 200x). .....184

Figura 25: Población de CGLOH en día 9 de cultivo. Se observa aproximadamente un 70% de adhesión celular (Microscopía de contraste de fases, 200x). .....185

Figura 26: Población de CGLOH en día 15 de cultivo. Se observa una confluencia completa (Microscopía de contraste de fases, 200x).....185

---

**Índices**

Figura 27: Diferenciación Osteogénica: Tras la tinción con Rojo Alizarín se observan en marrón más oscuro los depósitos de calcio (Microscopía de contraste de fases; 200x). .....	186
Figura 28: Diferenciación Condrogénica identificada con tinción de Azul de Toluidina. La coloración azul de las células se debe a la presencia de proteoglicanos sintetizados por las células condrocíticas (Microscopía de contraste de fases, 100x).....	187
Figura 29: Diferenciación Adipogénica visible mediante tinción con Oil Red. Se observan abundantes vacuolas de grasa teñidas de rojo por la naturaleza lipofílica del colorante (Microscopía de contraste de fases, 200x).....	188
Figura 30: <i>Caracterización inmunofenotípica de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) obtenido con el Software MACSQuantify. Diagramas de tamaño-complejidad y tamaño-complejidad-fluorescencia frente a marcadores específicos.</i> .....	192
Figura 31: Caracterización inmunofenotípica de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) obtenido con el Software MACSQuantify. Diagramas de tamaño-complejidad y tamaño-complejidad-fluorescencia frente a marcadores específicos. ....	197
Figura 32: <i>Expresión génica relativa de FSHR (A) y LHGCR (B) según tipo celular.</i> .....	200
Figura 33: <i>Expresión génica relativa de Cyp19a1 según tipo celular.</i> .....	200
Figura 34: <i>Expresión génica relativa de HSD3B1 (A) y HSD2B2 (B) según tipo celular.</i> .....	201
Figura 35: <i>Expresión génica relativa de INH B (A) y AMH (B) según tipo celular.</i> .....	201
Figura 36: <i>Expresión génica relativa de KIT (CD117) (A) y THY1 (CD90) (B) según tipo celular.</i> .....	202
Figura 37: <i>Expresión génica relativa de ENG (CD105) según tipo celular.</i> .....	202
Figura 38: <i>Expresión génica relativa de CD44 (A) y PTPRC (CD45) (B) según tipo celular.</i> .....	203

**Índices**

*Figura 39: Expresión génica relativa de ALCAM (CD166) (A) y NT5E (CD73) (B) según tipo celular.* .....203

*Figura 40: Expresión génica relativa de VCAM (CD166) (A) y ITGB1 (CD29) (B) según tipo celular.* .....204

*Figura 41: Expresión génica relativa de POU5 (Oct4) (A) y DPPA3 (A) según tipo celular.* .....204

*Figura 42: Expresión génica relativa de SOX2 (A) y TERT (B) según tipo celular.* .....205

*Figura 43: Expresión génica relativa de LMNA según tipo celular.* .....205

*Figura 44: Expresión génica relativa de FGF2 según tipo celular.* .....206

*Figura 45: Expresión génica relativa de EGF (A) y IGF1 (B) según tipo celular.* .....206

*Figura 46: Expresión génica relativa de ESR 2 (A) y BCL2 (B) según tipo celular.* .....207

*Figura 47: Expresión génica relativa de SOD 1 (A) y SOD 2 (B) según tipo celular.* .....207

*Figura 48: Expresión génica relativa de CAT (A) y GLO 1 (B) según tipo celular.* .....208

*Figura 49: Análisis de agrupamiento (clustering).* .....209

*Figura 50: Viabilidad de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adicción de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Viabilidad se define como el % de células viables con respecto al número total de células iniciales).* .....211

*Figura 51: Apoptosis de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adicción de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa*

**Índices**

Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Apoptosis se define como el % de células apoptóticas con respecto al número total de células iniciales).....212

Figura 52: Muerte de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adicción de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Muerte se define como el % de células muertas con respecto al número total de células iniciales).....213

Figura 53: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin tóxico a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas).....214

Figura 54: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia del tóxico (Peroxinitrito) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). .....215

Figura 55: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia de las Células (de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) y del tóxico (Peroxinitrito) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). .....216

Figura 56: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) y del tóxico (Peroxinitrito) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). .....217

**Índices**

Figura 57: Viabilidad de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adicción de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO)) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Viabilidad se define como él % de células viables con respecto al número total de células iniciales).....218

Figura 58: Apoptosis de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adicción de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Apoptosis se define como él % de células apoptóticas con respecto al número total de células iniciales).....219

Figura 59: M Muerte de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adicción de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Muerte se define como él % de células muertas con respecto al número total de células iniciales).....220

Figura 60: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin tóxico a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). .....221

Figura 61: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en

## Índices

presencia del tóxico (Glioxal) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas).....	222
Figura 62: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) y del tóxico (Glioxal) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). .....	223
Figura 63: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) y del tóxico (Glioxal) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). .....	224



## **RESUMEN**

### **TÍTULO DEL ESTUDIO**

“Pluripotencialidad de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano. Estrategias Regenerativas en Medicina Reproductiva”

### **ÁMBITO DEL ESTUDIO**

Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Sección de Reproducción Humana Asistida. Servicio de Obstetricia y Ginecología.

Laboratorio de Órganos Bioartificiales y Unidad de Producción Celular.

Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón.

Instituto Europeo de Fertilidad. Madrid.

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Evaluar la capacidad de expresión de marcadores de pluripotencialidad en las Células de la Granulosa Luteinizadas (CGLOH) obtenidas por medio de punción folicular para Fecundación *In Vitro* (FIV), y la capacidad de protección frente al daño celular inducido experimentalmente ejercida por las Células de la Granulosa Progenitoras (CGP).

### **PALABRAS CLAVE**

Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano, Células Stem Mesenquimales, Cultivo y Expansión Celular, Citotoxicidad Experimental

## Resumen

### **MARCO CONCEPTUAL Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

Las Células de la Granulosa Luteinizada del Ovario Humano (CGLOH) han sido identificadas como fuentes potenciales de células pluripotentes de estirpe mesenquimal, que pueden ser obtenidas a partir de las primeras por medio de procesos de expansión y diferenciación *in vitro*. En virtud de esta posible derivación, la población obtenida, que denominaremos Células Granulosas Progenitoras Expandidas (CGPE), podrían ejercer efectos protectores frente a la activación de mecanismos de estrés celular endógeno o exógeno, y sobre los procesos de regulación endógena de la apoptosis celular en modelos experimentales orientados a reproducir la pérdida de reserva ovárica fisiológicamente asociada al envejecimiento y la depleción folicular causada por una alta toxicidad germinal. Nuestro estudio selecciona para ello dos modelos de toxicidad experimental, el Estrés Oxidativo (OS) y el Estrés Carbonílico (OC), como vías moleculares finales de inducción de la apoptosis por pérdida de protección asociada al envejecimiento.

### **METODOLOGÍA:**

Las CGLOH, de fácil acceso a través de los programas clínicos de fecundación *in vitro*, constituyen un modelo muy utilizado en el estudio de los mecanismos de maduración del folículo ovárico.

Mediante citometría de flujo, pudimos comprobar como CGLOH tras cultivo prolongado, presentan características propias de Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) y de grasa establecidos por la International Society for Cellular Therapy (ISCT). Además, se consiguió la diferenciación selectiva a líneas mesenquimales específicas, adipogénica, condrogénica y osteogénica mediante medios

## Resumen

condicionados adecuados. La pluripotencialidad de las CGLOH ha sido evaluada también aplicando metodologías de análisis de expresión génica diferencial.

Se sometió a las CGLOH a una citotoxicidad experimental inducida por peroxidación y por estrés carbonílico, exponiéndolas a Peroxinitrito y a Glioxal respectivamente. La evaluación de la capacidad protectora de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE), medida mediante apoptosis y muerte celular, se realizó determinando la apoptosis y muerte celular por medio de la cuantificación expresión de Anexina V y Ioduro de Propidio respectivamente, empleando citometría de flujo.

### **RESULTADOS:**

Las CGPE presentan características funcionales diferenciadoras respecto de las CGLOH, que incluyen menor expresión de marcadores funcionales propios de Células de la Granulosa (CG) y mayor de actividades relacionadas con la promoción de la proliferación celular, de la angiogénesis y de la protección frente a la apoptosis.

La evaluación de la capacidad protectora de las CGPE frente a citotoxicidad experimental, medida mediante viabilidad, apoptosis y muerte celular, nos permitió observar su efecto reductor de la toxicidad celular experimental, que está en relación con la síntesis de factores protectores frente a la toxicidad celular ejercida sobre las CGLOH, y ejercen dicho efecto por medio de la síntesis de factores protectores frente a la apoptosis, inductores de la angiogénesis y promotores de la proliferación celular.

## Resumen

### **CONCLUSIONES:**

El aislamiento, tras cultivo *in vitro* prolongado, de una subpoblación de la CGLOH da lugar a una población de CGPE que adquieren morfología similar a las de las células mesenquimales. Estas células, expresan marcadores propios de célula mesenquimal pluripotente y ausencia de marcadores de pluripotencialidad embrionaria, siendo susceptibles de diferenciación selectiva a líneas mesenquimales específicas. Además, presentan menor expresión de marcadores funcionales propios de CGLOH y mayor de actividades relacionadas con la promoción de la proliferación celular, de la angiogénesis y de la protección frente a la apoptosis.

El cocultivo de CGLOH junto con CGPE reduce la apoptosis y la muerte celular inducida por toxicidad experimental tanto con Peroxinitrito como con especies reactiva de carbono.

## **SUMMARY**

### **TITTLE**

"Pluripotentiality of Human Ovary Luteinized Granulosa Cells. Regenerative Strategies in Reproductive Medicine"

### **SETTING**

Gregorio Marañón University General Hospital. Madrid.

Assisted Human Reproduction Section. Obstetrics and Gynecology Service.

Laboratory of Bioartificial Organs and Cell Production Unit. Institute of Health Care Research Gregorio Marañón.

European Fertility Institute. Madrid.

### **DESIGN**

Evaluate the expression ability of pluripotentiality markers in Luteinized Granulosa Cells (LGCs) obtained by follicular puncture for In Vitro Fertilization (IVF), and the ability to protect against experimentally induced cell damage exerted by Progenitor Granulosa Cells (PGC).

### **KEY WORDS**

Human Ovary Luteinized Granulosa Cells, Mesenchymal Stem Cells, Cell Culture and Expansion, Experimental Cytotoxicity

### **BACKGROUND**

Our study focuses on identifying the most efficient procedures for selection, characterization and expansion of Expanded Progenitor

## Summary

Granulosa Cells (EPGC) from Human Ovary Luteinized Granulosa Cells (HOLGC), as well as the assessment of their anti-apoptotic effect, in experimental models aimed at reproducing physiological ovarian reserve loss associated with aging and follicular depletion caused by high germ toxicity. Our study selects two models of experimental toxicity: Oxidative Stress (OS) and Carbonyl Stress (CS), as final molecular pathways of induction of apoptosis due to loss of protection associated with aging.

## METHODS

HOLGCs, easily accessible through clinical in vitro fertilization programs, are a widely used model in the study of ovarian follicle maturation mechanisms.

Using flow cytometry, we were able to check how LGCs after prolonged culture have characteristics of Bone Marrow Mesenchymal Cells (BM-MSC) and fat established by the International Society for Cellular Therapy (ISCT). In addition, selective differentiation to specific mesenchymal lines, adipogenic, chondrogenic, osteogenic by appropriate conditioned media was achieved. The pluripotentiality of LCGs has also been evaluated using differential gene expression analysis methodologies.

LCGs were subjected to peroxidation-induced experimental cytotoxicity, using peroxinitrit as a toxic, and by reactive carbon species, using glyoxal. The evaluation of the protective capacity of our cell population, measured by apoptosis and cell death, was carried out by quantifying the expression of Annexin V and propidium iodide respectively by flow cytometry.

## Summary

### RESULTS

EPGCs have distinct functional characteristics with respect to LGCs, which include lower expression of functional markers typical of Granulosa Cells (GCs) and increased activities related to the promotion of cell proliferation, angiogenesis and protection against apoptosis.

The assessment of the protective capacity of our cell population against experimental cytotoxicity, measured by viability, apoptosis and cell death, allowed us to observe that EPGCs have a protective effect against cell toxicity exerted on LGCs, and exert this effect by synthesis of protective factors against apoptosis, angiogenesis inducers and cell proliferation promoters.

### CONCLUSIONS

The isolation, after prolonged in vitro cultivation, of a subpopulation of LGCs results in a population of Cells of the CGPE with mesenchymal morphology. This cells, thus expanded express markers of pluripotent mesenchymal cell and absence of embryonic pluripotentiality markers, and are susceptible to selective differentiation to specific mesenchymal lines. Also, have less expression of functional markers typical of LCGs and greater activities related to the promotion of cell proliferation, angiogenesis and protection against apoptosis.

Coculture of LCGs together with CGPE reduces apoptosis and cell death induced by experimental toxicity with both peroxinitrit and reactive carbon species.



# INTRODUCCIÓN

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Regulación de la diferenciación de la granulosa folicular ovárica**

El desarrollo folicular ovárico y la ovulación son procesos altamente regulados. Este proceso implica el abandono del estadio de folículo primordial, y el inicio de un proceso de diferenciación funcional y morfológica que culmina con la selección del folículo dominante, la reactivación de la meiosis del ovocito, la expansión del cúmulo, la extrusión del complejo cúmulo-ovocito durante la ovulación, y la configuración funcional del cuerpo lúteo. Este largo camino se suele dividir en una primera fase, de mayor duración, conocida como 'crecimiento lento', independiente de la regulación gonadotrópica, y que comprende desde la fase de folículo primordial hasta la de folículo terciario preantral. La fase de 'crecimiento rápido o terminal' representa la transición desde folículo terciario antral hasta folículo preovulatorio, y comprende los procesos clásicamente denominados segundo reclutamiento, selección y dominancia. Durante este periodo terminal del desarrollo folicular, los cambios morfológicos y funcionales del folículo son mucho más rápidos, y en la fase final, evolucionan en el transcurso de horas (Kol and Adashi 1995). La expresión morfológica más clara del desarrollo del folículo es sin duda el crecimiento del mismo, que tiene lugar sobre todo por proliferación mitótica de las CG, a la que finalmente se añade la formación y crecimiento del antro folicular.

## Introducción

Las CG son células somáticas de origen mesodérmico visibles ya en el folículo ovárico primordial como una única capa de células planas de morfología epitelial dispuestas alrededor el ovocito. A medida que progresa la diferenciación folicular, y en especial a partir del inicio del crecimiento terminal, su número y volumen aumenta exponencialmente. Ya en la fase de folículos secundario, las CG representan un acúmulo de varias hileras de células epiteliales cuboides o poligonales.

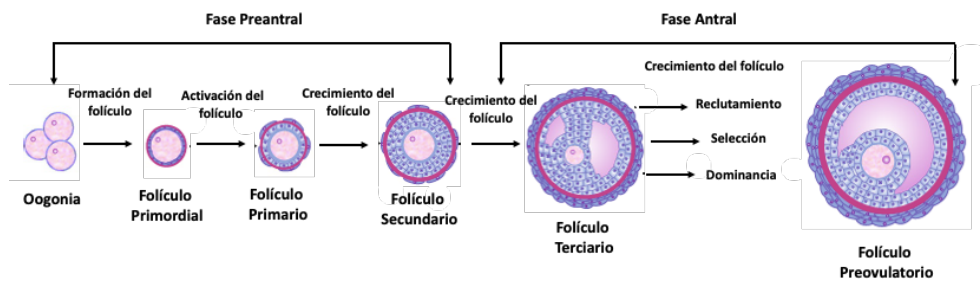


Figura 1: Desarrollo folicular. Valdevane R Araújo, 2014.

Desde la foliculogénesis temprana, la actividad funcional de las CG está relacionada fundamentalmente con su papel trófico y regulador de la maduración ovocitaria, y va evolucionando a lo largo del proceso de foliculogénesis. Clásicamente, las CG han sido consideradas en conjunto un órgano endocrino, productor de mediadores hormonales esteroideos y peptídicos, cuya síntesis va modificándose cuantitativa y cualitativamente a medida que el folículo ovárico crece y se diferencia, y cuya actividad funcional resulta básica en la interacción funcional hipotálamo-hipófiso-gonadal (Matsuda, Inoue et al. 2012). En segundo lugar, una gran parte de los mediadores sintetizados en la granulosa, como estradiol, AMH e inhibina, tienen acciones paracrinas y autocrinas, que por un lado modulan la respuesta de la propia

## Introducción

granulosa a las gonadotropinas, y por otro actúan directamente sobre la maduración y diferenciación del ovocito, que a su vez emiten señales moleculares con destino a la granulosa (Urban and Veldhuis 1992). Todo este conjunto de interacciones reguladoras, sucesivas si consideramos el curso de diferenciación del folículo llamado a ser dominante y preovulatorio, discurren en realidad de forma simultánea. En el ovario de la mujer en edad reproductiva con actividad ovulatoria conservada, coexisten permanentemente folículos en todos los estadios madurativos de la fase de crecimiento lento y de la fase de crecimiento terminal que corresponda al periodo del ciclo ovárico, tanto en fase folicular como en fase lútea (Kirillova, Martazanova et al. 2021).

La proliferación y maduración de las CG conduce a la formación precoz de Uniones Intercelulares en Hendidura (*GJ; GAP Junctions*), cuyo número y densidad van progresivamente en aumento, y que constituyen un sistema de propagación rápida y multiplicación de señales moleculares como las que median los procesos relacionados con la ovulación (Gershon, Plaks et al. 2008).

## Introducción

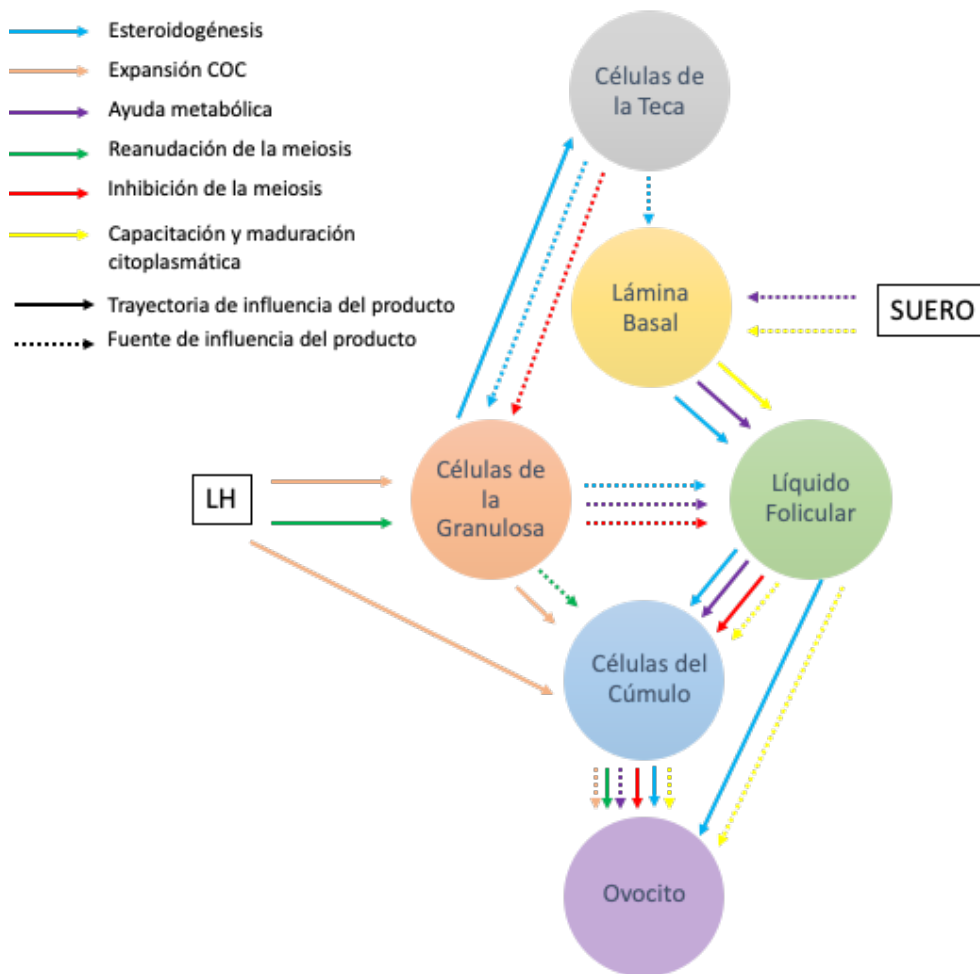


Figura 2: Contribución de los componentes del folículo antral a la diferenciación del ovocito. Modificado de Margo L. Hennet, 2012.

### 1.1.1 Acciones de las gonadotropinas en fase folicular precoz

El desarrollo y diferenciación terminal de los folículos ováricos depende principalmente de la acción combinada y secuencial de las dos gonadotropinas, Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Hormona Luteinizante (LH). La acción de FSH sobre las CG de los folículos antrales precoces estimula su proliferación mitótica, su capacidad esteroidogénica y, a partir de un cierto grado de desarrollo, la aparición de receptores a LH (Hennet and Combelles 2012). La LH actúa

## Introducción

sinérgicamente con la FSH sobre los folículos previamente expuestos a la acción de ésta, manteniendo su crecimiento y desencadenando los cambios propios de la luteinización y en el folículo preovulatorio. A medida que progresa el desarrollo folicular terminal, se incrementa la producción ovárica de progesterona, que tiene lugar principalmente en las CG (Fleming, Humpert et al. 2011) . De hecho, la síntesis de progesterona en la granulosa depende en su inicio de la acción tónica de FSH que del pico LH, al que precede en horas y del que se considera un facilitador (Laborde, Carril et al. 1976).

En el contexto de un ciclo natural, el folículo dominante mantiene su capacidad de proliferación y diferenciación a pesar del descenso de FSH determinado por la retroalimentación negativa ejercida por los estrógenos, gracias en parte a haber incrementado su sensibilidad a la acción de LH. La estimulación de los receptores a LH y FSH de la granulosa folicular, tras la interacción con las respectivas gonadotropinas, se sigue de la activación de varios sistemas de señalización, de la que dependen tanto el crecimiento folicular como la síntesis de esteroides. Estos sistemas comprenden tanto vías de síntesis de segundos mensajeros intracelulares, como adenilato-ciclasa (Chen, Torcia et al. 2013) (Tonetta and diZerega 1989).

La proteínkinasa C (productora de inositol-trifosfato), MAP-kinasa (*mitogen-activated protein kinase*) como sistemas de señalización extracelular dependientes de proteínquinasas (Chen, Torcia et al. 2013). La diferenciación de las CG inducida por FSH induce la expresión de receptores a LH, incrementa progresivamente la esteroidogénesis y la expresión creciente de varios factores de crecimiento pertenecientes a la familia del Factor de Crecimiento Transformador  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) (Knight

## Introducción

and Glister 2006). En la teca, las vías de señalización intra e intercelular son menos conocidas, aunque estudios realizados en modelos animales han descrito que la actividad Akt-fosforilasa (fosfatidilinositol-3-kinasa) dependiente de LH está regulada por la vía de la MAP-kinasa (Fukuda, Orisaka et al. 2009).

La elevación de progesterona durante la fase folicular es un fenómeno fisiológico (Fatemi and Van Vaerenbergh 2015). La regulación específica que FSH y LH ejercen sobre la síntesis de progesterona a lo largo de la fase folicular no está suficientemente dilucidada. Durante la fase folicular precoz, la FSH es el principal promotor de la expresión de actividad la 3- $\beta$ -Hidroxi-Esteroide-Deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) en la granulosa, y con ella de la síntesis de progesterona, mientras que la acción de LH es menos conocida. Paralelamente, la acción de LH tiene lugar predominantemente sobre las Células Tecaes (Devroey, Fauser et al. 2009), dotadas de receptores a la misma, y consiste principalmente en estimular la actividad 17- $\alpha$ -hidroxilasa y con ello la conversión de progesterona en 17-OH-progesterona (Sonigo, Dray et al. 2014).

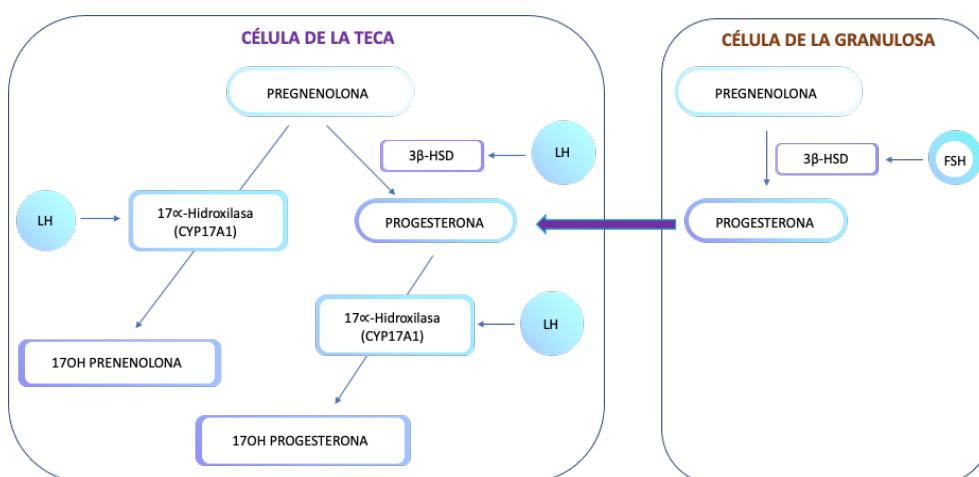


Figura 3: Esteroidogénesis durante la fase folicular temprana. Modificado de Charlotte Sonigo et al., 2014.

## Introducción

### **1.1.2 Acciones de las gonadotropinas en fase folicular avanzada y preovulatoria**

En el ciclo natural normal, el folículo dominante continúa creciendo y diferenciándose a pesar de que la concentración sérica de la FSH, y con ella su actividad sobre la granulosa, va decreciendo a medida que progresa el crecimiento folicular terminal. Ello se debe a que este folículo ha incrementado su sensibilidad a las gonadotropinas, de forma mucho más acusada que los no dominantes, lo que incluye el establecimiento progresivo de sensibilidad a la LH (Rimon-Dahari, Yerushalmi-Heinemann et al. 2016).

Mientras que la acción tecal de LH es relativamente constante a lo largo de ciclo, el efecto sobre la granulosa tiene un perfil más evolutivo, lo que está en probable relación con la modificación cíclica de sus receptores (Borgbo, Povlsen et al. 2013). Está bien establecido que la receptividad folicular a la acción de LH es mínima en los folículos antrales precoces, y va aumentando con el crecimiento folicular, de forma que se sigue incrementando incluso a pesar de la paulatina reducción de la sensibilidad a FSH (Jeppesen, Kristensen et al. 2012). La expresión de receptores a LH en las CG se va incrementando gradualmente a lo largo de la fase folicular, y es máximo en el momento de la ovulación. Se ha observado que en fase folicular tardía la estimulación de la síntesis de progesterona mediada por LH es tres veces más intensa que la ejercida por la FSH (Lindeberg, Carlstrom et al. 2007).

La interacción de la LH con su receptor de la CG estimula la síntesis de dos enzimas clave para la esteroidogénesis: la enzima de desdoblamiento de la cadena lateral del colesterol (CYP11a, P450sc;

## Introducción

*P450 side-chain cleavage enzyme*) y la aromatasa (CYP19, CYP19; P450 aromatase enzyme). En estudios de fisiología folicular realizados en modelos de cultivo *in vitro* en CG folicular de rata se ha observado que la expresión de ARNm codificante de CYP19 fue intensamente estimulada por la acción de FSH y LH, y que tanto la expresión de CYP19, como la síntesis de progesterona fueron máximas sólo en presencia de ambas gonadotropinas en el medio de cultivo (Yong, Baird et al. 1992). Por tanto, el papel regulador de la LH sobre la esteroidogénesis no sólo residiría en la estimulación de la síntesis tecal del sustrato, los andrógenos, sino también en la regulación de la propia actividad aromatasa (Borgbo, Povlsen et al. 2013).

Las Células de la Teca (CT) (Devroey, Fauser et al. 2009) responden a la acción de LH transformando pregnenolona en andrógenos, parte de los cuales es a su vez se aromatizan a estrógenos en la granulosa por la acción de la CYP19, cuya actividad está estimulada por la FSH. Otra fracción de los andrógenos tecaes difunde hasta la granulosa y alcanza el líquido folicular, y una tercera pasa a la circulación general. En los ciclos naturales, la concentración plasmática de LH es relativamente constante durante la fase folicular, y su acción estimula, por medio de la ocupación de una pequeña fracción de receptores disponibles, una producción androgénica tecal suficiente (Richards, Ren et al. 2018). Esta oferta sostenida de sustrato para la aromatización permite, en virtud del incremento de la acción aromatasa mediada por la FSH, en especial en el folículo dominante, un incremento progresivo de la síntesis de estradiol. La cuantificación diferencial de estradiol y progesterona en sangre venosa procedente del ovario en el que reside el folículo dominante y del contralateral ha revelado que la síntesis de estradiol y de progesterona radica predominantemente en el ovario

## Introducción

donde se localiza el folículo ovulatorio (Liu, Qin et al. 2020). Ello expresa la clara heterogeneidad funcional cuantitativa de las CG de la cohorte folicular en desarrollo terminal, que tiene como sustrato el diferente grado de expresión de receptores a gonadotropinas y la distinta intensidad de las actividades enzimáticas que dependen de aquéllas.

Aunque en la teca predomina la síntesis de andrógenos, sus células también son capaces de sintetizar progesterona en cantidades significativas (Tsang, Ainsworth et al. 1985). A diferencia de otros pasos de la esteroidogénesis, las actividades enzimáticas responsables de la síntesis de progesterona son unidireccionales, por lo que ésta puede considerarse el producto final de la síntesis de esteroides ováricos (Fatemi and Van Vaerenbergh 2015).

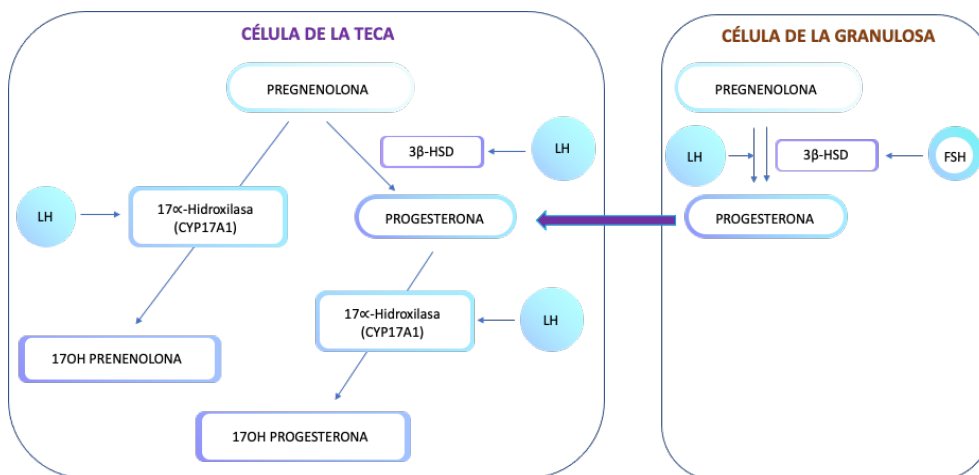


Figura 4: Esteroidogénesis durante la fase folicular tardía. Modificado de Charlotte Sonigo et al., 2014.

## Introducción

### 1.1.3 Otros reguladores endocrinos y paracrinos

El desarrollo folicular ovárico es un proceso independiente en su inicio de la regulación gonadotrópica, mientras que en sus fases terminales está estrechamente regulado por las gonadotropinas. El ovocito, las CG y las CT (Devroey, Fauser et al. 2009) son los principales componentes del folículo, y las funciones e interacciones entre ellos juegan un papel crucial en la esteroidogénesis, en el desarrollo y atresia folicular. La comunicación funcional entre las CG y el ovocito, en gran parte está facilitada por las Uniones en Hendidura (GAP), siendo esencial para la culminación de la ovogénesis y para la formación y maduración del folículo, así como para el desarrollo embrionario tras la fertilización.

Durante todo el proceso de diferenciación folicular desde el comienzo de la progresión a partir de folículo primordial, múltiples factores intraováricos sintetizados por los diferentes compartimentos funcionales del folículo son esenciales en la modulación de las acciones de las gonadotropinas (Christenson and Stouffer 1997) (Richards, Hartman et al. 1994). Estos factores desempeñan acciones moduladoras autocrinas y paracrinas sobre los procesos de diferenciación folicular, incluyendo la maduración ovocitaria, la luteinización de las CG y de las CT, así como de la extrusión ovocitaria (Zhao, Qiao et al. 2011). Algunos factores paracrinos tales como el Factor de Crecimiento Diferenciador 9 (GDF-9) y la Proteína Morfogénica ósea 15 (BMP-15) son secretados de forma específica por el ovocito (Belli and Shimasaki 2018). Estos factores regulan la formación del folículo y la proliferación y diferenciación de las CG y las CT.

Por otro lado, el Factor de Crecimiento Insulínico Tipo 1 (IGF-I), y las hormonas peptídicas activina, la inhibina, la folistatina y hormona

## Introducción

antimülleriana (AMH) son secretadas por las CG, y actúan como reguladores autocrinos / paracrinos de procesos tan relevantes como la sensibilidad de las CG a la acción de la FSH (Silva, Figueiredo et al. 2009) (Dewailly, Robin et al. 2016). Por su parte, las CT no constituyen un mero componente estructural del sostén conjuntivo perifolicular, sino que proporcionan andrógenos necesarios para la biosíntesis de estrógenos en las CG, y también capaces de regular la receptividad a FSH en la granulosa (Liu, Qiao et al. 2015).

Las CT expresan transcritos de ARNm que codifican receptores para IGF-I e insulina. La insulina y el IGF-II pueden activar los receptores de IGF-I, proporcionando esta vía un método para ejercer una influencia paracrina sobre las CG y una actividad autocrina en la teca, aumentando la estimulación de la producción de andrógenos por la LH. El IGF-II es capaz de estimular la esteroidogénesis y la proliferación de las CT y de las CG (Silva, Figueiredo et al. 2009).

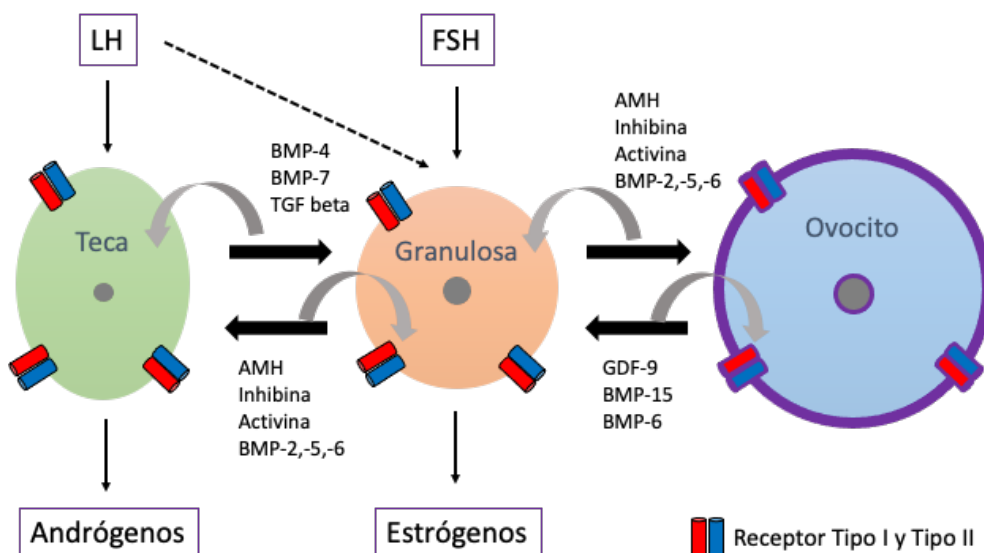


Figura 5: Implicación de la superfamilia de los TGF- $\beta$  en la comunicación entre las Células de la Teca y las Células de la Granulosa y las Células de la Granulosa y el ovocito. Modificado de Phil G. 2006.

## Introducción

### **1.1.4 Cambios funcionales propios de la luteinización fisiológica: Inicio de la síntesis de progesterona**

Los receptores de progesterona, en respuesta a los estrógenos, empiezan a aparecer en las CG del folículo dominante en el período preovulatorio. La progesterona preovulatoria y la expresión de los receptores de progesterona inhiben directamente la mitosis de las CG (Laborde, Carril et al. 1976), lo que probablemente explique la limitación de la proliferación de estas células a medida que adquieren receptores de la LH.

A partir del inicio de la LH y antes de su pico máximo, las concentraciones de progesterona en el folículo aumentan hasta el momento de la ovulación. La progesterona aumenta la distensibilidad de la pared del folículo, lo que constituye un cambio en la elasticidad de la pared folicular que resulta clave para el rápido crecimiento del antro, cuya velocidad se incrementa de forma muy acusada cuando la ovulación es inminente. La FSH, la LH y la progesterona también estimulan la actividad de las enzimas proteolíticas, lo que provoca la digestión del colágeno en la pared folicular y un aumento de la distensibilidad. En contraposición, la síntesis de estradiol desciende a medida que la LH alcanza su máximo, lo que puede ser una consecuencia de la regulación a la baja de la LH sobre sus propios receptores en el folículo.

Las CG unidas a la membrana basal que rodean el folículo son las primeras en mostrar las transformaciones asociadas a la luteinización: aumenta su tamaño, y adoptan un aspecto vacuolado característico asociado a la acumulación de luteína. Tras el cese del pico de la LH, los capilares empiezan a penetrar en la capa de la granulosa y alcanzan la

## Introducción

cavidad central. La angiogénesis es una característica importante del proceso de luteinización, una respuesta a la LH que está mediada por el Factor de Crecimiento Endotelio Vascular (VEGF) y las Angiopoyetinas (ANG) producidos en las CGLOH. Trascurridos 8-9 días de la ovulación, se alcanza un pico de proliferación vascular, asociado a concentraciones plasmáticas máximas de progesterona y estradiol. La persistencia funcional y la capacidad esteroidogénica del Cuerpo Lúteo (CL) dependen de la secreción tónica continua de LH. La función normal del CL requiere la presencia continua de pequeñas cantidades de LH (Havelock, Rainey et al. 2004).

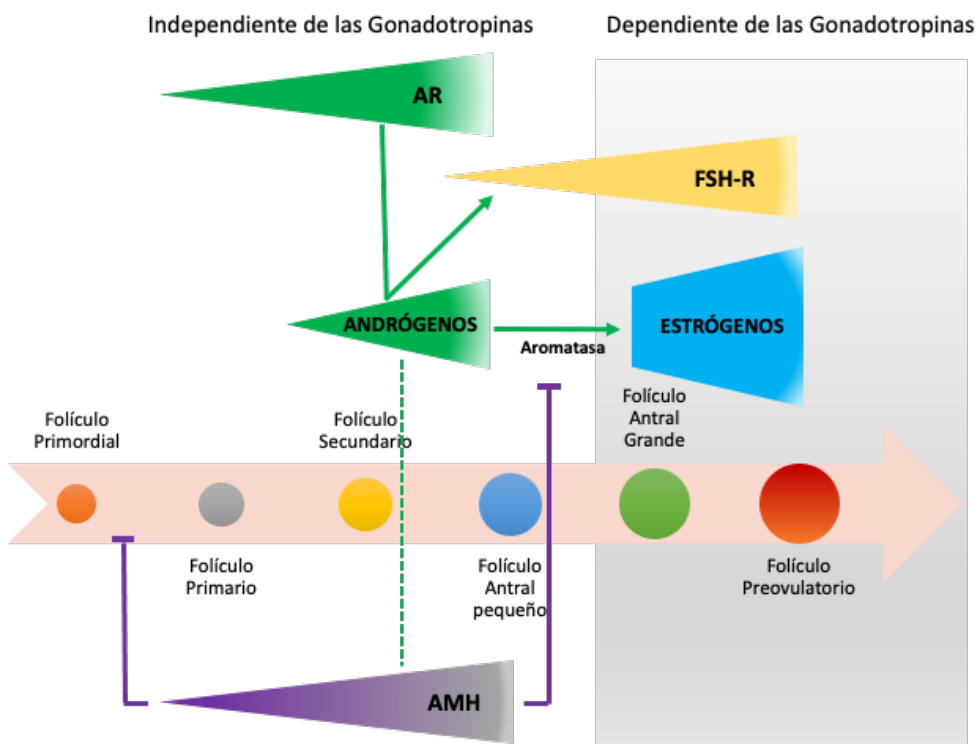


Figura 6: Acción de los andrógenos en las Células de la Granulosa de los folículos preantrales. Modificado de Didier Dewailly, 2016.

## Introducción

### **1.2 Expresión molecular de la diferenciación folicular en las células granulosas**

#### **1.2.1 Asociada a modificaciones morfofuncionales**

##### **1.2.1.1 Disminución de la cohesividad celular**

Como ya se ha descrito, las uniones GAP son un tipo de uniones celulares muy abundantes en la granulosa ovárica, y que median la comunicación célula-célula en organismos multicelulares. Estos canales conectan de forma directa dos células vecinas permitiendo el paso intercelular de pequeñas moléculas, iones y metabolitos (Caspar, Goodenough et al. 1977) (Makowski, Caspar et al. 1977).

Las uniones GAP están formadas por conexinas, que constituyen una familia de proteínas estructurales transmembrana (Beyer, Paul et al. 1990) (Sohl and Willecke 2003). En mamíferos, las uniones GAP está presentes en la mayoría de los tejidos jugando un papel importante en un amplio rango de situaciones tanto fisiológicas como patológicas (Nielsen, Axelsen et al. 2012). En el sistema reproductor femenino y masculino, las comunicaciones intercelulares a través de uniones GAP están implicadas en diferentes situaciones tales como la espermatogénesis, esteroidogénesis, foliculogénesis, oogénesis y en la formación del CL (Pointis, Fiorini et al. 2005) (Gershon, Plaks et al. 2008). Aunque la existencia de uniones GAP no es exclusiva de la granulosa (Borowczyk, Johnson et al. 2006), su relevancia funcional es mucho mayor en este compartimento folicular, donde constituyen un sistema de transmisión y amplificación de señales intercelulares, que en cierto modo reemplaza la red vascular, de la que carece la granulosa, y que permite a ésta comportarse como un sincitio funcional una vez que la proliferación de las uniones GAP es suficiente (Johnson, Redmer et al.

## Introducción

2002). Dentro de la familia de las conexinas, la Conexina 37 (Cx37) y la Conexina 43 (Cx43) son las isoformas que se expresan más abundantemente en el ovario de diferentes especies, jugando un papel importante en la modulación del crecimiento folicular y la maduración ovocitaria (Simon, Goodenough et al. 1997) (Ackert, Gittens et al. 2001). Las uniones GAP entre las CG y el cúmulo están formadas principalmente por la Cx43, mientras que las uniones GAP formadas por la Cx37 conectan los ovocitos con las células del cúmulo (Kidder and Mhawi 2002).

El Factor de Crecimiento Transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es un polipéptido multifuncional, que da nombre a una superfamilia de péptidos que ejercen funciones propias de citoquinas, de mediadores paracrinos e incluso de hormonas peptídicas. Este polipéptido desempeña un papel importante en la modulación de la proliferación y diferenciación, en la formación de la matriz extracelular y otros procesos de desarrollo en algunos tipos celulares (Sporn, Roberts et al. 1986) (Rizzino 1988) (Glick 2004). Estudios inmunocitoquímicos han mostrado que el TGF- $\beta$  y su receptor se expresan en ovario humano durante diferentes momentos, siendo el TGF- $\beta$ 1 la isoforma predominante en las células ováricas humanas (Chegini and Williams 1992) (Roy and Kole 1998).

Algunos estudios han reconocido al TGF- $\beta$ 1 un papel crucial en la modulación de la expresión de la Cx43 en las CG. Estudios *in vitro* en ratones hembra *knockout* han revelado que el TGF- $\beta$ 1 está implicado en diferentes funciones reproductoras, incluyendo la foliculogénesis, la expansión del cúmulo y la ovulación (Juengel and McNatty 2005) (Li, Agno et al. 2011) (Fang, Xu et al. 2014). En un estudio reciente de Yu-Ching Chen (Chen, Chang et al. 2015) realizado sobre cultivos de CG

## Introducción

humanas, se concluye que la Cx43 se sobre expresa por la acción del TGF- $\beta$ 1, lo cual contribuye al incremento de la formación de uniones GAP en la granulosa. Otros autores han descrito que el TGF- $\beta$ 1 se expresa tanto en CG como en CT (Devroey, Fauser et al. 2009) del folículo ovárico humano (Chegini and Williams 1992). Adicionalmente, estudios realizados en el ámbito clínico han mostrado que los niveles del TGF- $\beta$ 1 en el líquido folicular obtenido para la recuperación ovocitaria se correlaciona positivamente con las frecuencias de fecundación ovocitaria y de gestación (Fried and Wramsby 1998). Estos resultados sugieren la presencia de un mecanismo autocrino/paracrino en las CG del cúmulo mediado principalmente por el TGF- $\beta$ 1, que promovería la producción de la Cx43 y con ella el número de uniones GAP, intensificando así la posibilidad de magnificación de la señalización intercelular en la granulosa necesarias para el intercambio de señales de transducción en los folículos en crecimiento.

La regulación de la expresión génica de la Cx43 en el ovario humano parece estar regulada no sólo por el TGF- $\beta$ 1 sino por otros sistemas peptídicos, entre los que destaca el de las Proteínas Morfogenéticas del Hueso (*Bone Morphogenetic Proteins; BMPs*). Este conjunto de factores de crecimiento, también perteneciente a la superfamilia del TGF- $\beta$ , están implicadas en la regulación de un amplio conjunto de procesos celulares. En el mencionado estudio de Yu-Ching Chen (Chen, Chang et al. 2015) se ha observado la capacidad del ovocito para la síntesis del BMP15, y la de las CT para producir las isoformas BMP4 y BMP7. Se ha postulado que su acción es la modulación paracrina de la expresión de la Cx43 y en la comunicación intercelular en CG humanas (Chang, Cheng et al. 2013) (Chang, Cheng et al. 2014), ya que la expresión de la Cx43 se

## Introducción

sobre regula por la acción del TGF-  $\beta$ 1, pero se ve disminuida por la acción de la BMP en las CG humanas *in vitro*.

La comunicación entre las CG mediante uniones GAP conformadas por la Cx43 es necesaria para sustentar la proliferación de estas células durante el desarrollo folicular (Kidder and Mhawi 2002). En ovarios con deficiencia en la Cx43, una disminución en las comunicaciones intercelulares entre las CG deriva en reducción del crecimiento folicular y favorece la apoptosis (Ackert, Gittens et al. 2001) (Gittens, Barr et al. 2005). Una vez activados los mecanismos preovulatorios dependientes de la LH, la expresión de conexas, y en concreto de la Cx43, experimenta una reducción progresiva, como han observado de forma consistente distintos estudios realizados en folículos preovulatorios humanos (Borowczyk, Johnson et al. 2006) y de distintas especies de mamíferos (Wiesen and Midgley 1993) (Granot and Dekel 1994). Estas observaciones son coherentes con la hipótesis de que el pico preovulatorio de la LH es el principal responsable de la sustancial disminución de la expresión de mRNA de la Cx43 tras la ovulación (Granot and Dekel 2002) (Sela-Abramovich, Chorev et al. 2005).

La Cx43 es también la principal proteína constitutiva de las Uniones GAP presentes en el CL (Grazul-Bilska, Reynolds et al. 2001). Los datos publicados por Ewa Borowczyk sugieren que la expresión de la Cx43 es relativamente más alta a lo largo de la fase lútea, y cambia a lo largo del crecimiento del CL, la diferenciación y regresión del mismo (Borowczyk, Johnson et al. 2006).

Aunque el CL precoz cuenta ya con una vascularización incipiente, la velocidad e intensidad de algunos procesos de transformación funcional

## Introducción

podría estar favorecida por la red de uniones intercelulares generada a lo largo de la fase folicular (Redmer, Doraiswamy et al. 2001). Igualmente, el mantenimiento de la expresión de la Cx43 durante la luteolisis, y la consiguiente persistencia de uniones GAP intercelulares pueden constituir uno de los mecanismos de la cascada de la declinación funcional del CL (Niswender, Juengel et al. 1994).

### 1.2.1.2 Angiogénesis

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos que surgen a partir de los ya existentes en un proceso que implica la migración y proliferación de células (Abulafia and Sherer 2000). La angiogénesis en el ovario es un proceso importante en el desarrollo y función ovárica (Reynolds and Redmer 1999) (Fraser and Lunn 2000) (Berisha, Meyer et al. 2010). La formación del CL se inicia por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células de la teca interna y de la granulosa que tienen lugar específicamente en los folículos preovulatorios (Schams, Berisha et al. 2002) (Berisha and Schams 2005). La constitución del CL a partir de folículo ovulatorio, así como su mantenimiento funcional, dependen estrechamente del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y del establecimiento de un flujo vascular al CL, que aporte la acción trófica endocrina de la LH, y que permita el transporte sistémico de la progesterona.

El ovario fue uno de los primeros órganos en el cual se detectó la producción local de factores de crecimiento con actividad angiogénica (Gospodarowicz and Thakral 1978). Dentro del numeroso conjunto de promotores de la angiogénesis sintetizados en el ovario, cabe destacar el VEGF, el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), el IGF y las ANG.

## Introducción

El VEGF es un potente factor angiogénico. Diferentes estudios indican que este factor de crecimiento puede estar implicado en la regulación fisiológica de la angiogénesis ovárica. Se expresa y es secretado en el ovario humano de modo que tiene un papel fundamental tanto en la angiogénesis como en la regulación de la permeabilidad vascular, procesos que son críticos tanto para la foliculogénesis ovárica, como para el desarrollo de una función reproductiva normal (Robinson, Woad et al. 2009).

Los receptores del VEGF se expresan tanto en las células endoteliales que participan en la angiogénesis (Shweiki, Itin et al. 1993) como en el endotelio quiescente (Jakeman, Winer et al. 1992). Parece ser que la expresión de estos ligandos está regulada tanto por gonadotropinas como por mecanismos autocrinos o paracrinos dependientes de esteroides ováricos. Este conjunto de señales promovería un microambiente estimulador de la proliferación de las células endoteliales cercanas. Además, la expresión de mRNA del VEGF en tejidos neovascularizados sugiere un papel adicional del VEGF en el mantenimiento de la vascularización ovárica y/o en el control de la permeabilidad.

La función básica del VEGF es la inhibición de la apoptosis de las células endoteliales, cuya viabilidad resulta imprescindible para la proliferación de los capilares neoformados. Se ha observado que se requiere de un cierto nivel de expresión del VEGF-A para inhibir la apoptosis endotelial (Robinson, Woad et al. 2009). El FGF-2 desempeña una acción amplificadora y moduladora del efecto del VEGF. En experimentos *in vitro* clásicos, realizados sobre células bovinas procedentes de folículos en desarrollo y del CL, se comprobó que la

## Introducción

adición simultánea del VEGF-A y del FGF-2 indujo una respuesta angiogénica mucho más intensa y rápida que la observada cuando las células fueron cultivadas en presencia de cada una de estas dos citoquinas por separado (Pepper, Ferrara et al. 1992) (Gabler, Plath-Gabler et al. 2004).

En el CL humano se han identificado niveles elevados de expresión del VEGF durante la fase lútea temprana, expresión que se reduce en fase lútea tardía (Otani, Minami et al. 1999) (Wulff, Wilson et al. 2000). Los datos de este estudio muestran una tendencia hacia la disminución de la expresión del VEGF a medida que la vida del CL avanza.

El papel funcional del VEGF, de la ANG 1 y de la ANG 2, y de su receptor Tirosina Quinasa (Tie-2) en la regulación de la angiogénesis en el ovario humano comenzó a ser evaluado por estudios como el de Wulff (Wulff, Wilson et al. 2000), que describió los cambios en la expresión del ARNm de la ANG-1, de la ANG-2 y del Tie-2 a lo largo de la luteogénesis, la fase mesolútea, la luteolisis fisiológica y el rescate experimental del CL, lo cual fue diseñado a partir de los hallazgos de estudios previos sobre regulación de la expresión del VEGF y de sus receptores (Gordon, Mesiano et al. 1996) (Otani, Minami et al. 1999). Los resultados de estos autores indican que la expresión del VEGF, y de la ANG y su receptor, experimentan modificaciones a lo largo de todas las etapas funcionales del CL estudiadas, y que la expresión de estos factores difiere entre distintos tipos celulares. Mientras que el mRNA de la ANG-1 se expresaba a bajos niveles en la mayoría de las células lúteas, el mRNA de la ANG-2 se detectó predominantemente en células lúteas individuales y en células endoteliales, y el VEGF se expresó de una forma intensa en la mayoría de las CGLOH. Por su parte, el receptor

## Introducción

Tie2 se localizó exclusivamente en las células endoteliales. Estos resultados sugieren que las células lúteas intervienen en la regulación paracrina del crecimiento y desarrollo de los vasos del CL, pero también en su regresión funcional y en su eventual rescate.

Durante la fase lútea temprana, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos es necesario para sustentar al CL, por lo que la elevada expresión del VEGF en las CGLOH del CL precoz es coherente con su hipotético papel de potente inductor de la angiogénesis (Fraser and Lunn 2000). Además, se ha descrito que la ANG-1 es necesaria para la estabilización de los nuevos capilares en formación. En el citado estudio de Wulff (Wulff, Dickson et al. 2001), se observó una expresión elevada de la ANG-1 durante la fase lútea temprana, asociada con elevados niveles del receptor Tie-2. Durante la fase lútea media, cuando la capilaridad ya se ha establecido, la ANG-1 y el receptor Tie-2 disminuyen.

Las acciones de la ANG-2 resultan más complejas, ya que ejerce una inhibición competitiva del efecto de la ANG-1 como estabilizador vascular, a través de la ocupación del receptor Tie-2. Además, parecer ser capaz de inducir por sí mismo la disrupción de los vasos neoformados (Maisonpierre, Suri et al. 1997). Sin embargo, en presencia del VEGF, la ANG-2 mejora por el contrario la migración capilar y la neovascularización (Hanahan 1997) (Gale and Yancopoulos 1999). Maisonpierre (Maisonpierre, Suri et al. 1997) ha propuesto que las áreas del CL con intensa expresión de la ANG-2 durante la fase lútea temprana corresponden a regiones con una angiogénesis en desarrollo. En su modelo experimental *in vivo*, realizado en ovarios de rata, la expresión de la ANG-2 fue particularmente evidente en el área de la

## Introducción

región central del CL en desarrollo. Por el contrario, esta expresión sólo fue detectada de forma ocasional en los vasos de la periferia del CL, es decir, en las inmediaciones de la vascularización tecal original. En consonancia con esta hipótesis, la expresión de la ANG-2 fue indetectable una vez completado el proceso de luteinización. En contraste con estos resultados, el estudio de Wulff (Wulff, Wilson et al. 2000) no constata una reducción progresiva de la ANG-2 en el CL humano a medida que progresa la edad funcional del CL, sino que la expresión de la ANG-2 tiende a progresar desde la fase lútea precoz a la tardía, aunque su incremento no alcanza significación estadística.

A pesar de que tanto los niveles de la ANG-1 como de la ANG-2 presentan un patrón ascendente a lo largo de la fase lútea según los resultados del estudio de Wulff, la ratio ANG-2/ANG-1, que representaría el balance final de sus acciones antagónicas, tiende a incrementarse, lo que ayudaría a comprender el efecto predominante de la ANG-2 a pesar de que la expresión de la ANG-1 vaya en aumento. El crecimiento de la ratio ANG-2/ANG-1 también ha sido observado en el CL de bovinos durante la luteolisis (Goede, Fleckenstein et al. 1998). Junto con la disminución de los niveles del VEGF durante la fase lútea, la elevación de la ratio ANG-2/ANG-1 en el CL tardío puede promover la ruptura vascular, lo cual se acentuaría durante la luteolisis.

La observación más relevante respecto a la dinámica de expresión lútea de la ANG-2, del VEGF, y del receptor Tie-2 es el acusado incremento durante el rescate lúteo (Wulff, Wilson et al. 2000). En consistencia con estos hallazgos, estudios mediante cultivo *in vitro* de CGLOH humanas revelan que el tratamiento con la Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) conduce a un aumento de los niveles del VEGF, que podría ser el

## Introducción

mediador de la intensa vascularización del CL inducida por el efecto de la hCG (Neulen, Raczek et al. 1998).

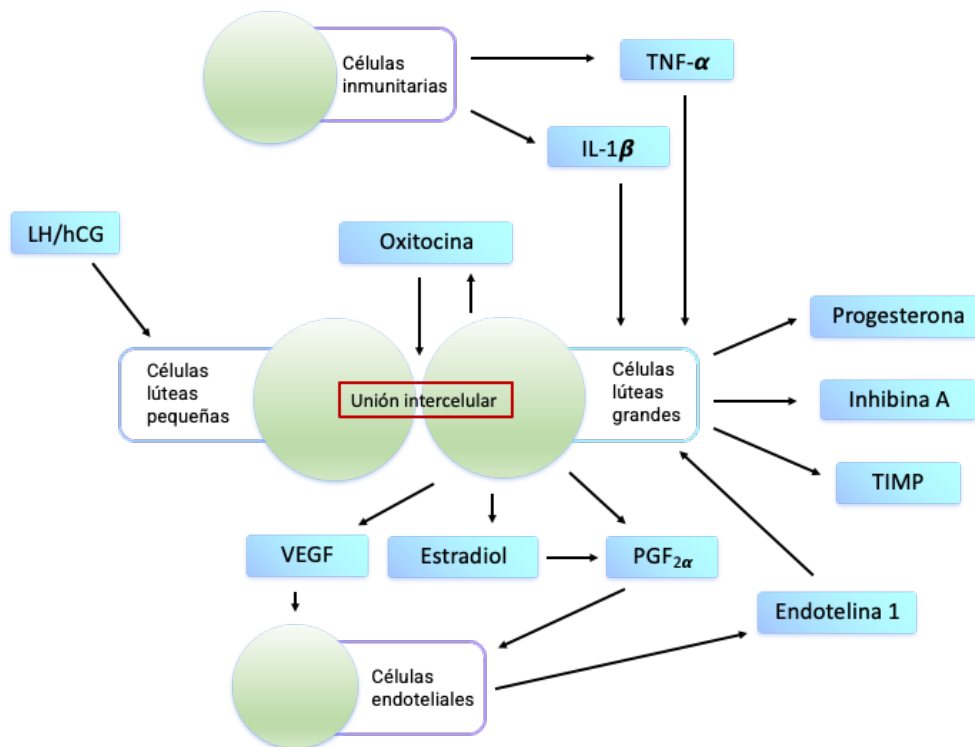


Figura 7: Angiogénesis. Modificado de Leo Speroff 7ª Edición.

### 1.2.2 Asociada a cambios funcionales

#### 1.2.2.1 Síntesis de citoquinas citotróficas

##### Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

Basándose en la acumulación de gonadotropinas en el folículo dominante, se ha sugerido que la permeabilidad vascular está implicada en la selección folicular (Zeleznik, Schuler et al. 1981). El VEGF en la capa de Células de la Teca (Kamat, Brown et al. 1995) probablemente modula la permeabilidad vascular. Esta modulación puede ser un

## Introducción

mecanismo por el cual la acumulación diferencial de gonadotropinas es posible. Por consiguiente, la abundante vascularización de la capa de las CT es probablemente crítica para las gonadotropinas que son dependientes del crecimiento folicular y del acceso a los estrógenos, producidos en la capa avascular de las CG por aromatización de los andrógenos tecales, de la circulación sistémica. A pesar de la aparente producción del VEGF por las CG, esta capa permanece avascular antes de la ovulación, implicando que la membrana basal folicular separa la teca y las CG, jugando un papel importante en la prevención de la vascularización de la granulosa.

El grupo de Christine Wulff (Wulff, Dickson et al. 2001) , en un estudio realizado en primates, demostró por medio de la restricción de la angiogénesis tecal en folículos en desarrollo, que éste es el mayor regulador de la angiogénesis folicular. La inhibición de este factor de crecimiento fue llevada a cabo por restricción de la angiogénesis tecal en folículos en desarrollo. Para ello se usó un antagonista, el VEGF Trap R1R2, formado por un dominio extracelular de los dos receptores del VEGF, el VEGF-R1 y el VEGF-R2, que fue administrado a títulos a lo largo de la fase folicular. La eficacia del VEGF Trap R1R2 para suprimir la angiogénesis tecal, fue testado usando Bromodeoxyuridina (BrdU) como marcador de proliferación, la Molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas (CD31) como un marcador específico endotelial y una doble tinción para distinguir entre proliferación celular endotelial y no endotelial. La influencia en el desarrollo folicular fue evaluada mediante imágenes morfológicas y morfométricas para cuantificar la proliferación de CG, y la muerte de estas células fue cuantificada mediante la detección de apoptosis por TUNEL (Kim, Boone et al. 1998).

## Introducción

Este estudio, mediante la inhibición del VEGF, ha establecido la importancia de la vascularización tecal para el desarrollo folicular. La expresión del VEGF se incrementó, mientras que la expresión del gen del receptor de este factor de crecimiento disminuyó. Este es el primer estudio que demostró que la supresión de la angiogénesis folicular está asociada con la inhibición del desarrollo antral, resultando en la inhibición de la ovulación. El tratamiento con el VEGF Trap R1R2 resultó en la supresión de la angiogénesis tecal en folículos secundarios y terciarios, así como la reducción del desarrollo tecal.

En este mismo estudio se observó una correlación lineal significativa entre el grosor tecal y el diámetro folicular en folículos secundarios, observándose un desarrollo tecal durante los estadios de folículo secundario y preantral y un desarrollo ya establecido en el folículo antral. Tras la exposición a VEGF Trap R1R2, la proliferación en la teca se redujo drásticamente, y el grosor tecal fue disminuyendo en los folículos secundarios tardíos y terciarios. Asumiendo que solo el 25–30% de las células proliferativas en la teca son células de origen endotelial (Wulff, Dickson et al. 2001), el tratamiento con el VEGF Trap R1R2 debería tener efectos inhibitorios secundarios en la proliferación de las células no endoteliales. Esta reducción en la proliferación tecal junto con la ausencia de capilares en la teca explica por qué el grosor tecal disminuye. La apariencia hipertrófica de las células de la teca y su núcleo alargado son probablemente señales de degeneración, posiblemente como resultado de la reducida disponibilidad de LH como consecuencia de la reducción del desarrollo vascular.

Aunque el crecimiento del folículo secundario, como indicativo de la proliferación de las CG, parece no verse afectado por la inhibición del

## Introducción

VEGF (a pesar del reducido desarrollo tecal), la deficiencia de la microvascularización tecal en los folículos terciarios podría ejercer efectos secundarios deletéreos en el crecimiento folicular antral. El diámetro folicular es principalmente dependiente del tamaño del compartimento granuloso, específicamente en los folículos terciarios. En tales folículos, la proliferación de las CG fue restringida de forma severa tras el tratamiento con el VEGF Trap R1R2; en la misma medida el tamaño del diámetro folicular de los folículos terciarios se redujo significativamente. Esto sugiere que la limitación del crecimiento folicular observado podría ser una expresión concreta de un conjunto más amplio de fenómenos limitantes de la diferenciación terminal a folículo preovulatorio, y mediados por la interferencia con la señalización de VEGF. La supresión selectiva del desarrollo folicular antral puede ser debida a la reducida disponibilidad de gonadotropinas, especialmente de FSH, la cual se une de forma exclusiva a las CG y estimula la proliferación celular (Yamoto, Shima et al. 1992) (Gougeon 1996). Los lugares de unión de la FSH a las CG son más numerosos en los folículos antrales que en los folículos preantrales, diferenciándose ambos estados en la densidad de receptores de la FSH (Yamoto, Shima et al. 1992). Se cree que la FSH es el estímulo primario para la transición antral (Hirshfield 1991), y la FSH por sí sola es suficiente para inducir la formación del antro en los folículos preantrales humanos cultivados *in vitro* (Roy and Treacy 1993). Por consiguiente, la deficiencia de vascularización determinaría un soporte de FSH y con ella una limitación o supresión de la proliferación de CG y del crecimiento antral preovulatorio.

Es difícil establecer la relación temporal entre el inicio de la atresia y los cambios en la vascularización. Sin embargo, una correlación entre la

## Introducción

deficiencia de la vascularización y la atresia se ha observado tras el tratamiento con el VEGF Trap R1R2. Se ha visto que la FSH es un protector frente a la apoptosis, y por tanto favorecedor de la pervivencia funcional de las CG (Chun, Eisenhauer et al. 1996) (Chun, Eisenhauer et al. 1996). Por consiguiente, la reducida disponibilidad de FSH debida a la falta de microvascularización tras el tratamiento con el VEGF Trap R1R2 puede causar un incremento en la atresia folicular. Se ha observado una disminución de la vascularización en folículos atrésicos (Wulff, Dickson et al. 2001). Estos resultados sugieren que el proceso de atresia que ocurre de forma natural podría ser promovido y mantenido por la deficiencia de la angiogénesis tecal.

### **Factor de Crecimiento Insulinoide (IGF-1)**

El crecimiento del folículo es el resultado de una combinación de diferentes procesos celulares: elevada proliferación de las CG, baja tasa de apoptosis de las mismas, acumulación de líquido intercelular que confluye en el antro, e incremento del tamaño del ovocito. Diferentes experimentos han analizado el papel del EGF y del IGF-I en la regulación del crecimiento del folículo preantral y la formación del antro y en la proliferación y apoptosis de las CG en folículos preantrales cultivados *in vitro*.

Las primeras observaciones sobre la acción del IGF-I en el crecimiento folicular describieron su expresión en las CG aumentado la secreción de estradiol (Veldhuis and Furlanetto 1985) (Huang, Shi et al. 1996) (Matsuda, Inoue et al. 2012). Otros estudios mostraron que la adición del IGF-I a cultivos primarios de CG asiladas a partir de folículos antrales porcinos se asociaba a un aumento de la proliferación mitótica de la granulosa (Baranao and Hammond 1984) (May, Frost et al. 1988)

## Introducción

y a una reducción de la apoptosis espontánea (Guthrie, Garrett et al. 1998).

Aunque existen evidencias acerca del posible efecto directo del IGF-I sobre los ovocitos, las acciones tróficas más conocidas de esta citoquina, y en apariencia más relevantes, son ejercidas sobre la granulosa. Se ha comprobado la expresión del mRNA del IGF-I y de su receptor, tanto en ovocitos en crecimiento humanos (Bondy and Zhou 1993) como en ovocitos de folículos antrales porcinos (Quesnel 1999). Sin embargo, según observaciones de Genazzani (Genazzani, Strucchi et al. 2006), aunque los folículos cultivados en presencia del IGF-I produjeron con mayor frecuencia ovocitos recuperables, el IGF-I parecía no tener efectos directos sobre el crecimiento ovocitario. Estos resultados indican que el IGF-I puede ejercer una regulación clave en el crecimiento folicular, aunque precisaría la acción adicional, o independiente, de otros factores adicionales para promover el crecimiento ovocitario. En apoyo a esta hipótesis, Wu et al. (Wu, Sallinen et al. 2000) mostraron que cocultivos de folículos preantrales porcinos con células del cúmulo aisladas a partir de folículos antrales grandes (>3mm de diámetro) estimulaban el crecimiento ovocitario. Por lo tanto, algunos factores secretados por las células del cúmulo de los folículos antrales, como el IGF-I, ejercen efectos beneficiosos en el crecimiento ovocitario y en su desarrollo.

## Introducción

### **Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)**

El EGF tiene diferentes efectos en los folículos preantrales y estos efectos en el crecimiento folicular pueden ser debidos principalmente a la supresión de la apoptosis y a la estimulación de la formación del antro (Matsuda, Inoue et al. 2012). La concentración del EGF es más alta en el líquido folicular de los folículos antrales pequeños ( $13.6 \pm 1$  ng/mL) que en los folículos preovulatorios grandes ( $<6$  ng/mL) (Hsu, Holmes et al. 1987). Se piensa que este factor de crecimiento es un mediador de algunas acciones biológicas a través de complejas señales de transducción complejas que implican la activación de proteínas kinasas (Keel, Hildebrandt et al. 1995).

El EGF modula los efectos de FSH sobre la formación del antro folicular favoreciendo la expresión de FSH-R en las células granulosas, hallazgo que se ha evidenciado en CG porcinas (May, Frost et al. 1988). Esa asociación es coherente con los resultados del estudio de Genazzani, que concluyó que el EGF es un claro promotor de la formación del antro. Sin embargo, la simple acción sinérgica de EGF y FSH no parece explicar por completo los fenómenos responsables de la formación del antro. Las células granulosas adyacentes al mismo presentan un claro incremento de fenómenos de apoptosis, y las células que expresan receptores a EGF y se hallan en la vecindad del antro muestran menor capacidad de proliferación. Estos indicios sugieren que pueden existir mecanismos no dilucidados de regulación de la formación antral en los que intervendrían FSH, EGF y quizá otros mediadores (Genazzani, Strucchi et al. 2006). Tanto EGF como IGF-I estimulan la proliferación de las CG y la inhibición de la apoptosis de las CG en folículos preantrales en cultivo. El EGF estimula tanto el crecimiento de los folículos preantrales en vacas (Gutierrez, Ralph et al. 2000), hamsters

## Introducción

(Roy and Treacy 1993), ratón (Boland and Gosden 1994), y humanos (Roy and Kole 1998) en cultivos *in vitro*. También está implicado en la regulación del desarrollo de folículos antrales (Campbell 1999). Cuando los folículos forman el antro, las CG adyacentes al antro sufren apoptosis. Estos resultados indican que el EGF puede estar implicado en la formación del antro folicular en sinergismo con la FSH; sin embargo, el microambiente en el antro puede no ser propicio para la proliferación y supervivencia de las CG. Este indicio es corroborado por la elevada proporción de CG adyacentes apoptóticas en el antro y la baja proliferación celular observada en el grupo de células receptoras del EGF.

### **Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF)**

El HGF ejerce una regulación autocrina y paracrina sobre las CG y sobre el crecimiento y esteroidogénesis de las Células Tecaes (Devroey, Fauser et al.) (Liu, Lin et al. 1994) (Zachow, Ramski et al. 2000. A pesar de que la actividad antiapoptótica de este factor de crecimiento está bien documentada en otros tipos celulares {Lail-Trecker, 1998 #822}, la capacidad del HGF para controlar el inicio de la apoptosis en las CG aún no ha sido demostrada.

Aunque el HGF y su receptor (c-met) se expresan en el interior del ovario de numerosas especies de mamíferos (Liu, Lin et al. 1994) (Ito, Harada et al. 2001) (Shimizu, Iijima et al. 2003), existen controversias acerca del origen celular del HGF y del c-met intraováricos. Se ha visto que el HGF es secretado por las CT (Parrott, Vigne et al. 1994); mientras el c-met se expresa en el interior de las CG (Parrott, Vigne et al. 1994) (Zachow, Ramski et al. 2000). El efecto del HGF como derivado celular de la teca podría tener lugar en el interior de las CG. Sin embargo, el

## Introducción

HGF puede regular la esteroidogénesis en las CT de rata *in vitro* (Zachow, Weitsman et al. 1997), y esto puede sugerir que las CT contienen el c-met. De hecho, las CT y las CG expresan mRNA del HGF (Zachow, Weitsman et al. 1997); por este motivo, en el estudio publicado por Mehmet Uzumcu (Uzumcu, Pan et al. 2006) se propone una amplia función intraovárica del HGF. Este patrón de expresión del HGF y del c-met más elaborado ha sido corroborado en otras especies animales (Parrott, Vigne et al. 1994) (Zachow, Ramski et al. 2000) (Shimizu, Iijima et al. 2003). Un tercer componente del sistema del HGF, es el activador proteico del HGF (HGFA), una serin proteasa que se adhiere al precursor inmaduro del HGF para ceder el paso a la forma madura del HGF (Miyazawa 2010). El HGFA representa un mecanismo de control para regular las concentraciones locales del HGF bioactivo.

Con la intención de definir el papel del HGF durante la foliculogénesis, el estudio de Mehmet Uzumcu (Uzumcu, Pan et al. 2006) investiga el efecto del HGF en el proceso de apoptosis en cultivos de CG de ratas y en folículos aislados, además de estudiar la distribución celular del sistema ovárico del HGF. Se ha descrito que el HGF puede reducir el inicio de la apoptosis en CG de rata *in vitro*. El efecto anti-apoptótico del HGF fue observado tanto en cultivos primarios de CG como en CG aisladas a partir de folículos preantrales de ratas. Los efectos anti-apoptóticos del HGF *in vitro* fue complementado por la observación de folículos en crecimiento que contienen el HGF, el c-met y el HGFA. Por lo tanto, es posible que desde que los folículos en crecimiento contienen un sistema del HGF completo, el HGF soporta la foliculogénesis bloqueando la apoptosis (Uzumcu, Pan et al. 2006).

## Introducción

Estos nuevos datos extienden los estudios previos que mostraban que el HGF modula las CT y la esteroidogénesis *in vitro* de las CG (Parrott and Skinner 1998) (Zachow, Weitsman et al. 1997). Usando CT inmaduras de ratas en cultivo, el HGF disminuye la LH estimulando la producción de andrógenos (Zachow, Weitsman et al. 1997); y en CG inmaduras de rata, el HGF suprime a la FSH suprimiendo la síntesis de estrógenos *in vitro* (Parrott and Skinner 1998) (Zachow, Ramski et al. 2000). Los efectos de regulación a la baja del HGF en la esteroidogénesis ovárica están implicados en la foliculogénesis preantral y en la selección del folículo dominante. El HGF podría bloquear una acumulación anómala de esteroides intrafoliculares que podrían conducir a la atresia folicular (Hutz, Dierschke et al. 1990) (Hillier and Tetsuka 1997. En el estudio de Mehmet Uzumcu {Uzumcu, 2006 #827) se propone que la acción moduladora esteroidea es uno de los mecanismos por el cual el HGF puede impedir la inducción de la apoptosis de las CG *in vivo*. En este estudio se muestra como este factor de crecimiento ejerce un efecto anti apoptótico directo sobre las CG.

Otros estudios han mostrado que el HGF y el c-met se expresan en el ovario. Por ejemplo, el HGF ha sido medido en líquido folicular humano; mientras que el mRNA del HGF y del c-met fue detectado en CG humanas aisladas (Osuga, Tsutsumi et al. 1999). Usando folículos bovinos aislados, Parrott et al. han mostrado que los folículos de mayor tamaño contienen la mayor cantidad de mRNA del c-met y del HGF (Parrott and Skinner 1998); aunque se desconoce el origen exacto de cada uno de ellos.

Previamente se describió como las CG y las CT de ratas responden a la estimulación *in vitro* del HGF (Zachow, Weitsman et al. 1997, Zachow,

## Introducción

Ramski et al. 2000). Aunque en el estudio del año 1997 se describe la presencia del c-met en las CT, este hallazgo ha sido puesto en entredicho por otros autores, sugiriendo que el efecto del HGF en las CT se debe a un fenómeno mediado por factores no definidos que se sintetizan estas células (Lail-Trecker, Gulati et al. 1998). De otro modo, en CG de rata cultivadas *in vitro*, la expresión del c-met se reduce por la presencia de FSH (Zachow, Ramski et al. 2000). Por consiguiente, datos de diferentes investigaciones, abordando el tema tanto *in vivo* como *in vitro*, muestran que el contenido del c-met en las CG puede verse reducido por la estimulación con gonadotropinas. Es probable que el HGF ejerza múltiples niveles de control sobre la función de las CG y de las CT para facilitar la foliculogénesis. En el estudio de Mehmet Uzumcu et al. (Uzumcu, Pan et al. 2006) se sugiere que el sistema del HGF dentro de los folículos preantrales modula a la baja la esteroidogénesis estimulada por gonadotropinas, y simultáneamente soporta la supervivencia de las CG mediante un efecto antiapoptótico.

### 1.2.2.2 Síntesis esteroidea

La esteroidogénesis ovárica es un proceso de biosíntesis de derivados del colesterol, del que se derivan, por sucesiva restricción del número de átomos de carbono, compuestos derivados del *pregnano* (gestágenos), del *androstano* (andrógenos) y del *estrano* (estrógenos). Estas reacciones de síntesis se desarrollan por la acción de un conjunto de actividades enzimáticas que se localizan específicamente en dos de los compartimentos funcionales del folículo: las Células de la Teca (Devroey, Fauser et al.) tienen capacidad de síntesis de andrógenos y progestágenos, mientras que las CG pueden sintetizar progestágenos y estrógenos. La síntesis folicular de estradiol tiene lugar exclusivamente

## Introducción

en la granulosa, como fruto de la actividad de la CYP19, y depende de un sustrato externo, los andrógenos, que debe difundir desde la teca.

El transporte de colesterol al interior de la mitocondria, fase clave de la regulación del proceso de biosíntesis, está facilitada por la Proteína reguladora de la esteroidogénica aguda (StAR), que es uno de los principales reguladores de la producción de andrógenos. Se ha establecido que la androgenización en las CT expresa la CYP11A1, el citocromo P450 C17 (CYP17) y la HSD3B2, las cuales son enzimas clave para la biosíntesis de andrógenos (Liu, Qiao et al. 2015)

### **1.2.2.2.1 Enzima de Escisión de la Cadena Lateral del Colesterol (CYP11A1)**

La actividad de la CYP11A1, que ya se ha definido como el paso limitante de toda la síntesis esteroidea está basalmente regulada por la transcripción de su gen codificador. La regulación crítica depende del nivel de la StAR, que facilita el ingreso de colesterol a las mitocondrias, en cuyo interior se localiza CYP11A1. La expresión de StAR se ve estimulada por los niveles del Adenosin Monofosfato Cíclico (AMPc) y por la acción de la FSH, la LH y la hCG sobre las CG.

### **1.2.2.2.2 Citocromo P450 17A1 (CYP17A1)**

La actividad de la FSH estimula la expresión de la CYP17-ARNm en las Células de la Teca (Devroey, Fauser et al.) pero no en las CG, según se ha constatado en modelos experimentales animales (Smyth, Miro et al. 1993), a pesar de que los receptores de FSH se expresan únicamente en la granulosa. Se ha hipotetizado que la acción promotora de FSH sobre la expresión de la CYP17 podría estar mediada por factores reguladores no hormonales.

## Introducción

Otros factores capaces de modular la actividad la CYP17 son la insulina y los IGF-I e IGF-II, capaces de estimular la síntesis androstendiona en la teca, y la inhibina sintetizada en la granulosa como efecto de la acción de la FSH, que promueve la síntesis tecal de androstendiona (Nahum, Thong et al. 1995). Esta acción de la inhibina sobre la síntesis de andrógenos podría ser el efector de la regulación paracrina de la granulosa sobre la actividad la CYP17 en la teca, dependiente en último término de FSH, y que se añadiría a la propia acción de la LH sobre las CT (Nahum, Thong et al. 1995).

Se han descrito otros sistemas reguladores de la síntesis de la 17-Hidroxipregnenolona, de la Dehidroepiandrosterona (DHEA) y de los andrógenos tecales por medio de la modificación de la actividad de la CYP17, y que incluyen mediaciones por el EGF, por el FGF, por el TGF- $\beta$  y por la activina.

### **1.2.2.2.3 3- $\beta$ -Hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (HSD3B2)**

La producción de progesterona reside fundamentalmente en el ovario, y en mucha menor medida en las suprarrenales. La progesterona ovárica es resultado de la acción de la HSD3B2 sobre la pregnenolona. De acuerdo con la teoría de las “dos células/dos gonadotropinas”, una parte de la progesterona sintetizada en la granulosa difunde a la teca donde se transforma en 17-OH-progesterona por la acción de la CYP17, que sólo poseen las células de este compartimento folicular. La 17-OH-progesterona sigue después la ruta de transformación en andrógenos y su conversión posterior a estrógenos.

La síntesis ovárica de progesterona comienza a incrementarse al final de la fase folicular, y de forma claramente anterior al pico de la LH

## Introducción

(Hoff, Quigley et al. 1983). Además, existen algunas pruebas de la implicación de este incremento sutil de progesterona en la emergencia del pico de la LH (Couzinet, Brailly et al. 1992), y que la exposición secuencial a niveles adecuados de estrógenos seguidos de progesterona resulta imprescindible para el desencadenamiento del aumento crítico de la LH (Micevych and Sinchak 2008). Estos datos sustentan la teoría de que la progesterona sintetizada en la fase folicular tardía actúa facilitando la retroalimentación positiva ejercida por los estrógenos sobre el centro de control hipotálamo-hipofisario, y contribuye al pico de la LH.

El paso enzimático limitante en el proceso de esteroidogénesis ovárica es la transformación de colesterol en pregnenolona, mediado por la actividad de la CYP11A1. La pregnenolona resultante de esta transformación puede seguir tres vías metabólicas diferentes, dos de las cuales existen en el ovario: la vía  $\Delta 5$  y la  $\Delta 4$ . La HSD3B2 es la responsable de la conversión de los esteroides sintetizados por la vía  $\Delta 5$  a la configuración  $\Delta 4$ , y por tanto resulta esencial para la síntesis de diferentes productos hormonales. La actividad relativa de la HSD3B2 y de la CYP17 determina la fracción de pregnenolona que sigue la vía  $\Delta 5$  hacia la síntesis de estradiol y la que se transforma en progesterona y 17-hidroxiprogesterona a través de la vía metabólica  $\Delta 4$ .

La vía  $\Delta 5$  conduce a la transformación de pregnenolona en 17-hidroxipregnenolona, por la acción de la CYP17 y de ésta, por la misma acción enzimática, en dehidroepiandrosterona, precursora a su vez de la androstendiona. La CYP17, que es en realidad una enzima compleja dotada tanto de actividad hidroxilasa como liasa, se localiza exclusivamente en las Células de la Teca (Devroey, Fauser et al.)

## Introducción

intersticiales del ovario. Por el contrario, la CYP11A1 se expresa únicamente en las CG. Por tanto, la teca provee la síntesis de andrógenos, que actúan como sustratos de la aromatización que tiene lugar sólo en el compartimento granuloso del folículo.

La vía  $\Delta 4$  se inicia con la transformación de pregnenolona en progesterona, por la acción de la HSD3B2. Esta conversión es irreversible, como todas las reacciones de deshidrogenización catalizadas por este enzima. A continuación, la progesterona puede ser transformada en 17-hidroxiprogesterona por la acción de la CYP17. Esta molécula es terminal en el ovario humano, que no dispone de actividades enzimáticas capaces de metabolizarlo, por lo que, junto con la progesterona, constituyen los productos finales de síntesis de la vía  $\Delta 4$  (Fukuda, Orisaka et al. 2009). La síntesis de estradiol depende por tanto de forma exclusiva de la testosterona sintetizada por medio de la vía  $\Delta 5$ , a la que pueden revertir por interconversión parte de la androstendiona, que es un producto de la vía  $\Delta 4$ . La actividad de la CYP17 es, en consecuencia, el principal modulador del equilibrio entre la síntesis de progesterona y 17-hidroxiprogesterona (Fleming, Humpert et al. 2011).

La síntesis de andrógenos, predominante en los folículos de pequeño tamaño, tiene un carácter tónico, y como se ha dicho, depende ante todo de la actividad intrínseca de los enzimas responsables. A partir de la aparición del antro folicular aumenta la síntesis de estradiol, en especial en el folículo dominante. Finalmente, el folículo preovulatorio desarrolla una creciente capacidad para la producción de progesterona, sin mermar la producción de estradiol. Por el contrario, la producción folicular de progesterona, detectable ya en folículos antrales pequeños

## Introducción

(5-6 mm), está en relación directa con el diámetro folicular y con el número de días transcurridos desde la ovulación (Schneyer, Fujiwara et al. 2000). Durante la fase folicular precoz de un ciclo ovárico normal, las concentraciones de estradiol en la vena ovárica homolateral al ovario donde se localiza en folículo dominante son el doble de las detectables en sangre periférica, y se incrementan aún más durante la fase folicular media. La elevación en la concentración de progesterona es detectable también en la fase folicular precoz, antes incluso del establecimiento de la dominancia folicular, y al igual que sucede con el estradiol, su concentración en fase folicular media es muy relevante. Este incremento tiene su origen en el folículo dominante, que vierte a la circulación sistémica una fracción de la progesterona que produce. Parte de ésta experimenta además un rápido metabolismo hepático, lo que explica que las concentraciones en sangre periférica en la fase previa a la ovulación no sean aún mayores.

La síntesis global de progesterona, que alcanza niveles generalmente inferiores a 1 mg/día en fase folicular, se incrementa de 20 a 30 veces durante la fase lútea (Kyrou, Al-Azemi et al. 2012). En términos de concentración plasmática, la cantidad de progesterona en fase preovulatoria en mujeres en edad fértil suele ser menor de 100 ng/dL, y se incrementa hasta 500-2000 ng/dL a partir de la fase lútea precoz.

La acción la FSH sobre cultivos *in vitro* de CG de rata núbil produce incremento de la síntesis de la HSD3B2-ARNm, de los niveles de proteína y de su actividad enzimática (deMoura, Choi et al. 1997). La acción de la LH/HCG tiene análogos efectos sobre cultivos *in vitro* de Células de la Teca (Devroey, Fauser et al.) humanas. Datos procedentes de estudios sobre fisiología folicular humana señalan que la producción

## Introducción

de andrógenos en la teca es relativamente constante a lo largo del ciclo, lo que sugiere una dependencia primordial de la actividad intrínseca de las CT, que es fruto de una actividad tecal de la HSD3B2 fundamentalmente tónica y constitucional. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de un incremento funcional, tanto por la acción de la FSH sobre la granulosa como por la de la LH en la teca, aunque las consecuencias clínicas de esta regulación en el contexto de los ciclos estimulados no se conocen en la actualidad.

### 1.2.2.2.4 Aromatasa (CYP19A1)

La Aromatasa está codificada en el gen CYP19. La expresión de esta proteína y su actividad en el ovario está regulada de forma diferencial durante el crecimiento folicular y la luteinización. La síntesis de Aromatasa está inducida, en las CG de los folículos antrales pequeños en desarrollo y en los folículos preovulatorios, por la FSH, la LH y por los esteroides. El aumento de expresión de la Aromatasa en las CG del folículo preovulatorio disminuye de forma drástica con la aparición del pico de LH. Los eventos celulares que causan esta disminución en la síntesis de Aromatasa y su actividad en las CG en respuesta a este pico de LH está asociado temporalmente con eventos moleculares que definen el final de la diferenciación de las CG y la formación de las células lúteas (Fitzpatrick, Carlone et al. 1997).

## Introducción

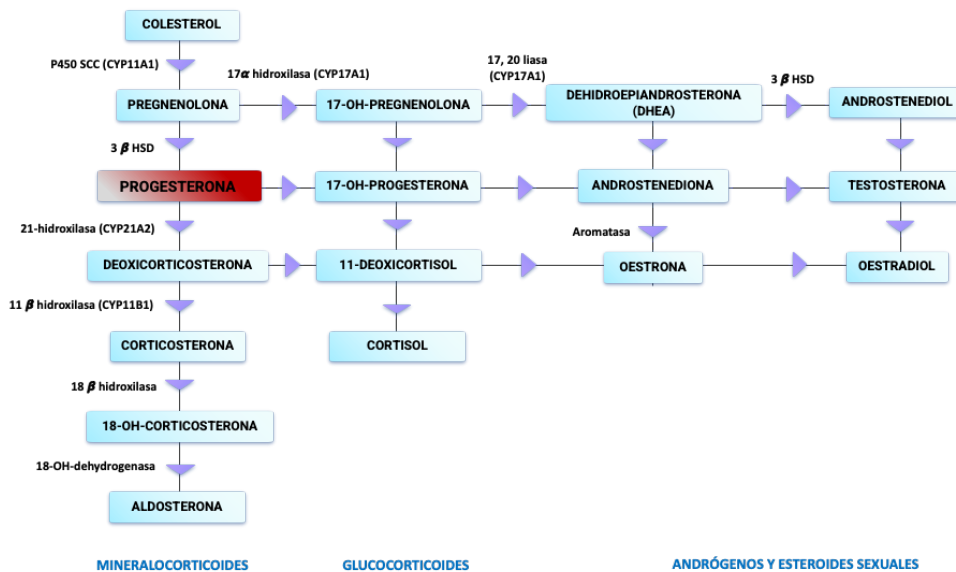


Figura 8: Esteroidogénesis. Modificado de Charlotte Sonigo et al., 2014.

### 1.3 Efectos de la estimulación farmacológica sobre el perfil funcional de las Células de la Granulosa

Las pautas de estimulación gonadotrópica aplicadas para la estimulación ovárica en Ciclos de Fecundación *In Vitro* con Transferencia Embrionaria (FIV-TE) tratan de contrarrestar los mecanismos fisiológicos que tienen como resultado la dominancia monofolicular, es decir, el hecho de que un único folículo alcance, en condiciones normales, el estadio de folículo preovulatorio. El resultado final de este conjunto de mecanismos es la ovulación de un solo ovocito fecundable, para propiciar la gestación única. El proceso de crecimiento folicular acelerado es dependiente de la acción de la FSH y la LH, cuyos niveles están regulados predominantemente por dos mecanismos básicos de retroalimentación ejercidos por los estrógenos sintetizados principalmente en el folículo dominante, a los que se añaden mecanismos auxiliares de regulación dependientes de sistemas de hormonas peptídicas, cuyo ejemplo más relevante es el conjunto de las

## Introducción

acciones de inhibina, activina y follistatina. La reducción de la síntesis y liberación de la FSH por efecto del aumento del estradiol circulante, mediado por los receptores estrogénicos hipotalámicos, se conoce como retroalimentación negativa (feed-back negativo), y se trata de un mecanismo tónico, presente durante todo el ciclo ovárico, pero cuya importancia es mayor a partir de la fase folicular media y avanzada. La liberación masiva de gonadotropinas, predominantemente la LH, en respuesta a la presencia mantenida de una concentración umbral de estradiol determinada, constituye el feed-back o retroalimentación positiva, que actúa cíclicamente, y que representa la señal endocrina para que el conjunto funcional hipotálamo-hipófisis emita la señal hormonal responsable de la maduración folicular final y de la ovulación, en respuesta a la síntesis de estradiol en el folículo dominante, que expresa así su capacidad de responder a los cambios madurativos preovulatorios.

En el ciclo natural, la discreta elevación de la FSH, causada por el descenso de la retroalimentación negativa que a su vez deriva del comienzo de la declinación funcional del CL, se mantiene durante un número escaso de días, suficientes como para que un número limitado de folículos sean reclutados, es decir, rescatados de la atresia, y para que inicien una fase de crecimiento diferencial o selección, que finalizará en el establecimiento de la dominancia de un único folículo. La administración de gonadotropinas exógena persigue precisamente contrarrestar el efecto del feed-back negativo y a promover el desarrollo multifolicular múltiple de alto grado, necesario para disponer de una cohorte de folículos adecuada.

Por otro lado, la modificación farmacológica del feed-back positivo es preciso para lograr en primer término una anulación de la capacidad

## Introducción

hipofisaria de responder a la acción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) endógena. Sin esta anulación, denominada a menudo hipofisectomía médica reversible, los cambios funcionales preovulatorios, junto con la propia reanudación de la meiosis y las modificaciones metabólicas del ovocito ocurrirían de forma impredecible y extemporánea, lo que haría imposible su obtención eficiente para su fecundación *ex-vivo*. La abolición temporal de la capacidad de liberar un pico endógeno de la LH obliga a la sustitución farmacológica de éste, mediante el uso de actividad la LH exógena procedente generalmente de la hCG.

El desarrollo folicular ovárico depende de la acción de las dos gonadotropinas principales (FSH y LH). Durante el ciclo menstrual, hacia la mitad del ciclo aparecen dichas gonadotropinas señalando el inicio del intervalo periovulatorio, periodo durante el cual hay un aumento de la producción de progesterona por parte del folículo dominante. En este momento comienza la luteolisis, seguida de la ruptura de la pared folicular con la consiguiente liberación del ovocito.

La administración exógena de gonadotropinas durante una Estimulación Ovárica Controlada (COS) conduce a un desarrollo folicular múltiple, lo cual es fundamental en las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). La administración de gonadotropinas exógenas en el transcurso de una TRA conduce a unos niveles supra fisiológicos de la FSH circulante a lo largo de la fase folicular. Del mismo modo hay un aumento de la progesterona que está relacionado con el incremento del número de folículos, así como con el número de CG. Estos niveles aumentados poseen un patrón muy diferente a los presentes en un ciclo menstrual normal (Andersen and Ezcurra 2014).

## Introducción

La secuencia de la cascada de la esteroidogénesis es obviamente la misma en el ciclo natural y en el contexto de la estimulación ovárica para Ciclos de FIV-TE, aunque ciertas actividades enzimáticas pueden verse afectadas por el efecto de las concentraciones supra fisiológicas de estradiol por efecto de la exposición a dosis elevadas de la FSH. No existen datos directos sobre el posible efecto de la hiperestimulación ovárica controlada sobre la actividad de la CYP17, y sobre las repercusiones que podrían tener en la síntesis de progesterona respecto al ciclo no estimulado. Es posible que la estimulación ovárica modifique no sólo la cantidad total sintetizada, sino la contribución relativa de la teca y la granulosa en su producción. Por una parte, el incremento de la actividad de la CYP11A1 ejercida por el incremento de la acción la FSH podría aumentar el consumo del sustrato común pregnenolona, y con ello reducir la producción de progesterona por medio de la acción la HSD3B2. Por otro lado, es probable que la proporción de progesterona total sintetizada en las células granulosas vaya en incremento a medida que progresa la estimulación ovárica y según aumenta la sensibilidad a la LH en estas células. Considerando que la actividad de la CYP17 puede ser estimulada tanto por la LH como por otros sistemas paracrinos ya mencionados, es muy probable que sea intensamente sobre expresada en células estimuladas, lo que podría determinar cambios en su apetencia diferencial por sus sustratos con predominio de la transformación de la 17-hidroxiprogesterona, o catalizar su transformación a progesterona simplemente por la hiperabundancia de sustrato (Hugues 2012). Parece claro que durante la fase folicular precoz, las células granulosas de los folículos en fase de selección no tienen gran sensibilidad a la LH, por lo que el incremento de progesterona que sigue a la elevación de la LH, observado por ejemplo en la fase de *flare-up* del protocolo largo de agonistas, podría

## Introducción

ser más bien fruto del rescate funcional del cuerpo lúteo preexistente (Cedrin-Durnerin, Bulwa et al. 1996).

En un ciclo normal, el folículo dominante crece hasta que las concentraciones de FSH caen promoviendo una sensibilidad a las gonadotropinas. Esto incluye una elevada sensibilidad de las CG por la LH. A través de este mecanismo es por el que la luteinización tiene lugar. Como respuesta a la acción de la LH, las GC adquieren una nueva diferenciación funcional, que es resultado de la pérdida de receptividad a la FSH, y expresión de genes promotores de la síntesis de progesterona y de otros factores implicados en procesos de remodelación tisular con claro impacto funcional, como la neoangiogénesis. Las células luteinizadas como efecto de la acción tónica de la descarga crítica de la LH se denominan CGLOH y son la unidad funcional básica del CL. Estas células han sido utilizadas con frecuencia como modelo de estudio de múltiples aspectos de la función ovárica (Andersen and Ezcurra 2014).

Por otro lado, la acción de la LH sobre las células de la teca regula la transformación de progesterona en andrógenos por la acción de la CYP17. Se ha propuesto que la acumulación del 'sustrato progesterona', que facilitaría su paso a la circulación y la aparición de efectos endocrinos, entre otros sobre el endometrio, no sólo podría derivar de una síntesis excesiva, sino también de una metabolización insuficiente a andrógenos (Andersen and Ezcurra 2014). No está bien establecido si durante la estimulación ovárica, la acción sobre la teca de la LH disponible podría incrementar la producción de andrógenos y reducir así la disponibilidad del sustrato común para la síntesis alternativa de progesterona.

## Introducción

### 1.4 Caracterización de las células granulosa luteinizadas

#### 1.4.1 Células granulosa luteinizadas diferenciadas

A pesar de compartir características netamente comunes, las CG reconocen cierto grado de heterogeneidad funcional en los folículos en desarrollo normal, que podría ser quizá expresión precoz de las características diferenciales de las diversas subpoblaciones de células lúteas funcionalmente 'maduras' (Johnson et al. 2015).

Antes de la ruptura folicular, las CG aumentan progresivamente de tamaño y adoptan un aspecto vacuolado asociado a la acumulación de luteína; este proceso de crecimiento continúa tras la ovulación. Como ya se ha indicado, la población de células lúteas es heterogénea, ya que está compuesta por dos tipos celulares: células grandes y células pequeñas o tecaluteínicas. Estas últimas son las más abundantes, y deben su denominación a que parecen derivar de la teca y del estroma circundante; de hecho, expresan receptores de la LH y de la hCG (Osteen, Loeken et al. 1982). Las células grandes proceden, según se cree, de la transformación lútea de las CG. Se ha propuesto que estas células representan el lugar donde se produce primordialmente la esteroidogénesis, por presentar mayor actividad aromataza y mayor síntesis de progesterona que en las células pequeñas. La existencia de uniones intercelulares que comunican ambas subpoblaciones se ha propuesto como mecanismo de conexión entre las células pequeñas, donde se concentra la capacidad de respuesta a la acción de la LH y de la hCG, y las células grandes, donde asentaría predominantemente la esteroidogénesis (Osteen, Loeken et al. 1982).

Adyacentes a las células lúteas, la granulosa luteinizada contiene también células endoteliales, leucocitos y fibroblastos. Estas líneas

## Introducción

celulares de origen mesenquimal parecen desempeñar funciones no sólo estructurales o de soporte vascular. Las diferentes poblaciones leucocitarias presentes en el CL desde su fase luteogénica precoz tienen capacidad de producción de citoquinas. Los leucocitos del CL también son una rica fuente de enzimas citolíticas, prostaglandinas y factores de crecimiento implicados en la angiogénesis, la esteroidogénesis y la luteólisis. Las células endoteliales constituyen aproximadamente el 50% de las células de un CL maduro, participando en reacciones inmunitarias y en funciones endocrinas (Reynolds and Redmer 1999).

Las CGLOH, de fácil acceso a través de los programas clínicos de fecundación *in vitro*, constituyen un modelo muy utilizado en el estudio de los mecanismos de maduración del folículo ovárico. A lo largo de todo el proceso de diferenciación funcional tiene lugar un conjunto de interacciones entre las Células de la Teca (Rimon-Dahari, Yerushalmi-Heinemann et al. 2016), las CG y el ovocito, distintas de las mediadas por vía endocrina, y responsables de la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito, y de la adquisición de plena competencia funcional por el CL. Estos cambios funcionales han sido evaluados a través de los cambios en la expresión génica de las células granulosas (Monga, Sharma et al. 2011), así como por medio del análisis de los patrones de transcripción (Elvin, Yan et al. 1999).

El uso de las CG procedentes de aspirados foliculares realizados a pacientes tratadas para FIV-TE es un modelo experimental relativamente poco aplicado, y cuya estandarización no ha sido suficientemente establecida (Ophir, Yung et al. 2014).

## Introducción

Una de las características funcionales básicas de las CG procedentes de punciones foliculares en el contexto del tratamiento de FIV-TE es que han experimentado el efecto luteinizante de la dosis de la hCG que se utiliza para reemplazar farmacológicamente el pico endógeno de la LH. Por tanto, el patrón de expresión génica y de síntesis proteica y esteroidea de estas células corresponde a una fase de transición entre la fase folicular tardía y la fase lútea, en la que el efecto de LH, modulado por señalizaciones paracrinas de mediadores esteroideos y peptídicos, ha comenzado a manifestarse (Ophir, Yung et al. 2014).

El perfil funcional de las CGLOH fue evaluado inicialmente estudiando su capacidad de síntesis esteroidea. Los primeros estudios describieron que tras cultivo de 7 días en ausencia de gonadotropinas, las CGLOH conservan su capacidad de respuesta a aquéllas en términos de síntesis esteroidea (Breckwoldt, Selvaraj et al. 1996) (Sasson, Rimon et al. 2004). Otros estudios han mostrado que la capacidad de síntesis de estradiol y progesterona de las CGLOH sometidas a cultivos de 72 h sin adición de gonadotropinas era superior a la mostrada por estas mismas células en el momento inmediato a su extracción y al inicio del cultivo (Lindeberg, Carlstrom et al. 2007). Estos hallazgos indujeron a sugerir la hipótesis de que los cultivos podrían favorecer la proliferación de células con un perfil funcional pre-lúteo, aunque la heterogeneidad de las metodologías e intervalos de estimulación gonadotrópica *in vitro* aplicados limitan la validez de estos hallazgos. Igualmente, la utilización del perfil de síntesis esteroideogénica como marcador de estado de diferenciación de las CG es controvertible.

Estudios más recientes han propuesto el uso de marcadores moleculares de diferenciación celular más fiables, con el fin de

## Introducción

caracterizar mejor el perfil funcional de las células cultivadas, y de detectar de forma más precisa las diferencias entre las poblaciones celulares de partida y las obtenidas mediante expansión y cultivo. Las CGLOH, que constituyen el material celular de partida, son el fruto de la diferenciación progresiva de la granulosa desde las fases folicular precoz e intermedia y preovulatoria. A lo largo de esta transformación, el perfil de expresión génica se modifica desde el característico de las CG propias del desarrollo folicular precoz, que presentan baja expresión del Receptor de la Hormona Folículo Estimulante (FSH-R) (Camp, Rahal et al. 1991) (O'Shaughnessy, Dudley et al. 1996) (Weil, Vendola et al. 1999), del Receptor de la Hormona Luteinizante (LH-R) (Camp, Rahal et al. 1991), del gen codificador de la actividad de la CYP11A1, del gen de la Aromatasa (CYP19A1), así como de otros genes asociados a actividades tróficas como la Anfirregulina (AREG) y la Epirregulina (EREG) (Ashkenazi, Cao et al. 2005) (Zamah, Hsieh et al. 2010). La progresión evolutiva a la fase de folículo preovulatorio se asocia a un incremento de la expresión del FSH-R y del LH-R (Ashkenazi, Cao et al. 2005) (Zamah, Hsieh et al. 2010), en la expresión de la CYP11A1 (Oonk, Parker et al. 1990) y de la CYP19A1 (Clement and Monniaux 2013) (Fitzpatrick, Carlone et al. 1997) (Kawai, Mihara et al. 2012) (Nagashima, Kim et al. 2011). Como consecuencia de la acción del pico de la LH, se incrementa la expresión de la AREG y la EREG, promoviendo la síntesis de progesterona, inducida por la expresión de la HSD3B2, y de genes relacionados con acciones preovulatorias.

La dinámica de la expresión génica de las CG han sido analizada por un reciente estudio de Ophir (Ophir, Yung et al. 2014), que ha evaluado la expresión del LH-R, del FSH-R, de la CYP11A1, del gen CYP19A1, de la AREG y de la EREG en tres muestras celulares, correspondientes a CG

## Introducción

procedentes de folículos en fase precoz de desarrollo (> 12 mm de diámetro), células obtenidas de la aspiración de folículos preovulatorios no luteinizados, y CGLOH. Los dos primeros tipos de CG fueron obtenidos de punciones foliculares en ciclos destinados a la maduración *in vitro* de ovocitos, mientras que la tercera procedía de estimulaciones ováricas convencionales destinadas a tratamiento con FIV (Ophir, Yung et al. 2014). En concordancia con los estudios previos al respecto, este autor ha hallado niveles específicos de los transcritos analizados. Las CG procedentes de folículos antrales más precoces presentaron niveles bajos de ARNm específicos de LH-R, CYP11A1, CYP19A1, que resultaron más elevados en la muestra de CG de folículos preovulatorios. Respecto al FSH-R, los niveles resultaron máximos en las CG de los folículos más inmaduros, y notablemente inferiores en las muestras de folículos preovulatorios y de folículos luteinizados.

La hipótesis de que la heterogeneidad celular del CL se exprese también en forma de patrones de disposición u organización estructural ha sido sugerida por distintos autores que han analizado las características funcionales de las CG prelúteas en relación con su ubicación en el folículo preovulatorio. Algunos estudios han pretendido definir subpoblaciones de CG en relación con características como la capacidad de aromatización o la tasa de división celular. En modelos experimentales bovinos y humanos se han observado diferencias en perfil de expresión génica o en la actividad metabólica comparando CG parietales próximas al antro y CG cercanas a la membrana basal, así como CG parietales respecto de las del cúmulo, en modelos de cultivo celular *in vitro*. Análogamente, en modelos de cultivo *in vitro* se ha observado que la expresión de Colágeno tipo IV en la granulosa folicular es mayor alrededor de las células que expresan FSH-R y también que a

## Introducción

medida que el desarrollo folicular progresa, la presencia de Colágeno tipo IV no sólo se detecta en la lámina basal del folículo sino también en los espacios intercelulares en la granulosa (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009).

### **1.4.1 Células de granulosa ovárica con características de pluripotencialidad**

Estas observaciones sobre la aparente heterogeneidad de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) y los interrogantes sobre su diferenciación progresiva a partir de un compartimento de reserva generaron algunas hipótesis sobre la existencia de elementos precursores con características de Células Progenitoras (CP). Rodgers et al. (Kossowska-Tomaszczuk, Pelczar et al. 2010) postularon que las CG que proliferan durante el crecimiento folicular lo hacen a partir de una población de CP que podrían formar parte del revestimiento inicial del ovocito en la fase de folículo primordial. De acuerdo con este autor, la rápida proliferación de las CG, que crecen desde algunas decenas en el folículo primordial hasta más de 40 millones en el preovulatorio, se ajusta más a un modelo de crecimiento exponencial a partir de una población de células precursoras en permanente diferenciación que a una dinámica lineal fruto de la simple duplicación de las CG maduras.

Estas estimaciones, basadas en el estudio de la foliculogénesis bovina, unidas a la observación de que una pequeña proporción de CG de folículos animales exhiben propiedades funcionales como falta de inhibición de crecimiento por contacto, capacidad de división *in vitro*

## Introducción

sin anclaje al sustrato y pluripotencialidad, permitieron especular sobre la existencia de una proporción de CGLOH en el folículo humano.

El grupo de Kossowska-Tomaszczuk K et al. (Rodgers, van Wezel et al. 1999) ha descrito por primera vez el aislamiento, tras cultivo *in vitro* prolongado, de una subpoblación de la CGLOH obtenidas a partir de aspiración ovocitaria en el que considera probada la multipotencialidad, al detectarse claras similitudes con las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) y Células Stem Mesenquimales de Tejido Graso (DDSC), con respecto al perfil de expresión inmunofenotípico y al comportamiento *in vitro*. No obstante, este estudio considera caracterizada la condición de Células Stem Mesenquimal (MSC) en las CG aplicando un conjunto de marcadores que no incluyen algunos de los marcadores inmunofenotípicos básicos definidos por los criterios antes aludidos (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009).

La identificación de los marcadores específicos que caracterizan la fracción pluripotencial de las CG, ha sido el objeto de un número limitado de estudios (Dominici, Le Blanc et al. 2006) (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009) (Varras, Griva et al. 2012), cuyos resultados son heterogéneos, aunque resultan difícilmente comparables por las diferencias en el diseño experimental. Los tres estudios se basan en la evaluación evolutiva del perfil de expresión de marcadores de pluripotencialidad en cultivos *in vitro* de CG humanas.

El estudio de Kossowska-Tomaszczuk utiliza CGLOH procedentes de aspiraciones foliculares tras estimulación ovárica para FIV y seleccionadas inicialmente por la positividad de expresión del FSH-R y

## Introducción

la negatividad del Marcador de Linfocitos T (CD3). Según este estudio, el cultivo prolongado de CGLOH en presencia de LIF (Mattioli, Gloria et al.) permite observar una desaparición progresiva de marcadores funcionales propios de CG diferenciadas (FSH-R y Aromatasa) y la positividad, mantenida durante todo el proceso de cultivo, del Octamer-Binding Transcription Factor 4 (OCT4), marcador característico de pluripotencialidad. Los marcadores específicos de pluripotencialidad en células de estirpe germinal estudiados (Nanog, Vasa y Stellar) resultaron negativos. Adicionalmente las CGLOH con capacidad para expresar OCT4, resultaron también positivas para varios marcadores específicos de MSC: CD29, CD44, CD90, CD105, CD117 y CD166 y negativas para CD73. Otra prueba adicional de su pluripotencialidad fue la diferenciación inducida a estirpes osteogénica, condrogénica y neurogénica. Los autores sugieren que sus resultados apoyan la existencia de una población de células pluripotentes con características propias de MSC, presentes en la granulosa folicular luteinizada y susceptibles de expansión selectiva mediante cultivo prolongado en presencia de LIF, en virtud de la capacidad de esta citoquina para proteger selectivamente de la apoptosis a las células pluripotentes (Butts, Riethman et al. 2009).

Mattioli realizó un estudio análogo mediante cultivo *in vitro* de CG parietales de folículos ováricos porcinos, en fase folicular y lútea, y sin caracterizarlas inicialmente mediante inmunoselección. Estos autores no detectaron positividad de OCT4 ni basalmente ni a lo largo del cultivo, mientras que sí detectaron positividad basal de otros marcadores de pluripotencialidad mesenquimal (Nanog, SOX2 y TERT) tanto en CG no luteinizadas como luteinizadas. Tras 3 semanas de diferenciación osteogénica inducida *in vitro*, estas células mostraron

## Introducción

una reducción drástica de la expresión de marcadores de pluripotencialidad mesenquimal, que aunque mínima, seguía siendo detectable (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009).

El estudio de Varras, publicado en 2012, analizó la expresión de OCT4 y proteína DAZ-like (DAZL), marcador de estirpe germinal, en CG procedentes de cúmulo oóforo de ovocitos humanos, considerando una serie de 21 pacientes, y el nivel de expresión en cada paciente como unidad de medida (Mattioli, Gloria et al. 2012). Se detectó expresión de OCT4 en 10 de las pacientes estudiadas (48%), mientras que la expresión de DAZL fue negativa en todos los casos. El estudio no detectó correlación entre la positividad de OCT4 y ninguna característica basal de las pacientes o de las estimulaciones ováricas que fueron consideradas (edad, índice de masa corporal, FSH, LH y prolactinas basales, consumo de gonadotropinas, duración de la estimulación, estradiol sérico en quinto día de estimulación y el día de la administración de la hCG, folículos aspirados, ovocitos obtenidos y porcentaje de maduración ovocitaria). Estos autores concluyen que, en la mitad de las pacientes, las CG del cúmulo contienen una subpoblación de CP de estirpe no germinal.

La heterogeneidad de los resultados de los estudios referidos podría explicarse considerando tanto las diferencias metodológicas relativas tanto a la especie animal como al origen y los procedimientos de obtención y procesamiento de las CG. Una fuente adicional de variabilidad de los resultados podría ser la diferente localización folicular de las CG utilizadas en cada estudio. Los experimentos de Kossowska-Tomaszczuk utilizaron como fuente celular los líquidos procedentes de la aspiración folicular de pacientes infértiles, realizando

## Introducción

una primera selección celular basada en la positividad del FSH-R (Varras, Griva et al. 2012). Por el contrario, Varras partió de células procedentes del cúmulo oóforo de ovocitos humanos obtenidos para su procesamiento en el contexto de una FIV (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009). Finalmente, Mattioli empleó muestras de granulosa procedentes del raspado del interior de los antros foliculares de hembras de cerdo prenútiles (Varras, Griva et al. 2012). En consecuencia, la población celular expandida en el estudio de Kossowska-Tomaszczuk representa más probablemente una mezcla de los cuatro compartimentos funcionales de la granulosa antes aludidos, mientras que las células utilizadas por los otros dos estudios podrían ser a priori más homogéneas (Mattioli, Gloria et al. 2012). Se ha señalado que la dinámica de expansión y crecimiento de las CG parietales difiere de las del cúmulo, cuya actividad mitótica es más intensa en los estadios finales del desarrollo folicular (Dzafic, Stimpfel et al. 2013). Esta característica diferencial añadida a otras como el gradiente de expresión de FSH-R y LH-R a lo largo de las diferentes láminas granulosas, podrían expresar la existencia de diferentes poblaciones celulares, con fracciones de células pluripotentes también distintas.

Por otra parte, los tres estudios mencionados difieren respecto a la metodología aplicada para la detección de la expresión de OCT-4. Con independencia de que la amplificación se realice sobre muestras agregadas o analizando por separado las procedentes de cada paciente, Dzafic ha señalado que ninguno de los autores detalla el tipo de cebador específico utilizado para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), lo cual puede ser relevante considerando que OCT-4 puede ser amplificado por medio de las

## Introducción

secuencias segmentarias OCT-4A, OCT4B y OCT-B1. Sin que ello suponga restar valor a OCT-4 como marcador de pluripotencialidad (Hirshfield 1986).

La pluripotencialidad de las CGLOH ha sido evaluada también aplicando metodologías de análisis de expresión génica diferencial. En un estudio de reciente aparición, el grupo de Dzafic compara el perfil de expresión génica de las CG procedentes de aspiraciones foliculares de pacientes tratadas con FIV, con un control positivo constituido por MSCMO, y otro negativo, para el que se usaron fibroblastos de dermis humana (Dzafic, Stimpfel et al. 2013). Este estudio comparó la expresión de un conjunto de 84 genes, que incluía genes específicos de CP, genes no específicos pero asociados a pluripotencialidad, genes relacionados con capacidad de diferenciación específica a líneas mesenquimales concretas y un cuarto grupo asociado a la regulación de la función ovárica. Las células procedentes de aspirados foliculares fueron depuradas de contaminantes hemáticos y de otro origen por medio tan sólo de métodos de choque hipoosmótico, sin que se aplicase ningún método de selección física o inmunológica. Estas células expresaron 57 de los genes estudiados, de los cuales 16 mostraron sobreexpresión y 20 subexpresión, en comparación con las células mesenquimales pluripotentes hematopoyéticas. La sobreexpresión más intensa se detectó para la Interleucina 10 (IL10) y la Proteína Tirosina Fosfatasa 45 (CD45); el primero de ambos está implicado en la inmunorregulación de la respuesta inflamatoria, mientras que CD45 tiene relación con el control de gran variedad de procesos de diferenciación, proliferación y malignización celular. Otro de los genes más sobre expresados resultó CD49f, codificante de la Alfa-6-Integrina, que es una conocida molécula de adhesión considerada también

## Introducción

marcador de diferenciación de las CGLOH. Finalmente, dentro del grupo de genes sobre expresados se identificaron otros ocho, igualmente sobre regulados en las MSCMO utilizadas como controles, y asociados a pluripotencialidad, específicos de pluripotencialidad mesenquimal (CD106, CD146) o asociados a la misma (IL10, CD45, y TNF, IWWF), o implicados en líneas de diferenciación específica, como la condrogénica (SOX9). Este estudio concluye que las células procedentes de aspirado folicular, presumiblemente CLGOH en su mayoría, muestran un perfil de expresión génica notablemente similar, aunque no totalmente superponible al de las MSCMO, y muy diferente al de los fibroblastos de dermis humana.

El estudio de Dzafic incluye además la descripción de la primera diferenciación experimental inducida a células de estirpe pancreática a partir de una muestra inicial de células procedentes de aspiración folicular en pacientes tratadas con FIV (Dzafic, Stimpfel et al. 2014), por medio de la aplicación, con ligeras modificaciones, de un protocolo de diferenciación previamente descrito para otras CP (Dzafic, Stimpfel et al. 2014). Conviene señalar sin embargo que el material celular de partida de este experimento no es propiamente una muestra de CG identificadas, según los criterios mayoritariamente empleados en los estudios análogos, sino una solución del conjunto del material celular obtenido mediante aspiración ovárica, del cual se había eliminado parcialmente la contaminación hemática mediante choque hipoosmótico (Chandra, G et al. 2009).

## Introducción

### **1.5 Expansión de las CG con características de pluripotencialidad**

Las CGLOH más comúnmente empleadas para los estudios *in vitro*, se han obtenido como producto residual de los líquidos foliculares procedentes recuperación ovocitaria en mujeres sometidas a protocolos de estimulación ovárica controlada para FIV y a punción folicular transvaginal ecoguiada. Dado que el folículo post-ovulatorio adquiere una creciente vascularización, el aspirado folicular en las pacientes pertenecientes a los programas de FIV contiene una población celular heterogénea en la cual las CG están mezcladas con leucocitos, eritrocitos y otros tipos celulares, tales como células endoteliales y epiteliales.

La selección de una población experimental pura de CG sin presencia de elementos celulares contaminantes es imprescindible para el abordaje de estudios analíticos sobre el fenotipo y comportamiento de estas células. Los procedimientos de selección mediante centrifugación en gradientes de densidad permiten una depuración inicial suficiente para obtener poblaciones de CG con escasa contaminación, y susceptibles por tanto de expansión *in vitro* y posterior inmunoselección (Dzafic, Stimpfel et al. 2014) (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009).

Tras la purificación de las CGLOH, la mayoría de los autores han sugerido la conveniencia de acumular material celular mediante criopreservación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , usando como crioprotector Dimetilsulfóxido (DMSO), para su posterior almacenamiento en  $\text{N}_2$  líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (Riva, Omes et al. 2014). La finalidad de este procedimiento es asegurar una reserva celular suficiente para atender las necesidades impuestas por los diseños experimentales, así como para disminuir el posible

## Introducción

efecto de la variabilidad biológica. Con este fin, diversas publicaciones proponen que las reservas celulares de CGLOH procedan de diversos pacientes, y que cada experimento se lleve a cabo con una mezcla de las diferentes poblaciones celulares congeladas. Este sistema, de indudables ventajas conceptuales y logísticas, incrementa ligeramente la complejidad del proceso de acumulación celular, pues obliga a la depleción selectiva de células CD3+, con el objeto de evitar la reacción de inmunidad celular.

Los primeros datos sobre el mantenimiento en cultivo prolongado de CG proceden de estudios centrados en el aislamiento de líneas celulares inmortalizadas a partir de tumores malignos de CG (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009). El estudio de marcadores de multipotencialidad en las CG ha sido posible a partir de la descripción de su cultivo eficiente a largo plazo en presencia de LIF (Kossowska-Tomaszczuk and De Geyter), citoquina utilizada como aditivo en medios de cultivo para el desarrollo de MSC por su efecto protector frente a la apoptosis (Butts, Riethman et al. 2009). El LIF se ha revelado como un importante estimulador de la autorregeneración tisular a partir de MSC en cerebro (Daheron, Opitz et al. 2004), intestino y médula ósea (Jiang, Vaessena et al. 2002). Se ha comprobado que durante el cultivo prolongado de CGLOH en presencia de LIF, tiene lugar una progresiva proliferación de células que no expresan características primarias de CG y por el contrario expresan factores como OCT4, factor de transcripción que constituye una de las isoformas codificadas por el gen OCT4. Este gen se considera un importante regulador de la diferenciación y la autorregeneración en varios tejidos (Abir, Fisch et al. 2004).

## Introducción

Inicialmente se consideraba que las CGLOH estaban terminalmente diferenciadas y que inevitablemente sufrían apoptosis en pocos días tras la ovulación (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009). Sin embargo, experiencias como la de Kossowska y posteriores ponen de manifiesto que entre las CGLOH existe una subpoblación celular viable durante periodos prolongados de tiempo, cuando son cultivadas en presencia de LIF (Niswender, Juengel et al. 2000) (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009). Varios estudios de estos autores señalan que el LIF promueve la supervivencia selectiva de las CGLOH, mientras que en ausencia de LIF estas células invariablemente sufrirían apoptosis (Zhang, Vollmer et al. 2000). Sin embargo, esta expansión selectiva no induce la desaparición completa de células capaces de expresar características propias de las CGLOH, tales como la actividad Aromatasa o el FSHR. A este respecto, se desconoce si la persistencia de estos marcadores son fruto de la supervivencia parcial de las CGLOH diferenciadas o son expresadas tanto por estas como por las CP.

Más recientemente, se han propuesto metodologías alternativas para la expansión de la fracción pluripotente de las CGLOH mediante cultivo prolongado sin necesidad de adición de LIF. En el estudio de Riva, (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009), las células procedentes de aspiración folicular fueron cultivadas en medio de cultivo convencional tamponado con un 10% de suero bovino fetal, y suplementado con L-Glutamina 2mM y antibióticos, pero carente de LIF. Tras la primera semana de cultivo, tanto las células únicas como las pequeñas agrupaciones iniciales comenzaron a expandirse formando colonias durante las 2-3 semanas siguientes. La población celular expandida resultó morfológicamente heterogénea, por estar constituida por células con morfología redondeada o cuboidal, similar a la que

## Introducción

muestran las células epiteliales, y también por otras de aspecto fibroblastoide o neural, con proyecciones dendriformes del citoplasma. Las células adheridas a la superficie de cultivo no expresaron marcadores inmunohistoquímicos de estirpe mesenquimal (vimentina), y, por el contrario, resultaron positivas para marcadores de pluripotencialidad mesenquimal (CD90, CD44, CD105 y CD73 entre otros), pero negativas para proteínas propias de células epiteliales, como CD34, CD45 y citoqueratinas. La prueba experimental de la pluripotencialidad de estas células se obtuvo mediante la diferenciación inducida a estirpes osteogénica, condrogénica y adipogénica. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de obtener células de origen epitelial, procedentes de la expansión de una subpoblación de CGLOH, que expresan características asociadas a la pluripotencialidad mesenquimal, y sin la necesidad de la protección frente a la apoptosis que proporciona el cultivo en presencia de LIF (Riva, Omes et al. 2014).

### **1.6 Inducción de diferenciación hacia líneas mesenquimales específicas a partir de Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE).**

El interés biológico y clínico por las MSC se ha incrementado de una forma drástica en las últimas tres décadas. Con la intención de unificar criterios entre los diferentes laboratorios y basándose en investigaciones científicas y estudios preclínicos, la ISCT, ha puesto de manifiesto ciertas características de las MSC humanas. Este documento tiene como objetivo proveer a la comunidad científica una serie de criterios estándar para definir a las MSC (Riva, Omes et al. 2014).

## Introducción

Según los criterios de la ISCT, las MSC son células adultas multipotentes capaces de autorrenovarse, proliferar y diferenciarse a tejidos diferentes de su origen, dependiendo del microambiente que las rodee. Son sencillas de aislar y cultivar *in vitro* gracias a su principal característica, la adherencia al sustrato plástico. Tienen morfología fibroblastoide, poseen la capacidad de diferenciarse a otras líneas dependiendo de las condiciones de cultivo y expresan en su superficie antígenos específicos.

En primer lugar, como ya se ha mencionado, las MSC deben tener adherencia al plástico cuando se mantienen en unas condiciones de cultivo estándar (Dominici, Le Blanc et al. 2006) (Colter, Class et al. 2000). En segundo lugar, más del 95% de la población de MSC deben expresar CD105, CD73 y CD90, tras medición con citometría de flujo. Adicionalmente, estas células deben tener una escasa expresión (menos del 2% de positividad) para CD45, CD34, *CD14*, *CD11b*, *CD79*, *CD19*, Antígeno de histocompatibilidad (*HLA-DR: Human Leukocyte Antigen*). Tercero, estas células deben tener la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo una condiciones de diferenciación específicas para cada línea (Jiang, Jahagirdar et al. 2002) (Bieback, Kern et al. 2004) (Dazzi, Ramasamy et al. 2006).

Diferentes tejidos adultos pueden ser fuente alternativa de MSC. Un amplio número de estudios han mostrado que la Médula Ósea (MO) adulta contiene una población de MSC capaz de diferenciarse en diferentes linajes celulares (Dizerega and Hodgen 1981) (Jiang, Jahagirdar et al. 2002). Sin embargo, el proceso de extracción de MSC de médula ósea es doloroso para los pacientes y el número celular recuperado es bajo (Jiang, Vaessena et al. 2002).

## Introducción

El tejido adiposo es otra fuente de MSC, las cuales se obtienen mediante lipoaspiración, método, según otros autores, menos invasivo que el anterior y con el que se obtiene un número celular mayor (Jang, Lee et al. 2010). Existen otra muchas fuentes de MSC como pueden ser la pulpa de los dientes (Wu, Wang et al. 2012), la placenta y la membrana fetal (Tirino, Paino et al. 2012), las glándulas salivares (Raynaud, Maleki et al. 2012) o el endometrio (Rotter, Oder et al. 2008).

El grupo de Kossowska-Tomaszczuk K et al, (Schuring, Schulte et al. 2011), ha demostrado la multipotencialidad de las CGLOH obtenidas a partir de líquido folicular, observando claras similitudes con la caracterización y el comportamiento de las MSCMO y tejido graso. Al igual que otras mesenquimales pluripotentes, las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE), son células adultas multipotentes capaces de autorrenovarse, proliferar y diferenciarse a tejidos diferentes de su origen, dependiendo del microambiente que las rodee. Se ha demostrado la capacidad de estas células para diferenciarse en otras líneas específicas, entre ellas osteoblástica, adipocítica y condrocítica, dependiendo de la presencia de inductores específicos en el cultivo.

En relación con la diferenciación osteogénica, descrita por los trabajos iniciales (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009) (Bieback, Kern et al. 2004) se ha evidenciado la posibilidad de que CGPE de ovario humano, en presencia de LIF y tratadas con medio inductor de la diferenciación osteogénica (*MiltenyiBiotec*®) cambien su morfología por otra “estrellada” propia de los osteoblastos y presenten depósitos de calcio visibles mediante tinciones específicas en las zonas de confluencia celular en el cultivo en monocapa.

## Introducción

La diferenciación adipogénica ha sido descrita a partir de diferentes tipos celulares (Mauro, Turriani et al. 2010) (Bieback, Kern et al. 2004). Según estudios preliminares, las CGPE son capaces de diferenciarse a adipocitos tras cultivo prolongado en presencia de LIF y medio inductor de la diferenciación adipogénica (Kit Lonza Ibérica products S.L), dónde se observan abundantes vacuolas de grasa teñidas de rojo (*Oil Red Merk®*) debido a la naturaleza lipofílica del colorante.

La diferenciación condrogénica ha sido descrita por varios grupos a partir de distintos tipos celulares (Pittenger, Mackay et al. 1999) (Mackay, Beck et al. 1998). En estudios preliminares evidenciamos la diferenciación condrogénica a partir de CG procedentes de aspirados foliculares ováricos humanos tras cultivo en presencia de LIF y medio inductor específico (*MiltenyiBiotec®*). La tinción con Azul de Toluidina identifica los proteoglicanos sintetizados por las células condrocíticas.

Las MSC pueden además diferenciarse a otros tipos celulares como puede ser el linaje neurogénico (Bieback, Kern et al. 2004) (Jang, Cho et al. 2010). Esta habilidad de diferenciación refleja la potencialidad biológica como células con capacidad de diferenciación temprana y/o la plasticidad de las MSC adultas derivadas de distintas fuentes. La diferenciación al linaje neurogénico puede conseguirse tras el cultivo de las MSC en un medio de inducción específico, que generalmente consiste en una mezcla de factores de crecimiento y pequeñas moléculas (Taran, Mamidi et al. 2014).

## Introducción

### 1.7 Mecanismos de protección celular y regeneración tisular

La utilización de MSC susceptibles de expansión mediante cultivo *in vitro* en la prevención del daño celular y en la regeneración tisular viene siendo objeto de una creciente atención desde hace años. La utilidad del trasplante de las MSCMO en la regeneración tisular en médula espinal, tejido cardíaco y piel ha sido ensayada con éxito en modelos experimentales. Las MSC son susceptibles de adquirir diferenciación osteogénica, condrogénica, adipogénica, cardiogénica, neurogénica y estromal hematopoyética (Mukai, Nagamura-Inoue et al. 2016).

En los últimos años ha habido un interés creciente en el posible uso de la medicina regenerativa y las células madre adultas, particularmente las derivadas de médula ósea, en combinación con el deterioro de órganos y tejidos relacionado con la edad. Gran parte del conocimiento actual sobre la biología de las células madre adultas deriva de estudios en los cuales las células madre o progenitoras fueron evaluadas por su habilidad para mejorar la función de órganos en enfermedades o lesiones (Ciuffreda, Malpasso et al. 2016) (Lee, Kim et al. 2007) (Alison, Poulson et al. 2000), o bien, en estudios *in vitro* en los cuales las MSCMO se diferencian en diferentes tipos celulares (Schwartz, Reyes et al. 2002) (Grove, Bruscia et al. 2004).

El eje reproductor femenino proporciona un modelo excelente para entender la degeneración funcional derivada de la edad, es decir del envejecimiento tisular, ya que los ovarios experimentan una involución funcional fisiológica que progresa con la edad, experimentando un fallo germinal a edades relativamente tempranas en el contexto de la actual expectativa de vida (Fehrer and Lepperdinger 2005). En un estudio realizado en ratón en 2009 (Buckler 2005), se usó el sistema reproductor femenino como modelo para investigar si la pérdida de

## Introducción

unidades foliculares asociada a la edad podría ser retrasada por medio del uso de las MSCMO, prolongando la pervivencia de unidades foliculares funcionales hasta edades cronológicamente avanzadas. La infusión de MSCMO procedentes de hembras donantes jóvenes fue efectiva en la prolongación de la función reproductiva de los ovarios solo si su infusión se realizaba en etapas en las que el órgano conservaba su función germinal.

Además de este mecanismo que podría conceptuarse como de “reposición celular directa”, la función regenerativa de estas células se ha puesto en relación con su capacidad para producir mediadores y citoquinas angiogénicas, anti apoptóticas y mitogénicas, tales como el VEGF, HGF, IGF-I, FGF-B, entre otros (Selesniemi, Lee et al. 2011).

La utilidad de las MSC para la prevención del daño de la reserva folicular ovárica producido por la quimioterapia ha sido explorada por un número aún limitado de estudios. Fu X et al., (Fu, He et al. 2008) aplicaron el cocultivo de CG murinas expuestas a Fosforamida en presencia de MSCMO, cuya capacidad para producir citoquinas tróficas (VEGF, HGF, IGF-I) había sido previamente constatada, con respecto a los controles, las CG murinas cultivadas con MSCMO experimentaron un porcentaje significativamente menor de apoptosis y mostraron un incremento en la expresión de bcl2. En un segundo experimento, el trasplante *in vivo* de MSCMO al animal de experimentación previamente expuesto a Fosforamida mejoró significativamente la función ovárica en términos de reducción de apoptosis e incremento de expresión de bcl2, recuento de folículos antrales a las 6 y 8 semanas de la exposición, incremento de la síntesis de estradiol y descenso de las concentraciones séricas de la FSH.

## Introducción

En esta misma línea, Takehara estudió los posibles efectos regenerativos de las MSC de tejido adiposo en un modelo animal de toxicidad ovárica inducida por Ciclofosfamida (Fu, He et al. 2008). Las MSC de tejido adiposo procedentes de ratones macho fueron caracterizadas, expandidas y trasplantadas por inyección directa al ovario de ratonas quimio tratadas, tras lo cual se observó que los ovarios sometidos al trasplante presentaban un incremento significativo en la angiogénesis y en el número de folículos y CL presentes en comparación con los controles. La histología no mostró ninguna alteración morfológica evidente en los ovarios trasplantados. Las MSC de tejido adiposo trasplantadas a los ovarios quimio expuestos mostraron una elevada capacidad de producción de citoquinas tróficas (VEGF, HGF, IGF-I) tras su incorporación al tejido ovárico. Estos resultados sugieren que la terapia celular basada en la acción de las MSC podría ejercer una acción regenerativa sobre el ovario afectado por un deterioro de la reserva folicular por efecto de la Ciclofosfamida.

### 1.8 Estrategias de citoprotección ovárica

El envejecimiento ovárico puede considerarse resultado de una reducción progresiva de número de folículos primordiales y de pérdida, en los restantes, de las capacidades de protección frente a la atresia folicular. Este fenómeno fisiológico, responsable de la disminución progresiva de la competencia folicular en los aspectos endocrino-paracrino y reproductivo, está mediado básicamente por dos vías finales de pérdida de la homeostasis celular: el Estrés Oxidativo (OS: *Oxidative Stress*) y el Estrés Carbonílico (CS: *Carbonilic Stress*). Los radicales libres de oxígeno y carbono ejercen efectos desestabilizadores tanto sobre el metabolismo celular como sobre las biomoléculas

## Introducción

estructurales, determinando un estado de labilidad que predispone al desencadenamiento de los mecanismos apoptóticos (Takehara, Yabuuchi et al. 2013).

Diferentes estudios, *in vivo* e *in vitro*, han puesto de manifiesto que el estado de óxido-reducción celular, el nivel de radicales libres de oxígeno, y la capacidad de neutralización de los mismos está significativamente reducido en los distintos compartimentos foliculares ováricos en pacientes de edad avanzada (Harman 2006).

### 1.8.1 Protección frente a estrés oxidativo

El efecto del desequilibrio entre sistemas antioxidantes y la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) sobre el metabolismo celular en el folículo ovárico, ha sido evaluado por varios estudios que han considerado como variable final de resultado el rendimiento de los ovocitos obtenidos tras estimulación ovárica en términos de calidad ovocitaria y resultado gestacional. Los resultados de dichos estudios, sumamente contradictorios, han descrito tanto la asociación negativa entre niveles de ROS y resultado gestacional, como la contraria, y hasta la ausencia de asociación constatable (Matos, Stevenson et al. 2009). Los efectos beneficiosos son del trabajo de Attaran (Tatone, Amicarelli et al. 2008), los perjudiciales de Das (Attaran and Gidwani 2003), la ausencia de los mismos de Oyawoye (Das, Chattopadhyay et al. 2006), Pasqualotto (Oyawoye, Abdel Gadir et al. 2003). Las posibles explicaciones a la heterogeneidad de resultados residirían en las notables diferencias del perfil de las pacientes estudiadas, así como en las metodologías empleadas por los diferentes autores para la cuantificación de las ROS y la evaluación de sus efectos.

## Introducción

La implicación de los niveles de ROS en el envejecimiento ovárico se ha sugerido tras el conocimiento de su capacidad para modular funciones o procesos fisiológicos como esteroidogénesis ovárica, maduración ovocitaria, luteolisis, implantación y desarrollo embrionario precoz (Pasqualotto, Agarwal et al. 2004). Existen evidencias de que el predominio del metabolismo oxidativo se asocia a disminución de la calidad ovocitaria en modelos murinos, en términos de estabilidad del huso divisional, función mitocondrial y producción de Adenosin Trifosfato (ATP) (McReynolds, Dzieciatkowska et al. 2012).

En uno de los primeros estudios en modelo humano Tatone evaluó la relación entre la edad y las alteraciones mediadas por OS detectable en CG ováricas en folículos periovulatorios (Zhang, Yang et al. 2006). Comparando poblaciones de CG procedentes de pacientes jóvenes (27-32 años) con las obtenidas de pacientes de mayor edad (38-41 años), este estudio halló que los niveles de Superóxido Dismutasa 1 y 2 (SOD1 y SOD2) y catalasa, cuantificados mediante PCR, resultaron más bajos en pacientes de edad avanzada. Adicionalmente, mediante evaluación ultraestructural de las CG se observó mayor frecuencia de alteraciones en la ultraestructura mitocondrial en las células procedentes de las pacientes de mayor edad. Estos mismos autores han asociado la disminución de la capacidad antioxidante en la granulosa folicular de pacientes con edad avanzada con la menor expresión de genes codificantes de enzimas neutralizadoras como SOD y catalasa (Tatone, Carbone et al. 2006).

Para superar las limitaciones de los métodos de cuantificación de las ROS mediante métodos simples como quimioluminiscencia, se han propuesto métodos alternativos. En el trabajo de Linton (Tatone,

## Introducción

Carbone et al. 2007), se desarrolló un procedimiento de evaluación global del OS basado en la cuantificación mediante electroforesis de los residuos oxidados incorporados a las proteínas. Estos autores y otros que han aplicado metodologías similares proponen que la acumulación de moléculas oxidadas está en relación con la edad, que se correlaciona de forma directa con el nivel de envejecimiento ovárico por OS (Linton, Davies et al. 2001) (Linton, Davies et al. 2001). En esta misma línea, McReynolds, ha evaluado la expresión proteómica y genómica diferencial de CG procedentes de mujeres de diferentes edades y se ha observado que el incremento de la edad determina diferencias significativas en la expresión de proteínas reguladoras del metabolismo oxidativo (HDS17B4) y mecanismos postranscripcionales capaces de inactivar vías fundamentales de protección frente a la apoptosis (Eaton 2006).

En consecuencia, y con las reservas derivadas de la heterogeneidad de los resultados descritos, resulta plausible la hipótesis de la asociación causal entre la acumulación de ROS y el deterioro progresivo del equilibrio funcional de las CG ováricas. La causa desencadenante de este fenómeno sería la pérdida progresiva de eficacia de los mecanismos antioxidantes protectores, de lo que resultaría la disfunción celular por estrés oxidativo y la atresia por apoptosis (McReynolds, Dzieciatkowska et al. 2012).

Los mecanismos de intervención sugeridos para limitar o revertir ese proceso deberían basarse en el restablecimiento de la actividad normal de los sistemas antioxidativos celulares, por medio de intervenciones farmacológicas, higiénico-dietéticas o basadas en terapia celular (Regan, Knight et al. 2018).

## Introducción

### 1.8.2 Protección frente a estrés carbonílico

#### 1.8.2.1 Fuentes de estrés carbonílico: biosíntesis y regulación del metabolismo de las especies reactivas de carbono

Los Productos Finales de la Glicosilación Avanzada (AGEs) constituyen un grupo heterogéneo de compuestos, formado por más de 20 variedades, entre las que cabe destacar los precursores Glioxal, metil-Glioxal y 3-deoxi-glucosona, originados por procesos glicolíticos o a través de lipoperoxidación, y los AGEs activos, como pentosidina, N-carboxi-metil-lisina (CML), pirralina, dímero metil-Glioxal-lisina (MOLD), dímero 3-deoxi-glucosona-lisina (DOLD), hidroximidazolona, glucosepano y carboxi-etil-lisina (CEL) (Tatone, Amicarelli et al. 2008). En condiciones de equilibrio fisiológico, la síntesis de AGE es lenta, mientras que, en situaciones de estrés metabólico crónico, como hiperglicemia, resistencia insulínica, envejecimiento, OS o hipoxia, la producción de AGE se incrementa sustancialmente.

La glicosilación es una de las fuentes de modificación postranscripcional más relevantes, por medio de transformación no enzimática, de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Merhi 2014) (Inagi 2011). La glicación avanzada determina una modificación no reversible de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas, que experimentan así cambios conformacionales que con frecuencia tienen consecuencias funcionales, y favorecen la disfunción metabólica celular y la apoptosis.

Los mecanismos de lesión celular mediados por los AGE son múltiples (Piperi, Adamopoulos et al. 2012) (Inagi 2011). La acción de estos compuestos no depende sólo de su interacción con receptores

## Introducción

específicos, ya que también tienen capacidad para desnaturalizar directamente las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno (Piperi, Adamopoulos et al. 2012). No obstante, los AGE circulantes pueden interactuar también sobre receptores celulares de superficie, y en concreto el Receptor de los RAGE, que pertenece a la superfamilia de los receptores a inmunoglobulinas (Piperi, Adamopoulos et al. 2012). La interacción de los AGE con este receptor conduce a la amplificación de la señal mediante mecanismos de segundos mensajeros, que activan finalmente el factor nuclear kappa-B, y favorecen cambios celulares proinflamatorios, así como toxicidad y lesión celular (Kalea, Reiniger et al. 2009).

El RAGE está constituido por un dominio externo, un dominio interno y una tercera transmembrana, se expresa en gran número de tejidos y órganos, y resulta especialmente abundante en ovario, tejidos cardiacos, músculo estriado y pared vascular. Además, diversas células sanguíneas, como monocitos, macrófagos y linfocitos, también expresan RAGE. En situación de equilibrio metabólico, y a lo largo de la mayor parte de la vida, la expresión de RAGE es escasa. A medida que se incrementa la edad del sujeto, la expresión de RAGE va en aumento, como consecuencia de la acumulación de ligandos de RAGE, que estimulan la expresión del receptor (Kalea, Reiniger et al. 2009) (Basta 2008). La acción nosógena de los RAE se ha invocado en diferentes trastornos y procesos patológicos. En situaciones como diabetes mellitus, estados inflamatorios crónicos, arterioesclerosis o síndrome de ovario poliquístico se ha observado un claro incremento de la producción de RAGE, que podrían actuar como agente etiopatogénico en adyuvancia con precursores de los propios RAGE y con otros

## Introducción

mediadores propios de los estados de inflamación crónica. (Kalea, Reiniger et al. 2009).

Además del receptor convencional, se han descrito formas de los Receptores de los RAGE carentes del dominio interno y del dominio transmembrana (Kalea, Reiniger et al. 2009) (Diamanti-Kandarakis, Piperi et al. 2007). Después de su síntesis, estas formas ‘incompletas’ del receptor pueden ser liberadas al medio extracelular y detectadas en sangre, por lo que se denominan Receptores de los Productos Finales de la Glicosilación Avanzada Solubles (sRAGE). Su presencia en la circulación periférica permite su unión a sus ligandos específicos, modulando la fracción libre de los mismos, y actuando en suma como sistema protector de los eventos moleculares intracelulares desfavorables desencadenados por los AGE. Esta fracción soluble de receptores parece estar influida por el nivel de glucemia, ya que se ha descrito su reducción en situaciones de hiperglicemia (Diamanti-Kandarakis, Katsikis et al. 2008). Se ha sugerido que la fracción soluble de los receptores podría ejercer un papel protector frente a la acción nociva de los AGE, tras la observación de la relación inversa entre la expresión de la fracción soluble de receptores y la severidad de los efectos cardiovasculares presentes en pacientes con situaciones que incrementan la síntesis de AGE (Basta 2008).

Los niveles séricos de los AGE parecen depender de fuentes endógenas y exógenas de estos compuestos. Las principales fuentes exógenas son la dieta y el consumo de tabaco. Los alimentos ricos en proteínas y grasas, como la carne, los alimentos lácteos grasos y la yema de huevo son ricos en AGE (Basta 2008). Además, algunos procedimientos culinarios ampliamente difundidos en las sociedades desarrolladas,

## Introducción

como el recalentamiento de la comida rápida precocinada, aumentan extraordinariamente el contenido en AGE de los alimentos. Un estudio experimental realizado en ratas hembra por el grupo de Diamanti-Kandarakis (Poulsen, Hedegaard et al. 2013) mostró que la exposición durante seis meses a una dieta rica en AGE se asoció con el incremento de los niveles séricos y tisulares de estos compuestos, en comparación con animales con dieta pobre en AGE y con controles con dietas normales. Los animales alimentados con dieta con alto contenido en AGE mostraron también valores promedio de glucemia basal, de insulina y de testosterona sérica significativamente mayores, así como ovarios de mayor peso.

Por otro lado, diversos experimentos animales han evidenciado que la dieta con bajo contenido en AGE puede reducir significativamente los niveles séricos de AGE, mejorar la sensibilidad a la insulina y prevenir la progresión de la enfermedad vascular (Diamanti-Kandarakis, Piperi et al. 2007) (Hofmann, Dong et al. 2002) (Vlassara, Cai et al. 2002). La dieta pobre en AGE unida a la administración de aminoguanidina, un bloqueante de la síntesis de AGE, ha mostrado también efectividad en la reducción de los niveles séricos de AGE en ratas con diabetes inducida (Uribarri, Peppia et al. 2003) (Uribarri, Peppia et al. 2003). Estudios clínicos realizados en mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) han concluido que la administración de orlistat, un inhibidor de la lipasa intestinal utilizado como adyuvante en los tratamientos de la obesidad, se asocia con una reducción de la absorción de AGE tras la ingesta de una comida rica en estos compuestos, así como de los niveles séricos de AGE en el periodo postprandial (Diamanti-Kandarakis, Piperi et al. 2007).

## Introducción

El consumo de tabaco es una fuente exógena de AGE bien conocida. Los niveles séricos de AGE tienden a ser más elevados en la población fumadora (Diamanti-Kandarakis, Katsikis et al. 2008), y las especies reactivas originadas por glicación son detectables tanto en el tabaco como en el humo de tabaco, en formas fácilmente activas para la desnaturalización de proteínas, tanto en ambiente *in vitro* como *in vivo*. La reactividad de los AGE puede ser inhibida por la aminoguanidina.

### **1.8.2.2 Mecanismos de disfunción y lesión celular mediadas por especies carbonílicas**

Las especies reactivas carbonílicas comparten con las ROS su capacidad para desnaturalizar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, resultan más estables que los compuestos reactivos de oxígeno, por lo que son capaces, a diferencia de estos, de mantener su toxicidad en el medio extracelular y ejercerla a distancia.

Los dos compuestos carbonílicos de máxima reactividad son el Glioxal y el MetilGlioxal, pertenecientes a los compuestos reactivos carbonílicos con estructura de oxo-aldehído. Ambos compuestos, y en especial el metilGlioxal, son capaces entre otros efectos de inhibir la función y la proliferación mitocondrial, de inducir apoptosis, y de inducir la producción de ROS. En concreto la interacción de las especies reactivas carbonílicas con las moléculas ricas en grupos –amino se produce mediante glicosilación postraslacional de las mismas, lo que da lugar a la formación de los llamados AGE, que incluyen entre otros, carboxi-metil-lisina, hidroimidazolonas y argipirimidinas.

## Introducción

El espectro de vías metabólicas celulares que pueden ser interferidas por la acción de los AGE es amplio, aunque se puede sistematizar agrupándolas en cuatro: efectos proinflamatorios, aumento de la resistencia insulínica, alteraciones proadipogénicas, y aumento de la producción androgénica ovárica. Cada uno de estos conjuntos de alteraciones han sido puestos en relación con la implicación de los AGE en la patogenia del SOP por un elevado número de estudios experimentales y clínicos (Merhi, McGee et al. 2014), aunque la relación de los AGE con la calidad del desarrollo folicular y con la pérdida de reserva ovárica es menos conocida.

Los datos experimentales disponibles hasta el momento, han permitido formular la hipótesis de asociación entre el OS y el CS que sustenta la denominada Teoría de Mailard (Merhi, McGee et al. 2014). La acumulación de AGE en el microambiente ovárico es un hecho constatado tanto en el contexto del envejecimiento celular fisiológico como en el de trastornos orgánicos o funcionales como la isquemia tisular o el síndrome de ovario poliquístico. La concentración progresiva de estas especies daría lugar a un efecto más prolongado en el tiempo y focalizado en el espacio en comparación con la acción del OS. Además, se ha demostrado que la acción prolongada de los AGE a lo largo de la vida reproductiva puede favorecer también el OS en los folículos primordiales y en el endotelio de los vasos estromales, por medio de la acumulación de ROS durante la foliculogénesis. En relación con la activación de vías proinflamatorias, se ha descrito que el nivel de AGE circulante presenta correlación positiva con el de marcadores inespecíficos de inflamación, como la proteína C activada, a lo largo de toda la vida (Gill, Kumar et al. 2019). Además, la acumulación tisular de AGE induce OS celular y promueve la inflamación local (Uribarri, Cai et

## Introducción

al. 2007). Por otro lado, la producción endógena de AGE, unida a la acción de los AGE exógenos, favorece un estado de estrés glicosídico y oxidativo sistémico, que aumenta la vulnerabilidad de la célula a otros mecanismos locales y sistémicos de lesión y apoptosis (Vlassara, Cai et al. 2002) (Vlassara, Cai et al. 2002). La combinación y potenciación de estos dos mecanismos es capaz de alterar el metabolismo de la granulosa, afectando tanto su capacidad antioxidante como el desarrollo de una vascularización perifolicular eficiente. El efecto final sería la esteroidogénesis deficiente, la alteración de la maduración funcional folicular y la interferencia con los mecanismos reguladores de la meiosis, lo que redundaría en empobrecimiento de la calidad citoplasmática y nuclear del ovocito. La disminución intrínseca de la capacidad antioxidante y antiglicosilante de las células unida a la disfunción mitocondrial sería la responsable tanto del incremento de las ROS como de las especies carbonílicas. Éstas a su vez favorecen la síntesis de las primeras por medio de la creación de las especies intermedias tipo AGE.

Las primeras pruebas de la presencia de proteínas desnaturalizadas por el CS fueron proporcionadas por el estudio de Diamanti-Kandarakis. Mediante técnicas inmunohistoquímicas este autor identificó una baja presencia de proteínas modificadas por la acción de los AGEs en granulosa, teca y granulosa luteinizada. Sin embargo, la expresión de los Receptores de los RAGE resultó muy intensa tanto en granulosa y teca como en endotelio vascular y células del estroma (Negrean, Stirban et al. 2007).

En un estudio experimental sobre modelo murino, Tatone observó que la expresión de Glioxalasa en ratones con edad reproductiva avanzada

## Introducción

era significativamente más baja que en especímenes jóvenes, lo que permitió establecer la hipótesis de que la acumulación de metilGloxal, principal inductor de la síntesis de AGE, era la causante del incremento de éstos y podría favorecer el incremento del OS (Diamanti-Kandarakis, Piperi et al. 2007).

Este mismo grupo ha profundizado en el estudio de los mecanismos de deterioro celular inducido por CS y con impacto en la calidad ovocitaria, por medio de diseño experimental realizado sobre ovocitos murinos. En una serie de experimentos sobre ovocitos recubiertos del cúmulo, desnudos y maduros estos autores determinaron que la producción de Gioxalasa se reduce a medida que progresa la maduración meiótica del ovocito y que la presencia de CG del cúmulo no proporciona protección frente a la detención de la meiosis inducida experimentalmente por medio de MetilGloxal. Así mismo, en este estudio observó un incremento significativo de las anomalías del huso divisional, de la condensación cromosómica y de la dinámica de la Telofase 1 en ovocitos expuestos a la acción del MetilGloxal. Dicha exposición también incrementó significativamente la cantidad de DNA desnaturalizado y la frecuencia de alteraciones de la condensación de la cromatina. Finalmente la exposición prolongada a MetilGloxal se asoció a alteraciones en la distribución mitocondrial en las CG y del potencial de óxido-reducción de la membrana mitocondrial interna (Tatone 2011).

A pesar de los datos expuestos, la información sobre la posible modulación del efecto lesivo del CS mediado por los AGE sobre el equilibrio metabólico y la capacidad proliferativa del folículo ovárico son aún insuficientes. Además de la patogenia del SOP, los AGE podrían

## Introducción

mediar otros procesos de disfunción ovárica potencialmente nocivos para la fertilidad. Varios estudios han hallado relación entre el nivel del AGE-RAGE y la pérdida de fertilidad natural. En una serie de 157 pacientes pertenecientes a un programa clínico de FIV. Jinno describió la asociación significativa negativa entre niveles de pentosidina y Carboximetil-lisina (CML) en líquido folicular y de los AGE tóxicos en suero, y la capacidad de crecimiento folicular terminal, la frecuencia de fecundación ovocitaria y de implantación embrionaria, (Tatone 2011). En este estudio, las bajas concentraciones de pentosidina en líquido folicular, así como de los AGE tóxicos en suero mostraron la mayor capacidad predictiva respecto a gestación evolutiva, que resultó independiente de la de los factores pronósticos clásicos. Así, la elevación de la concentración sérica de los AGE tóxicos por encima de 7,24 U/mL se asoció a disminución significativa de la probabilidad de obtener gestación, incluso en pacientes con edad favorable y la FSH basal normal.

Otro estudio sobre el efecto de los AGE en la respuesta a la estimulación ovárica para FIV analizó los niveles de los RAGE séricos y en líquido folicular en una serie de 33 pacientes infértiles tratadas con FIV, que fueron comparadas con 35 pacientes sanas (Jinno, Takeuchi et al. 2011). En ambos grupos de pacientes, los niveles de los RAGE resultaron varias veces más elevados en líquido folicular con respecto a los séricos, lo que sugiere que el ovario podría ser un órgano con una elevada actividad de síntesis de AGE, y quizá de liberación sistémica de los mismos. Además, los niveles séricos de las pacientes tratadas con hiperestimulación ovárica para FIV fueron significativamente más bajos que los hallados en las mujeres control. Este estudio también describe una correlación negativa tanto entre el nivel sérico de los AGE y el número de folículos

## Introducción

desarrollados mediante la estimulación ( $r = -0,71$ ;  $p = 0,01$ ), como con el número de ovocitos obtenido ( $-0,54$ ;  $p = 0,048$ ). Las pacientes que gestaron tras el tratamiento con FIV presentaban concentraciones séricas de AGE superiores a las de las pacientes que no obtuvieron gestación (Malickova, Jarosova et al. 2010). En la misma línea, Fuji y Nakajama evaluaron la relación entre los niveles periféricos y foliculares de los RAGE, y hallaron una correlación entre las concentraciones plasmáticas y en líquido folicular. Sin embargo, y al igual que en el estudio anterior, la asociación entre el nivel de los AGE en líquido folicular y el número de ovocitos obtenidos tras la estimulación se hallaba en el límite de la significación estadística (Malickova, Jarosova et al. 2010). Estos hallazgos han sugerido la utilidad de los niveles de los RAGE como estimadores indirectos del posible efecto de los RAGE libres sobre el medio celular del folículo en fase de desarrollo terminal, aunque esta hipótesis no ha sido aun suficientemente evaluada.

Los posibles efectos de los AGE sobre la conservación de la reserva funcional ovárica han sido objeto de atención por varios grupos de investigadores. En un estudio preliminar, Ambroggio analizó la hipótesis de que la concentración de los RAGE en líquido folicular de pacientes tratadas con FIV podría mostrar correlación con la expresión de hormona antimülleriana y su receptor, así como con el número de ovocitos obtenidos (Fujii and Nakayama 2010). Los niveles de los RAGE en líquido folicular no mostraron asociación estadísticamente significativa con la edad ( $r = -0,34$ ;  $p = 0,09$ ), mientras que sí se asociaron con el consumo total de gonadotropinas durante la estimulación ovárica ( $r = -0,4$ ;  $p = 0,04$ ), que resultó menor a medida que se incrementó la concentración folicular de RAGE. También se halló una correlación

## Introducción

positiva entre las concentraciones de los RAGE y el número de ovocitos obtenido ( $r= 0,77$ ;  $p=0,02$ ). Tras ajustar por edad, índice de masa corporal, FSH basal, y consumo de gonadotropinas durante la estimulación, los niveles de AGE en líquido folicular resultaron asociados de forma independiente con el número de ovocitos obtenidos, aunque la prueba de significación estadística resultó cercana al valor crítico de decisión ( $R^2= 0,25$ ;  $p= 0,045$ ). También se halló correlación significativa entre los niveles de RAGE y de AMH en líquido folicular ( $r= 0,5$ ;  $p= 0,008$ ), mientras las expresiones de ARNm de AMH y del Receptor de la Hormona Antimülleriana (AMH-R), cuantificadas mediante RT-PCR, no mostraron asociación con los niveles foliculares de los RAGE. Los autores interpretan sugiriendo que los RAGE podrían modular de forma diferente la síntesis y la liberación de AMH por las células granulosas (Zaher Merhi 1 2013). Las conclusiones más relevantes del estudio son que el nivel intrafolicular de RAGE se asocia a la cantidad de la respuesta a la estimulación ovárica, al igual que la AMH folicular.

## 2. JUSTIFICACIÓN GENERAL

Considerando el actual estado del conocimiento, la identificación de nuevos nichos de células pluripotentes con características similares a las de origen mesenquimal se revela como una aproximación prometedora al desarrollo de nuevas aplicaciones protectoras y regenerativas de la terapia celular. Las CGLOH constituyen un producto residual obtenido de la aspiración folicular realizada en el contexto de los ciclos de FIV y, por tanto, suficientemente accesible para evaluar su utilidad como fuente de células progenitoras.

## **Introducción**

La posibilidad de caracterizar y expandir mediante cultivo prolongado la fracción pluripotente de las CGLOH ha sido ya establecida y parece suficientemente reproducible. Sin embargo, el potencial protector que estas células podrían desempeñar frente a los mecanismos fisiológicos y patológicos del deterioro celular del folículo, no han sido suficientemente analizados hasta la actualidad. Tampoco existen datos sobre la dinámica de integración tisular de las CGPE y sobre su habilidad para establecer relaciones intercelulares selectivas con determinados compartimentos foliculares.

Por todo ello nuestro estudio se orienta hacia la identificación de los procedimientos más eficientes para la selección, caracterización y expansión de las CGPE, así como la evaluación de su efecto antiapoptótico, en modelos experimentales orientados a reproducir la pérdida de reserva ovárica fisiológicamente asociada al envejecimiento y la depleción folicular causada por una alta toxicidad germinal. Seleccionamos para ello dos modelos de toxicidad experimental, OS y CS, como vías moleculares finales de inducción de la apoptosis por pérdida de protección asociada al envejecimiento.

### **3. LIMITACIONES**

Respecto al perfil inmunofenotípico, hemos analizado los cultivos en una fase inicial (es decir, cultivos de células granulosas luteinizadas naive) y tras expansión. La evolución de los cultivos desde una perspectiva longitudinal no se ha analizado en fases intermedias, debido en parte a las limitaciones de la disponibilidad celular, salvo en lo referido a indicadores de eficiencia, ya que estos no requerían consumo celular. El análisis seriado de la evolución de la expresión de

## **Introducción**

inmunomarcadores es un aspecto de indudable interés, que podrá ser abordado en estudios posteriores.



# OBJETIVOS E HIPÓTESIS

## Objetivos e Hipótesis

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Generales

- Evaluar la capacidad de expresión de marcadores de pluripotencialidad en las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) obtenidas por medio de punción folicular para FIV.
- Evaluar la protección ejercida por las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) frente al daño celular inducido experimentalmente por medio de estrés oxidativo y carbonílico.

#### 4.2 Específicos

##### a) Primarios:

- Identificar y caracterizar la población de CGLOH que muestran marcadores inmunofenotípicos y capacidades de diferenciación propias de Célula Progenitora (CP).
- Evaluar la capacidad de las CGLOH con perfil de CP para proteger la granulosa folicular ovárica de la citotoxicidad oxidativa y carbonílica inducida experimentalmente.

##### b) Secundarios:

- Evaluar la eficiencia de la expansión de la población inicial de las CP.
- Caracterizar los mecanismos de protección frente a la apoptosis celular y a la inestabilidad de membranas determinada por Estrés Oxidativo (OS) y Estrés Carbonílico (CS).

## Objetivos e Hipótesis

### 5. HIPÓTESIS CONCEPTUALES Y OPERATIVAS

#### 5.1 Inmunofenotipo y actividad funcional

##### Hipótesis conceptual 1:

La CGLOH contiene una fracción minoritaria de células con capacidad de replicación y de diferenciación selectiva posterior, susceptible de expansión mediante cultivo prolongado.

##### Hipótesis operativa 1:

El cultivo prolongado de CGLOH en presencia de LIF permite la expansión de la población inicial de CG

P basalmente existentes, y la reducción progresiva por apoptosis de la población de CGLOH. Las CGP así expandidas, expresan marcadores de propios de célula mesenquimal pluripotente y ausencia de marcadores de pluripotencialidad embrionaria, y son susceptibles de diferenciación selectiva a líneas mesenquimales específicas, adipogénica, condrogénica, osteogénica, por medio de promotores adecuados.

##### Hipótesis conceptual 2:

Las CGPE presentan características funcionales diferenciadoras respecto de las CGLOH, que incluyen menor expresión de marcadores funcionales propios de CG y mayor de actividades relacionadas con la promoción de la proliferación celular, de la angiogénesis y de la protección frente a la apoptosis.

##### Hipótesis operativa 2:

Las CGPE, en comparación con las CGLOH, presentan una expresión significativamente menor del LHR, de la Actividad Aromatasa, de la Actividad HSD3B2, y una mayor expresión del HGF, del VEGF, del IGF-1,

## **Objetivos e Hipótesis**

del FGF-b, bax y bcl-2, sin que la expresión del FSHR varíe significativamente. Estas diferencias se pondrán de manifiesto mediante estudios de genética molecular.

### **5.2 Protección frente a citotoxicidad experimental**

#### **Hipótesis conceptual 3**

Las CGPE tienen efecto protector frente a la toxicidad celular ejercida sobre la CGLOH, y ejercen dicho efecto por medio de la síntesis de factores protectores frente a la apoptosis, inductores de la angiogénesis y promotores de la proliferación celular.

#### **Hipótesis operativa 3a**

El cocultivo con CGPE reduce la apoptosis y la muerte celular inducida de las CGLOH inducidas por toxicidad experimental con Peroxinitrito (Estrés Oxidativo), en comparación con la observada en cultivos de CGLOH sin adición de CGPE.

#### **Hipótesis operativa 3b**

El cocultivo con CGPE reduce la apoptosis y la muerte celular inducida de las CGLOH inducidas por toxicidad experimental con Glioxalato (Estrés Carbonílico), en comparación con la observada en cultivos de CGLOH sin adición de CGPE.

# **MATERIAL Y MÉTODO**

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Material**

#### **6.1.1 Reclutamiento de donantes de material celular.**

##### **Criterios de selección**

##### **A) Células de la Granulosa**

Con anterioridad al inicio de la estimulación ovárica, se solicitó la donación de las CGLOH a dos tipos de donantes:

- Pacientes infértiles tratadas con FIV en la Sección de Reproducción Humana Asistida de Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid), que reuniesen los siguientes criterios:
  - Edad comprendida entre los 18 y 40 años.
  - Infertilidad de causa tubárica o masculina.
  - Ausencia de diagnóstico de sospecha o confirmación de endometriosis.
  - Ausencia de criterios de sospecha de baja respuesta a la estimulación.
  - Serología negativa frente a VIH, hepatitis B, hepatitis C y sífilis realizada 15 días antes de la punción.
  
- Donantes de ovocitos reclutadas en el Instituto Europeo de Fertilidad (Madrid), que cumplieran los requisitos legalmente establecidos y los criterios de selección establecidos por el centro.

## **Material y Métodos**

### **B) Células mesenquimales multipotentes de médula ósea**

Se utilizaron MSCMO, expandidas a partir de aspiraciones de médula ósea donadas a la Unidad de Terapia Celular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Tanto las pacientes como las donantes que proporcionaron el material celular para el estudio firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

#### **6.1.2 Fuentes de información clínica**

La fuente de información del estudio fueron los datos clínicos y de laboratorio generados por la intervención terapéutica de las pacientes que accedieron a participar como donantes de material celular, y registrados en la historia clínica. El estudio se desarrolló en el ámbito de la Sección de Reproducción Asistida del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, centro terciario de referencia para técnicas de fecundación *in vitro* de las Áreas Sanitarias 1 y 2 de Madrid, así como en el Instituto Europeo de Fertilidad, centro especializado en medicina reproductiva.

## Material y Métodos

### 6.2 Métodos

#### 6.2.1 Obtención y expansión de células de la granulosa luteinizada

##### 6.2.1.1 Estimulación ovárica y punción folicular

Las pacientes que reunían los criterios de inclusión y aceptaron la cesión de muestras celulares expresaron su conformidad por medio de la firma del documento de consentimiento antes del inicio del tratamiento de estimulación ovárica. Todas las pacientes se sometieron a hiperestimulación ovárica controlada, mediante el uso de preparados de FSH bioextractiva o recombinante, y/o preparados hormonales con actividad FSH (con o sin actividad LH). Las dosis fueron determinadas para cada paciente con arreglo a criterios basados en reserva ovárica estimada, peso y en los resultados de las estimulaciones previas si existían. El control de la función hipofisaria se realizó por medio del uso de análogos agonistas o antagonistas de la GnRH.

Una vez obtenido el desarrollo de al menos tres folículos con diámetro medio superior a 17 mm, y en presencia de una concentración sérica de estradiol adecuada, se procedió a la administración subcutánea de 250 µg de hCG recombinante (*Ovitrelle®; Merck, Madrid*) 36 horas antes de la punción folicular en el caso de las pacientes estériles, o de 0,2 mg de triptorelina (*Decapeptyl 0,1 mg diario®; Seid; Barcelona*) en caso de las donantes de ovocitos.

En ambos centros, la aspiración del contenido folicular se realizó en ambiente quirúrgico, bajo anestesia y por medio de punción transvaginal ecoguiada. Se utilizaron diferentes modelos y marcas de agujas homologadas de luz única con calibre 18G (*Cook Medical,*

## Material y Métodos

*Bloomington, Estados Unidos; Gallini Medical Devices; Mirandola, Italia; Labotect; Göttingen, Alemania*) conectadas por medio de tubos estancos de polivinilo a sistemas de aspiración controlada, con los que se aplicaron presiones negativas máximas de -120 mmHg. Los líquidos foliculares obtenidos se transportaron al laboratorio de FIV en tubos *Falcon*<sup>®</sup> (*Corning, Nueva York, Estados Unidos*) de polietileno embriotestado de 14 mL de capacidad y con tapón de doble posición de ajuste que se mantuvieron a 37°C durante todo el proceso de aspiración y transporte.

Los productos de la aspiración del antro folicular fueron vertidos en placas Petri de búsqueda *Falcon*<sup>®</sup> de 90 mm diámetro (*Corning*) precalentadas a 37°C, para su observación a través de un estereomicroscopio con amplificación de 5-480x, con base diascópica encastrada en la superficie termo calefactada de una cabina de flujo laminar vertical clase II dotada con filtro HEPA H-14 (*K-System*<sup>®</sup> *IVF Workstation, Serie 200*), en cuyo interior se desarrollaron todos los procesos de manipulación celular. Tras la identificación del complejo cúmulo-ovocito en la placa de búsqueda, se procedió a recortar el cúmulo ooforo con el borde afilado de agujas de jeringas de insulina.

**Material y Métodos**

	Pacientes de FIV (n=97)		Donantes de ovocitos (n=25)	
	Media (DE)	%	Media (DE)	%
Edad (años)	34,5 (4,4)		27 (5,1)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26 (3,8)		21,9 (2,6)	
Fumadora (%)		29		28
Recuento basal de folículos antrales	14,6 (5,7)		14,5 (5,0)	
FSH basal (UI/L)	6,2 (1,3)		--	
Uso de AHO previo (%)		9,1		68
Protocolo de análogo GnRH				
Agonista largo		10,9		8
Antagonista		89,1		92
Fuente de actividad FSH				
FSHr		98,2		100
FSHu		1,8		0
HMG		20,1		0
Uso de actividad LH		26,3		4
Dosis inicial FSH (UI)	198,9 (57,5)		178,4 (37,9)	
Consumo total de FSH (UI)	1777,1 (548,8)		1561,2 (479,2)	
Días estimulación	9,2 (1,5)		9 (1,3)	
Estradiol final (pg/mL)	1943,2 (906,8)		--	
Folículos > 10 mm	10,0 (2,6)		14,8 (4,6)	
Folículos > 15 mm	6,4 (2,5)		11,6 (4,2)	
Folículos > 17 mm	4,2 (1,5)		8,7 (3,4)	
Ovocitos totales	10,7 (6,8)		11,5 (4,5)	
Ovocitos en metafase II	7,9 (5,1)		9,4 (3,7)	

Tabla 1: Características basales de las pacientes fuente de las células de la granulosa y de la estimulación ovárica.

## Material y Métodos

### 6.2.1.2 Aislamiento de la Células de la Granulosa Luteinizadas

Una vez trasladado al laboratorio de cultivos celulares, el líquido folicular y todas las células en suspensión fueron aspiradas y depositadas en un tubo graduado *Falcon*<sup>®</sup> de 15 mL de fondo cónico para medir el volumen.

A continuación, fue centrifugado durante 5 minutos a 111g y a una temperatura de 22°C para realizar una primera depuración de contenido hemático y otras impurezas. El pellet obtenido se resuspendió en 6 mL de medio DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle Medium with Glutamax*<sup>®</sup> *Gibco*<sup>®</sup>, *Thermo Fisher Scientific*<sup>®</sup>; *Waltham, Massachusetts, Estados Unidos*), con 4,5 g/L de D-glucosa y piruvato (*Gibco*<sup>®</sup>, *Thermo Fisher Scientific*<sup>®</sup> 11885084) suplementado con 10% de suero fetal bovino (*Gibco*<sup>®</sup>, *Thermo Fisher Scientific*<sup>®</sup>) y 1% de solución comercial antibiótica-antifúngica, que contenía 10.000 unidades de Penicilina-G/mL; 10.000 µg de Estreptomicina/mL y 25µg de Amfotericina B/mL (*Omega Scientific AA-40; Tarzana, California, Estados Unidos*), y se depositó sobre una fase de solución Ficoll (*Ficoll*<sup>®</sup>-*Paque Premium GE Healthcare; Sigma-Aldrich GE17-5442-02; San Luis, Misuri, Estados Unidos*) en proporción 30:20 para la separación de la fracción celular por gradiente continuo de densidad. Tras su centrifugación a 400g y 22°C durante 30 minutos, se recuperaron las células de la interfase mediante aspiración. Todas las fases del procesamiento, al igual que las siguientes que se desarrollaron fuera del ambiente de incubación, fueron ejecutadas dentro de cabinas de flujo laminar clase II.

Los cúmulos celulares obtenidos fueron disgregados mediante aspiración reiterada con pipeta Pasteur, y lavados con 14mL de DMEM

## Material y Métodos

completo. La solución se centrifugó durante 10 minutos, a 290 g y 22°C. Tras la repetición del proceso de disgregación y lavado, se indujo un choque osmótico añadiendo al pellet 1mL de agua destilada y pipeteando enérgicamente durante 1 minuto. La exposición hipoosmótica se bloqueó con adición 10mL de DMEM completo, tras la que se centrifugó durante 10 minutos a 290 g y 22°C. El pellet se resuspendió en 2 mL de DMEM completo con LIF (*Leukemia Inhibiting Factor; Sigma-Aldrich L5283*) para proceder al conteo celular.

Para el recuento y la evaluación de la viabilidad celular, se realizó una tinción de 10µL de muestra con solución de Tripán Blue al 0,4% (*Sigma-Aldrich T8154*) en una proporción 1:1. El recuento celular se realizó con una cámara Neubauer modificada (*Neubauer Improved®, Marienfeld Laboratory Glassware, Alemania*).

### 6.2.1.3 Criopreservación y almacenamiento

Una vez determinado el recuento celular, se concentró nuevamente la muestra mediante centrifugación durante 10 minutos a 290g y 22°C, tras lo cual se añadieron al pellet 4,5 mL de solución de suero fetal bovino (*Sigma-Aldrich F6178*) y la muestra se repartió en 5 criotubos Nunc® (*Sigma-Aldrich V7634*). A cada uno de los criotubos se le añadieron 100 µL de crioprotector (*Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich D2650*), de forma progresiva y en agitación. Los criotubos se introdujeron en un criocontenedor (*Nalgene® Mr. Frosty; Sigma-Aldrich C1562*) para obtener un descenso térmico gradual desde temperatura ambiente hasta -80°C. Los contenedores fueron depositados en un ultracongelador (*Thermo Scientific, Serie TSX*) a -86 °C. Tras 3-4 días, los

## **Material y Métodos**

criotubos fueron trasladados a recipientes criogénicos de inmersión en nitrógeno líquido, donde fueron almacenados hasta su utilización.

### **6.2.1.4 Descongelación**

La elección de las muestras para su descongelación se aleatorizó por medio de una secuencia generada mediante ordenador, y referida a la muestra y la alícuota. Las alícuotas seleccionadas se extrajeron del tanque de almacenamiento y se pasaron a un recipiente con hielo seco. Seguidamente, se introdujeron en un baño a 37°C y se mantuvieron en agitación hasta la licuefacción de los cristales. El contenido de los criotubos se traspasó a un tubo con 30 mL de DMEM completo previamente calentado a 37°C y se realizó un lavado (10 minutos, 290 g, 22°C). El sedimento se resuspendió en 2 mL de DMEM completo para proceder al recuento y a la evaluación de la viabilidad celular. Se extrajo una muestra de 10 µL de la solución, que fue teñida con Tripan Blue según la técnica ya descrita.

### **6.2.1.5 Depleción de células CD3+**

La utilización de muestras de granulosa procedente de varias pacientes para su cultivo conjunto obligó a la depleción de las muestras para la eliminación de células T capaces de reconocer aloantígenos, e inducir respuesta inmune. El procedimiento se detalla en el apartado correspondiente (5.2.4.2. Métodos de cuantificación y medida).

## Material y Métodos

### 6.2.1.6 Cultivo y expansión de las Células de la Granulosa Luteinizadas

La suspensión celular en DMEM completo con LIF se depositó en un frasco de cultivo (*Falcon®*, *Corning*) con el volumen adecuado para obtener una ratio de 160.000 células/cm<sup>2</sup>. Los recipientes de cultivo fueron incubados en condiciones convencionales (37°C; 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa) en equipos de cultivo celular homologados (*Thermo Scientific®* *Forma®* *Steri-Cycle®*, Modelo 3308).

La renovación del medio de cultivo se realizó cada tres días, mediante vaciamiento del medio por inclinación del frasco, y rellenado con un volumen de DMEM completo igual al extraído. Los cultivos fueron examinados al microscopio invertido semanalmente, con el fin de evaluar la morfología celular, y determinar el grado de cobertura de la superficie de cultivo por células adherentes, así como la presencia de células no adheridas en suspensión no eliminadas al sustituir del medio.

Cuando se observó una confluencia de las áreas cubiertas por células adheridas superior al 80% de la superficie, el cultivo fue dividido y replantado en nuevos frascos de cultivo, con el fin de evitar el detenimiento de la proliferación celular a causa de una inhibición por contacto, al déficit de nutrientes o a un exceso de catabolitos. Este proceso, que se ha denominado *pase del cultivo*, se inició con el levantamiento de las células adheridas mediante tripsinización, con el fin de obtener su resuspensión. Tras la eliminación del medio de cultivo por vaciamiento, se prosiguió con un lavado en agitación con PBS (Phosphate Buffered Saline, *Gibco®* *Life Technologies*) destinado a eliminar los restos del medio de cultivo y las células que no presentaban adherencia. A continuación, se añadió solución TrypLE

## **Material y Métodos**

Select® (*Gibco®*, *Thermo Fisher Scientific®*) en un volumen adecuado a la superficie del frasco de cultivo (2 mL para frascos de 25 cm<sup>2</sup>, 5 mL para los de 75cm<sup>2</sup> y 10 mL para los de 175 cm<sup>2</sup>), manteniendo los recipientes a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. La acción de la solución enzimática fue bloqueada con la adición en cada frasco de un volumen similar de DMEM completo.

Finalizado este proceso, el contenido de los frascos fue traspasado a tubos de fondo cónico para su centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos. El sedimento obtenido fue resuspendido en un volumen conocido de medio para determinar la concentración celular aplicando el procedimiento ya descrito. Tras un nuevo lavado con PBS, la muestra fue dividida y traspasada en volúmenes adecuados a frascos de cultivo con la superficie necesaria para obtener una celularidad de 5.000 células/cm<sup>2</sup>, en los que se depositó además el volumen necesario de DMEM completo.

El proceso de expansión quedó limitado a un máximo de cuatro pases o seis semanas de cultivo. En caso de no observarse expansión clara del cultivo entre dos observaciones, por abundancia de células senescentes, ausencia de adherencia o baja viabilidad, los frascos fueron desechados.

### **6.2.2 Obtención de las Células Mesenquimales Multipotentes de Medula Ósea**

#### **6.2.2.1 Aspiración de médula ósea**

Las MSCMO fueron cedidas por el Laboratorio de la Unidad de Producción Celular del Laboratorio de Órganos Bioartificiales y Matrices Celulares del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio

## Material y Métodos

Marañón. Las muestras procedían de la cesión con fines de investigación de pacientes del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Dicha cesión había sido formalizada mediante un consentimiento para el uso del material celular con fines de investigación.

Las aspiraciones medulares se llevaron a cabo antes del inicio de las intervenciones ortopédicas en cadera o rodilla indicadas en los pacientes, en ámbito estéril y bajo anestesia locorregional. Una vez asepticada la piel con solución de povidona yodada (*Betadine®*, *Meda Pharma S.A, Madrid*), se procedió al aislamiento de la zona de punción por medio de colocación de campos estériles. Para la aspiración se utilizó un trócar canulado homologado (*Bone Marrow Aspiration System; BMAS®*, *Synthes, Alemania*) de 11 cm de longitud y con un calibre de 11 G, dotado de mango apto para la percusión, de aguja central para evitar la obturación del canal durante la punción, y de orificios laterales en la vaina de aspiración, que se realizó con jeringa de 20 mL con conexión Luer-Lock.

Según los protocolos de muestras aplicados en la Unidad de Producción Celular de la que procedían las muestras, las punciones se realizaron en la cresta iliaca, en la metáfisis distal del fémur o en la tuberosidad anterior de la tibia. Se efectuaron aspiraciones intermitentes, girando tras cada una de ellas el trócar tras obtener unos 2 mL de aspirado, con el fin de modificar la orientación de los orificios laterales del trócar. El procedimiento se dio por finalizado una vez obtenido un volumen total de aspiración de alrededor de 5 mL. El producto de la aspiración fue depositado en una bolsa estéril de hemoderivados por medio de una conexión estanca, y que contenía 1mL solución comercial de heparina

## Material y Métodos

sódica al 5% (*Heparina 5% Mayne®*, Laboratorios Rovi, Madrid) por cada 10 mL de aspirado de médula ósea.

### 6.2.2.2 Aislamiento de las Células Mesenquimales Multipotentes de Medula Ósea

En ambiente de esterilidad (unidad de producción celular), el producto de la aspiración medular fue extraído de la bolsa de hemoderivados por medio de aspiración con jeringa estéril realizada a través de un filtro hematológico estándar con microporos de 200  $\mu\text{m}$  diámetro (*Transmed 79.8200.500*; Sarstedt; Alemania) con el fin de eliminar coágulos sanguíneos, esquirlas de hueso y flóculos de grasa. De cada muestra se separó en fresco una alícuota de 100  $\mu\text{L}$ , que fue destinada a análisis hematocitométrico y a citometría de flujo basal, para determinar el número de células blancas y el grado de contaminación con sangre periférica.

Una vez filtrado, el producto de la aspiración de médula ósea fue sometido a fraccionamiento celular mediante centrifugación en gradientes de densidad de Ficoll (*Ficoll®-Paque Premium GE Healthcare*; Sigma-Aldrich GE17-5442-02), con el objeto de concentrar las células mononucleares para su procesamiento posterior. Se depositaron 20 mL de solución de Ficoll en el fondo de tubos de fondo cónico, en el número necesario para distribuir por completo la solución de aspirado medular diluida con PBS. Se depositaron cuidadosamente 30 mL de ésta sobre la fase basal de 20 mL de Ficoll vertida previamente en cada tubo, evitando la mezcla de las soluciones en la interfase. Los tubos fueron centrifugados a 400 g durante 20 min, y a 22°C, por medio de una

## Material y Métodos

centrífuga dotada de programa de centrifugación sin aceleración ni freno (*Eppendorf 5810R®; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania*).

Dentro de los diez minutos siguientes a la centrifugación, se procedió a la aspiración cuidadosa con micropipeta de la capa intermedia comprendida entre el sobrenadante plasmático y la fase de solución de Ficoll. Las interfases aspiradas se depositaron en tubos de fondo cónico para su lavado con solución de PBS (50 mL por tubo). Los tubos fueron centrifugados a 300 g y a 22°C durante 10 minutos.

Una vez concluida esta fase, se sometió a la muestra a choque osmótico con el fin de lisar los eritrocitos remanentes. A tal efecto, al sedimento obtenido del procesamiento anterior se le añadió 1 mL de agua bidestilada estéril, realizando agitación suave de la muestra durante 1 minuto, tras el cual el choque fue neutralizado añadiendo solución de DMEM completo con suplemento del 10% de suero fetal bovino, hasta completar el volumen del tubo. Seguidamente, se repitió la centrifugación a 300g y a 22°C durante 10 minutos. El sobrenadante fue decantado, y el sedimento resuspendido en 10mL de DMEM completo suplementado con suero fetal bovino al 10%.

### **6.2.2.3 Determinación de concentración y viabilidad de las Células Mesenquimales Multipotentes de Medula Ósea**

Una alícuota de 10  $\mu$ L de esta solución celular fue teñida con un volumen similar de solución de Azul Tripan, con objeto de medir la concentración de células viables por medio del uso de una cámara de Neubauer mejorada.

## Material y Métodos

### 6.2.2.4 Cultivo y expansión de las Células Mesenquimales Multipotentes de Medula Ósea

Determinada la concentración de células viables presentes en la muestra, se realizaron los ajustes de concentración y se calcularon las superficies de cultivo necesarias para realizar la siembra inicial del cultivo a una concentración de 160.000 células/cm<sup>2</sup>. Como medio de cultivo se utilizó DMEM completo (suplementado con glutamato, suero bovino fetal al 10%, y penicilina-estreptomina al 1%). Los recipientes de cultivo fueron incubados en condiciones convencionales (37°C; 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa) en equipos de cultivo celular homologados (Thermo Scientific™ Forma™ Steri-Cycle™, Modelo 3308).

La renovación del medio de cultivo se realizó cada tres días, mediante vaciamiento del medio por inclinación del frasco, y rellenado con un volumen de DMEM completo igual al extraído. Los cultivos fueron examinados al microscopio invertido semanalmente, con el fin de evaluar la morfología celular, y determinar la confluencia o grado de cobertura de la superficie de cultivo por células adherentes, así como la presencia de células no adheridas en suspensión no eliminadas en la sustitución del medio.

Cuando se observó una confluencia de las áreas cubiertas por células adheridas superior al 80% de la superficie, el cultivo fue dividido y replantado en nuevos frascos de cultivo, con el fin de evitar la detención de la proliferación celular por inhibición por contacto, por déficit de nutrientes o exceso de catabolitos. El pase del cultivo se inició con el levantamiento de las células adheridas mediante tripsinización, con el fin de obtener su resuspensión.

## Material y Métodos

Tras la eliminación del medio de cultivo por vaciamiento, se inició la tripsinización con un lavado en agitación con PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco® Life Technologies) destinado a eliminar los restos del medio de cultivo y las células no adherentes. A continuación, se añadió solución de enzimas de disociación TrypLE Select® (Gibco® Life Technologies), en un volumen adecuado a la superficie del frasco de cultivo (2mL para frascos de 25cm<sup>2</sup>, 5mL para los de 75cm<sup>2</sup> y 10mL para los de 175cm<sup>2</sup>), manteniendo los frascos de cultivo a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo necesario para que tuviese efecto la acción enzimática se añadió en cada frasco un volumen similar de DMEM completo.

Finalizado este proceso, el contenido de los frascos fue traspasado a tubos de fondo cónico para su centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos. El sedimento obtenido fue resuspendido en un volumen conocido de medio para determinar la concentración celular aplicando el procedimiento ya descrito. Tras un nuevo lavado con PBS, la muestra fue dividida y traspasada a frascos de cultivo con la superficie necesaria para albergar volúmenes adecuados a una concentración de 5.000 células/cm<sup>2</sup>, en los que se depositó además el volumen necesario de DMEM completo.

Para salvaguardar la bioseguridad el cultivo, y con el fin de no generar ninguna alteración, el proceso de expansión quedó limitado a un máximo de cuatro pases o seis semanas de cultivo. En caso de no observarse expansión clara del cultivo entre dos observaciones, por abundancia de células senescentes, ausencia de adherencia o baja viabilidad, los frascos fueron desechados.

## Material y Métodos

### 6.2.2.5 Criopreservación y almacenamiento de las Células Mesenquimales Multipotentes de Medula Ósea

Una vez determinado el recuento celular, se concentró la muestra mediante centrifugación durante 10 minutos a 290 g y 22°C, tras lo cual se añadieron al pellet 4,5 mL de solución de suero fetal bovino (*Sigma-Aldrich F6178*) y la muestra se repartió en 5 criotubos Nunc® (*Sigma-Aldrich V7634*). A cada uno de los criotubos se le añadieron 100 µL de crioprotector (*Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich D2650*), de forma progresiva y en agitación. Los criotubos se introdujeron en un criocontenedor (*Nalgene® Mr. Frosty; Sigma-Aldrich C1562*) para obtener un descenso térmico gradual desde temperatura ambiente hasta -80°C. Los contenedores fueron depositados en un ultracongelador (*Thermo Scientific, Serie TSX*) a -86°C. Tras 3-4 días, los criotubos fueron trasladados a recipientes criogénicos de inmersión en nitrógeno líquido, donde fueron almacenados hasta su utilización.

### 6.2.3 Diseño experimental y metodología general

#### 6.2.3.1 Evaluación de la adhesividad y la morfología

La morfología de las células en expansión se evaluó mediante microscopía invertida de campo claro y contraste de fases, realizándose un registro de la evolución de las mismas en cuanto al aspecto del cultivo, porcentaje de capa celular adherida y morfología celular.

#### 6.2.3.2 Caracterización inmunofenotípica

El perfil inmunofenotípico de las muestras celulares de las CGLOH, de las CGPE y las MSCMO se estudió mediante identificación por citometría

## Material y Métodos

de flujo de los marcadores de referencia para células progenitoras pluripotentes de origen mesenquimal.

Siguiendo los criterios de la *ISCT* (*Internacional Society Cellular Therapy*) (Dominici M et al. 2006), se han utilizado anticuerpos específicos para la detección de la expresión de proteínas de membrana celular consideradas como marcadores positivos (Tabla 2) y negativos (Tabla 3), cuya presencia y ausencia constituye el criterio actual para la caracterización de las células progenitoras mesenquimales adultas.

MARCADORES POSITIVOS							
	Nombre Alternativo	Descripción	Tipo de Anticuerpos	Aplicaciones	Clon	Isotipo	Conjugar
<b>CD105</b>	ENG	Antibody, anti-mouse	Anticuerpo primario	FC	MJ7/18	Rat IgG2ak	PE
<b>CD73</b>	NT5E	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	AD2	Mouse IgG1κ	APC
<b>CD90</b>	Thy-1	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	DG3	Human IgG1	FITC

*Tabla 2: Anticuerpos específicos para la detección de la expresión de proteínas de membrana celular consideradas como marcadores positivos, cuya presencia constituye el criterio para la caracterización de las células progenitoras mesenquimales adultas.*

**Material y Métodos**

MARCADORES NEGATIVOS							
	Nombre Alternativo	Descripción	Tipo de Anticuerpos	Aplicaciones	Clon	Isotipo	Conjugar
<b>CD45</b>	Ptprc	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	5B1	Mouse IgG2a	VioBlue
<b>CD34</b>	gp105-120	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	AC136	Mouse IgG2a	VioBlue
<b>CD14</b>	LPS R	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	TÜK4	Mouse IgG2ak	PerCP
<b>CD19</b>	B4	Antibody, anti-mouse	Anticuerpo primario	FC	6D5	Rat IgG2ak	PerCP
<b>HLA-DR</b>	HLA-DRA	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	AC122	Mouse IgG2a	PerCP

*Tabla 3: Anticuerpos específicos para la detección de la expresión de proteínas de membrana celular consideradas como marcadores negativos, cuya ausencia constituye el criterio para la caracterización de las células progenitoras mesenquimales adultas.*

Con el fin de obtener una mejor caracterización celular, se han incluido anticuerpos específicos para identificar la expresión de marcadores positivos (Tabla 4) y negativos adicionales (Tabla 5) (Zaher Merhi 2013) (Tarnok, Ulrich et al. 2010).

**Material y Métodos**

MARCADORES POSITIVOS							
	Nombre Alternativo	Descripción	Tipo de Anticuerpos	Aplicaciones	Clone	Isotipo	Conjugar
<b>CD71</b>	TFRC	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	AC102	Mouse IgG2 $\alpha$ κ	PE
<b>CD106</b>	VCAM1	Antibody, anti-mouse	Anticuerpo primario	FC	429 MVCAM.A	Rat IgG2 $\alpha$ κ	APC
<b>CD184</b>	CXCR4	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	12G5	Mouse IgG2 $\alpha$ κ	APC
<b>CD309</b>	VEGF-KDR	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	ES8-20E6	Mouse IgG1κ	PE

*Tabla 4: Anticuerpos adicionales específicos para la detección de la expresión de proteínas de membrana celular consideradas como marcadores positivos, cuya presencia constituye el criterio para la caracterización de las células progenitoras mesenquimales adultas.*

MARCADORES NEGATIVOS							
	Nombre Alternativo	Descripción	Tipo de Anticuerpos	Aplicaciones	Clone	Isotipo	Conjugar
<b>CD117</b>	c-kit	Antibody, anti-mouse	Anticuerpo primario	FC	3C11	Rat IgG2bκ	FITC
<b>CD31</b>	PECAM-1	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	REA730	Human IgG1	PerCP
<b>CD271</b>	NGFR	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	ME20.4-1.H4	Mouse IgG1κ	PE
<b>CD133</b>	PROM1	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	AC133	Mouse IgG1κ	APC
<b>CD3</b>	CD3e	Antibody, anti-human	Anticuerpo primario	FC	BW264/56	Mouse IgG2 $\alpha$ κ	FITC

*Tabla 5: Anticuerpos adicionales específicos para la detección de la expresión de proteínas de membrana celular consideradas como marcadores negativos, cuya ausencia constituye el criterio para la caracterización de las células progenitoras mesenquimales adultas.*

## Material y Métodos

### 6.2.3.3 Diferenciación *in vitro* inducida

#### 6.2.3.3.1 Diferenciación osteogénica

Se sembraron 40.000 células/cm<sup>2</sup> en un soporte de cultivo tipo *Slide-Flask* (*Thermo Scientific 170920*), al cual se le añadió medio de diferenciación osteogénica (*StemMACS® OsteoDiff Media; Miltenyi Biotec 130-091-678, Madrid*). El medio fue sustituido cada 3 días durante 10 días de cultivo. A lo largo del mismo, se fue registrando tanto el porcentaje de capa celular adherida a la superficie del soporte como la morfología de dichas células.

Transcurrido este tiempo se procedió a la tinción de la muestra. Las extensiones celulares se fijaron mediante solución de isopropanol al 90% durante 30 minutos, tras los cuales se tiñó con Rojo Alizarín (*Sigma-Aldrich A5533*) durante 2-4 minutos. Los portaobjetos fueron lavados a continuación con agua destilada, y posteriormente, sometidos a contra tinción con hematoxilina (*Merck MHS16*) durante 2-3 minutos para posteriormente lavar con agua corriente y por último con agua destilada.

Para evaluar la diferenciación osteogénica, se observó y documentó la presencia de acúmulos intracitoplasmáticos de calcio rojo Alizarin positivos, en el seno de agregados celulares con morfología característica, caracterizada por la formación de espacios intercelulares.

#### 6.2.3.3.2 Diferenciación condrogénica

Se sembraron 80.000 células/cm<sup>2</sup> contenidas en una gota de 5 µL de medio, en uno de los pocillos de en una placa de 4 pocillos. En el pocillo

## Material y Métodos

adyacente se depositaron 500  $\mu$ L de agua destilada para favorecer el intercambio de gases y aportar la humedad necesaria. Tras incubar durante 1 hora a 37  $^{\circ}$ C, se añadieron 500  $\mu$ L de medio de diferenciación condrogénica (*StemMACS<sup>®</sup> ChondroDiff Media*; MiltenyiBiotec 130-091-679). El medio se renovó cada 3 días, hasta un total de 14 días de cultivo. A lo largo de este periodo se evaluó tanto la confluencia del cultivo como la morfología celular.

Tras catorce días de cultivo, se realizaron extensiones celulares en portaobjetos que fueron fijadas con formalina al 10% o formaldehído al 4% durante 30 minutos. La tinción se realizó con Azul de Toluidina (*Sigma-Aldrich 89640*) durante 1-5 minutos, lavando posteriormente la muestra con agua abundante.

Se consideró positiva la diferenciación condrogénica cuando se detectó la presencia de acúmulos intracitoplasmáticos de proteoglicanos visibles mediante tinción con azul de toluidina, y propios de la actividad de síntesis de los condrocitos.

### 6.2.3.3.3 Diferenciación adipogénica

Se sembraron 130.000 células en recipiente tipo *Slide Flask* con DMEM completo + LIF, reemplazando el medio cada 3 días, hasta obtener una confluencia celular del 100%. A partir de este momento, se inició la diferenciación por medio de la exposición al sistema de medios *MSC AdipoDiff Media* (*Lonza Ibérica Products, Barcelona*), que consta de tres ciclos de 6 días de duración cada uno. Cada uno de los ciclos de seis días se divide a su vez de dos fases:

## Material y Métodos

- Durante los 3 primeros días, las células estuvieron expuestas al medio de inducción adipogénica (*hMSC Adipogenic Induction Medium*; Lonza Ibérica Products, Barcelona) constituido por medio basal (*Lonza Ibérica Products PT-3102B*) y por aditivo *Singlequots*<sup>®</sup> (*Lonza Ibérica Products PT-4135*).
- Durante los tres días siguientes, las células se expusieron a medio de mantenimiento *hMSC Adipogenic Maintenance Medium*, compuesto de medio basal (*Lonza Ibérica Products PT-3102A*) y por aditivo *Singlequots*<sup>®</sup> (*Lonza Ibérica Products PT-4122*).

Una vez completados los 3 ciclos de diferenciación, el cultivo se mantuvo en medio de mantenimiento durante 6 días más, renovando el medio cada 3 días. Durante esta fase se observaron las características morfológicas de las células y su evolución.

Al término del periodo descrito, se realizó la fijación por medio de la exposición a formaldehído al 4% (*Carlo Erba Reagents, Sabadell, España*) durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguida de tinción con solución comercial de *Oil Red* (*Merck Millipore 102419; Burlington, Massachusetts, Estados Unidos*) durante 20 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Para finalizar se lavó dos veces con agua destilada durante 5 minutos. Se definió como criterio de diferenciación adipogénica, la presencia de vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas visibles mediante la tinción con *Oil Red*.

### 6.2.3.4 Caracterización de la actividad funcional

Se ha analizado la expresión de genes relacionados con la actividad funcional de las células, y en especial con su receptividad a las

## Material y Métodos

gonadotropinas y con su actividad esteroideogénica (Tabla 6), así como genes relacionados con la multipotencialidad (Tablas 7 a 12). La expresión del gen GUSB, codificante de la beta-glucuronidasa, fue utilizado como control.

GEN	DESCRIPCIÓN	MIM	HGNC
FSHR	Receptor de FSH	*136435	3969
LHCGR	Receptor de LH/HCG	*152790	6585
CYP19A1	Actividad Aromatasa	*107910	2594
AMH	Hormona Antimülleriana	*600957	464
INHBB	Cadena $\beta$ B de la Inhibina	*147390	6067
HSD3B1	Actividad 3- $\beta$ -OH-Esteroide-Deshidrogenasa Tipo 1	*109715	5217
HSD3B2	Actividad 3- $\beta$ -OH-Esteroide-Deshidrogenasa Tipo 2	*613890	5218

*Tabla 6: Genes relacionados con la Memoria Funcional de Origen*

GEN	DESCRIPCIÓN	MIM	HGNC
KIT	c-KIT	*164920	6342
CD90	Glicoproteína perteneciente al receptor de superficie Thy-1 de Células T	*188230	11801
ENG	Endoglina	*131195	3349
CD34	Glucoproteína transmembrana	*142230	1662

*Tabla 7: Genes relacionados con la Multipotencialidad de las Células Progenitoras Adultas Hematopoyéticas.*

**Material y Métodos**

GEN	DESCRIPCIÓN	MIM	HGNC
CD44	Glicoproteína Fagocítica Tipo 1	*107269	1681
PTPRC	Receptor Tipo C de la Tirosín-Fosfatasa	*15146	9666

*Tabla 8: Genes relacionados con la Estirpe Celular Hematopoyética*

GEN	DESCRIPCIÓN	MIM	HGNC
ALCAM	Molécula de Adhesión Celular de Leucocitos Activados	*601662	400
NT5E	5'-nucleotidasa	*129190	8021
VCAM	Proteína de Adhesión Celular Vascular Tipo 1	*192225	12663
LGR5	Receptor Acoplado a Proteína G Tipo 5	*606667	4504
ITGB1	Subunidad $\beta$ 1 de la Integrina	*135630	6153

*Tabla 9: Genes relacionados con Multipotencialidad de Células Progenitoras Adultas Mesenquimales.*

**Material y Métodos**

GEN	DESCRIPCIÓN	MIM	HGNC
NANOG	Factor de Transcripción de Homeobox de DNA implicados en proliferación de Células Embrionarias, y Marcador de Pluripotencialidad y Capacidad Regenerativa.	*607937	20857
DPPA3	Stella	*608408	
SOX2	SRY-box 2. Gen determinante de la Diferenciación Sexual	*184429	11195
POU5F1	Oct4. Gen tipo <i>Homeobox</i> Codificante del Factor de Transcripción Tipo 1 asociado al Dominio POU Clase 5	*164177	9221
TERT	Telomerasa Transcriptasa Inversa	*187270	11730
LMNA	Gen codificante de Lamin A, Proteína Estructural de la Lámina Nuclear	*150330	6636

*Tabla 10: Genes relacionados con Pluripotencialidad Embrionaria.*

GEN	DESCRIPCIÓN	MIM	HGNC
DAZL	Gen homólogo al delecionado en Azoospermia	*601486	2685
DDX4	<i>DEAD-box</i> Helicasa Tipo 4. VASA	*605281	18700

*Tabla 11: Genes relacionados con Pluripotencialidad Germinal.*

**Material y Métodos**

<b>GEN</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>MIM</b>	<b>HGNC</b>
FGF2	Factor de Crecimiento Fibroblástico	*134920	3676
HGF	Factor de Crecimiento Hepatocitario	*142409	4893
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico	*131550	3229
BCL2	Gen asociado al Linfoma de Células B	*51430	990
ESR2	Receptor Estrogénico Tipo $\beta$	*601663	3468
CAT	Actividad Catalasa	*115500	1516
SOD1	Actividad Superóxido-Dismutasa 1	*147450	11179
SOD2	Actividad Superóxido-Dismutasa 2	*147460	11180
GLO1	Actividad Glioxalasa 1	*138750	4323
IGF1	Factor de Crecimiento Insulinoide Tipo I	*147440	5464

*Tabla 12: Genes relacionados con Actividades Citoprotectoras.*

<b>GEN</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>MIM</b>	<b>HGNC</b>
GUSB	Actividad Beta-Glucuronidasa	*611499	4696

*Tabla 13: Gen Control.*

## Material y Métodos

### 6.2.3.5 Experimentos sobre protección frente a citotoxicidad experimental

#### 6.2.3.5.1 Toxicidad experimental mediada por Peroxinitrito

Con objeto de determinar la dosis tóxica más adecuada para evaluar el efecto del Peroxinitrito o dosis letal 50 (DL50) y el posible efecto protector propuesto en la hipótesis, se realizó un experimento preliminar de toxicidad basal (Figura 9). A partir de la muestra celular obtenida tras el levantamiento de los cultivos, se elaboraron diluciones para depositar  $10^5$  células por tubo de 6mL, usando como diluyente 500 $\mu$ L de DMEM completo, que contenía Peroxinitrito (*Sigma-Aldrich 20-107*) en cuatro concentraciones diferentes (50, 100, 250 y 500  $\mu$ M). Como control negativo se utilizó un quinto tubo usando como diluyente DMEM completo sin Peroxinitrito.

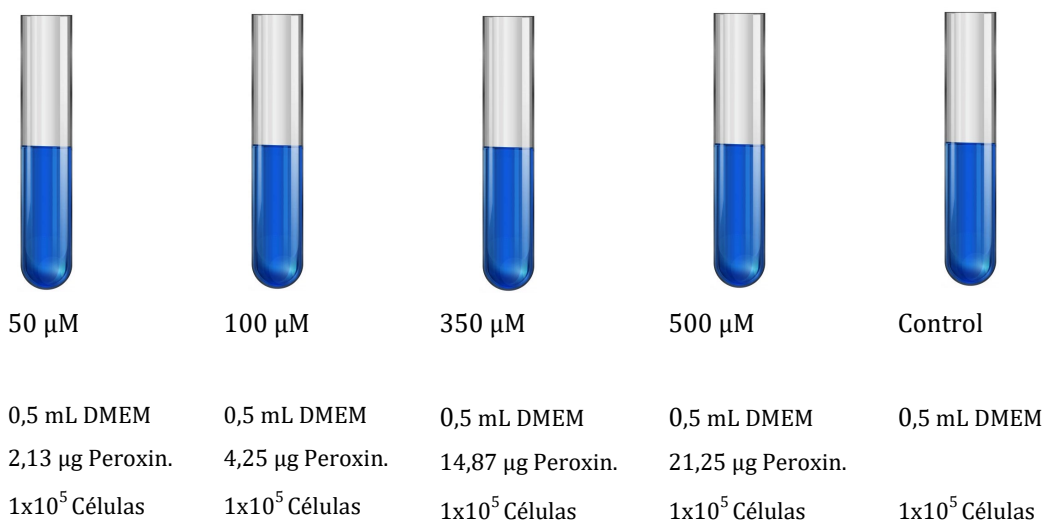


Figura 9: Experimento para el cálculo de la Dosis Letal 50 del Peroxinitrito.

## Material y Métodos

Las series de cultivo, que se realizaron por triplicado, se incubaron en condiciones convencionales (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad) a lo largo de diferentes periodos de tiempo (0, 2, 8 y 24 horas), transcurridos los cuales se midió apoptosis y muerte celular cuantificando la expresión de Anexina V y Ioduro de Propidio respectivamente mediante citometría de flujo, como se describe más adelante.

Una vez determinada la DL50, a partir de las soluciones celulares obtenidas tras resuspensión del sedimento derivado de la centrifugación del producto de levantamiento de los cultivos primarios, se elaboraron diluciones adecuadas para sembrar poblaciones de 10<sup>5</sup> células por tubo de 6mL usando como diluyente 500µL de DMEM completo. Igualmente, tras descongelación de CGLOH se elaboró una suspensión de estas células en medio de cultivo y a concentración similares. Como agente oxidativo se empleó Peroxinitrito (*Sigma-Aldrich 20-107*), a una concentración de 350 µM.

Para determinar el efecto tóxico del agente oxidante a la dosis escogida, a las 10<sup>5</sup> CGLOH se añadieron en diferentes tubos (Figura 10):

- Peroxinitrito 350 µM.
- Peroxinitrito 350 µM, más 10<sup>5</sup> CGPE.
- Peroxinitrito 350 µM, más 10<sup>5</sup> MSCMO.
- Control negativo, sin adición de células protectoras ni tóxico.

## Material y Métodos

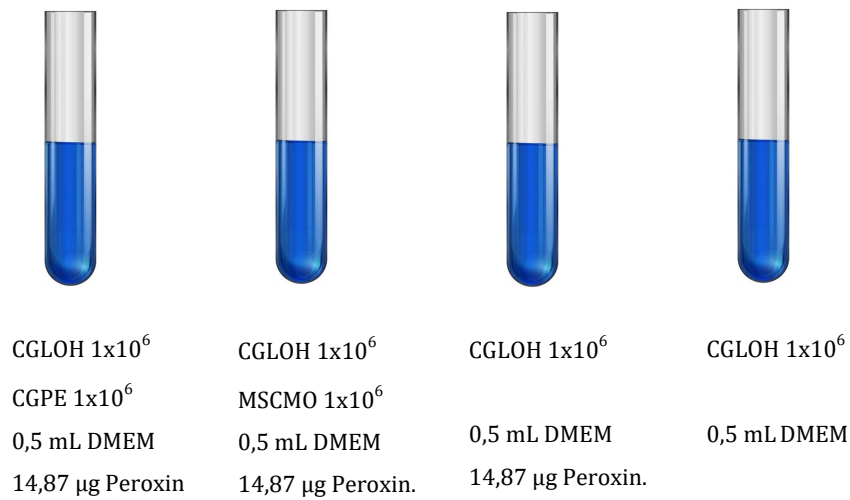


Figura 10: Experimento para la determinación del efecto tóxico del Peroxinitrito, a la dosis escogida (350  $\mu$ M). (Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH); Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE); Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO)).

Al igual que en los experimentos preliminares para la búsqueda de DL50, los tubos se incubaron en condiciones convencionales a lo largo de diferentes periodos de tiempo (0, 2, 8 y 24 horas), transcurridos los cuales se midió apoptosis cuantificando la expresión de Anexina V mediante citometría de flujo, y muerte celular mediante Ioduro de Propidio, por medio del software de análisis *MacQuantify* (Miltenyi Biotec). Los resultados se cuantificaron en términos relativos, considerando como referencia el porcentaje de apoptosis/muerte celular observada en el control negativo.

### 6.2.3.5.2 Toxicidad experimental mediada por Glioxal

La búsqueda del umbral de toxicidad mediada por Glioxal más adecuada para el diseño de los experimentos posteriores se abordó por medio de un método análogo. A partir de las células obtenidas tras

## Material y Métodos

levantamiento de los cultivos, se elaboraron diluciones para depositar 105 células por tubo de 6 mL, usando como diluyente 500  $\mu$ L de DMEM completo, que contenía Glioxal (*Sigma-Aldrich 128465*) en cuatro concentraciones diferentes (50, 100, 250 y 500  $\mu$ M). Como control negativo se utilizó un quinto tubo usando como diluyente DMEM completo sin Glioxal (Figura 11).

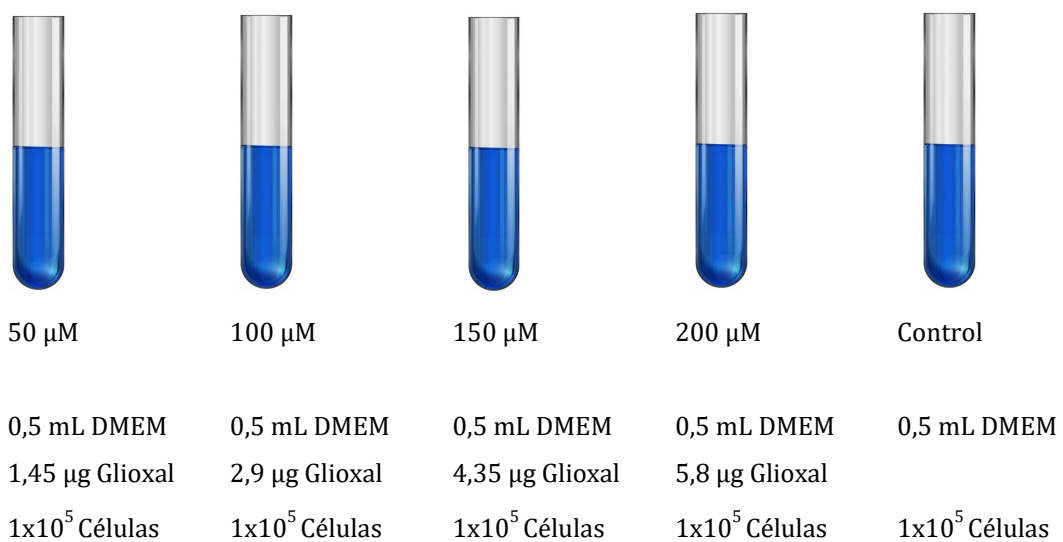


Figura 11: Experimento para el cálculo de la Dosis Letal 50 del Glioxal.

Las series de cultivo, reiteradas tres veces, se incubaron en convencionales (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad) a lo largo de diferentes periodos de tiempo (0, 2, 8 y 24 horas), transcurridos los cuales se midió apoptosis y muerte celular cuantificando la expresión de Anexina V y Ioduro de Propidio mediante citometría de flujo, como se describe más adelante.

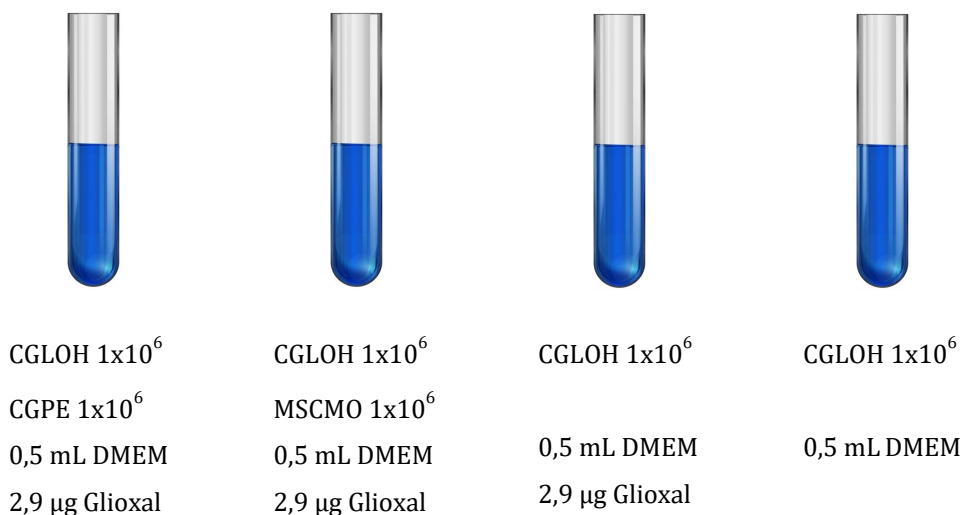
Posteriormente, y ya como experimento central, se elaboraron diluciones adecuadas para sembrar poblaciones de  $10^5$  células por tubo

## Material y Métodos

de 6 mL usando como diluyente 500  $\mu$ L de DMEM completo. Tras descongelación de CGLOH se elaboró una suspensión de estas células en medio de cultivo y a concentraciones similares. Como producto de glicosilación avanzada se empleó Glioxal (*Sigma-Aldrich 128465*), a una concentración de 100  $\mu$ M.

Para determinar el efecto tóxico del Glioxal a la dosis escogida, a las  $10^5$  CGLOH se añadieron en diferentes tubos:

- Glioxal 100  $\mu$ M.
- Glioxal 100  $\mu$ M, mas  $10^5$  CGPE.
- Glioxal 100  $\mu$ M, mas  $10^5$  MSCMO.
- Control negativo, sin adición de células protectoras ni tóxico.



*Figura 12: Experimento para la determinación del efecto tóxico del agente oxidante, Glioxal, a la dosis escogida (100  $\mu$ M). (Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH); Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE); Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO)).*

## Material y Métodos

Los tubos se incubaron en condiciones convencionales a lo largo de diferentes periodos de tiempo (0, 2, 8 y 24 horas), transcurridos los cuales se midió apoptosis cuantificando la expresión de Anexina V mediante citometría de flujo, y muerte celular mediante Ioduro de Propidio, por medio del software de análisis *MacQuantify* (*Miltenyi Biotec*). Los resultados se cuantificaron en términos relativos, considerando como referencia el porcentaje de apoptosis/muerte celular observada en el control negativo.

### 6.2.4 Métodos específicos de caracterización y cuantificación

#### 6.2.4.1 Citometría de flujo

Se determinó la expresión de los marcadores de membrana de las suspensiones celulares de las CGLOH y de las CGPE obtenidas tras el proceso de tripsinización, descrito con anterioridad.

La suspensión celular, tras agitación mecánica, se alicuotó en seis tubos, con un volumen máximo de 50  $\mu$ L por tubo. Los estudios se realizaron con un recuento mínimo de 50.000 células por tubo, aunque se consideraron muestras ideales las constituidas por 100.000 células por tubo. La distribución de anticuerpos específicos (*BD-Pharmigen*, *MiltenyiBiotec*, *Immunostep* y *R&D Systems*) y de los fluorocromos (FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina, PERCP: Proteína clorofila peridinina; APC: Aloficocianina) utilizados para cada uno de los tubos de suspensión celular fue la siguiente:

**Material y Métodos**

	Vioblue	FITC	PE	PERCP	APC
<b>Tubo 1</b>	Control				
<b>Tubo 2</b>	CD45	CD117	VEGF	CD14	CD133
<b>Tubo 3</b>	CD34	CD90	CD71	HLADR	CD106
<b>Tubo 4</b>	-	CD3	CD105	CD31	CD184
<b>Tubo 5</b>	-	-	CD271	CD19	CD73

*Tabla 14: Distribución de anticuerpos y de los fluorocromos utilizados para determinar la expresión de los marcadores de membrana de las CGLOH y de las CGPE.*

El volumen utilizado fue en todos los casos 7  $\mu\text{L}$ , salvo en el caso del anticuerpo antiCD90, de cuya solución se añadieron 2  $\mu\text{L}$ . Una vez añadidos los anticuerpos, los tubos permanecieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos para evitar la excitación de los fluorocromos.

Tras la incubación se realizó una lisis osmótica para la fijación de las células y la depuración de eventuales hematíes residuales, por medio del uso de 100-200  $\mu\text{L}$  de una solución hiposmótica comercial (*Quick Lisis*<sup>®</sup>, *Citognos*). Las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 10 minutos más.

La lectura de las muestras se realizó con el citómetro *MACSQuant*<sup>®</sup> *Analyzer 10* (*Miltenyi Biotec GmbH, Alemania*). El equipo permite lecturas a partir de muestras con volumen mínimo de 25  $\mu\text{L}$ , con un umbral de detección para el tamaño de las partículas de 1 $\mu\text{m}$ . La

## Material y Métodos

sensibilidad de la fluorescencia se caracterizó por índices MESF (*molecules of equivalent soluble fluorochrome*) menores de 200 para FITC, menores de 100 para PE, y menores de 150 para APC, con coeficientes de variación menores del 5% para todos los umbrales. Respecto al recuento absoluto, el sistema se caracteriza por una variabilidad del  $\pm 5\%$ , con un coeficiente de variación del 5%. El análisis de los resultados se llevó a cabo con el software *MACS Quantify*<sup>®</sup> (*Miltenyi Biotec GmbH*).

### 6.2.4.2 Depleción de células CD3+

Una vez cuantificada la celularidad de las muestras de las CGLOH descongeladas, se centrifugaron durante 10 minutos, a 290 g y a 22°C. El sedimento se resuspendió en 80  $\mu\text{L}$  de PBS a temperatura ambiente. Se retiró una alícuota de 10  $\mu\text{L}$ , a la que se añadió 190  $\mu\text{L}$  de PBS para realizar Citometría de Flujo (FACS) de la muestra no marcada.

Se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de solución comercial para depleción de células CD3 (*CD3 MicroBeads, human; Miltenyi Biotec 130-050-101*) a los 200  $\mu\text{L}$  obtenidos del paso anterior, y tras mezclar, se incubaron 15 minutos entre 4-8°C. Seguidamente, se añadieron 2 mL de PBS y se realizó un nuevo lavado durante 10 minutos, a 290 g y a 22°C. El pellet se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de PBS.

La separación de las fracciones CD3 positiva y CD3 negativa se realizó en un *autoMACS*<sup>®</sup> *Pro Separator* (*Miltenyi Biotec GmbH*), separador celular magnético con velocidad de procesamiento superior a  $10^6$ /segundo a partir de una muestra de más de  $4 \times 10^9$  células. El sistema realizó el auto etiquetado de las células, de forma que su

## Material y Métodos

elución aisló por separado las fracciones negativa y positiva para CD3. Del volumen total eluído, se obtuvieron sendas muestras de 200  $\mu$ L de las dos fracciones. Estas dos alícuotas, junto con la procedente de la muestra conservada antes de separación, se marcaron con 20  $\mu$ L de anticuerpo CD3-PE (*Miltenyi Biotec*) y se incubó durante 15 minutos en la oscuridad. Tras esto se procedió a realizar la citometría de flujo como control de calidad de la depleción.

### 6.2.4.3 Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

#### 6.2.4.3.1 Extracción del RNA

El RNA total de las CGLOH, de las CGPE y de las MSCMO se aisló a partir de cada una de las suspensiones por medio de tratamiento con reactivo *Trizol Reagent* (*Ambion®*, *Life Technologies*, *ThermoFischer Scientific*) según el protocolo descrito por el fabricante.

Con el fin de asegurar la obtención de suficiente cantidad de RNA, las células fuente de la extracción se dividieron en alícuotas de  $10^6$  células, que fueron depositadas en tubos Eppendorf de 2 mL junto con 700  $\mu$ L de *Trizol Reagent*. Para hacer más eficiente el proceso, las muestras se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta acumular un número adecuado, que se estimó en  $7 \times 10^6$  células para cada tipo celular.

Tras acumular el número mínimo de células establecido, se descongelaron a temperatura ambiente y se mantuvieron en hielo. En una campana de extracción de gases se añadieron 140  $\mu$ L de cloroformo al 99% a cada uno de los tubos, que fueron agitados vigorosamente

## Material y Métodos

durante 15 segundos. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g durante 15 minutos en una centrífuga previamente enfriada a 4°C; tras este proceso se recogió el sobrenadante con sumo cuidado, para evitar la contaminación con restos de la interfase. Una vez retirado el sobrenadante, se añadió el mismo volumen de isopropanol, tras lo cual, las muestras se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente para facilitar el precipitado del RNA. Trascurrido este tiempo, fueron nuevamente centrifugadas durante 15 minutos, a 12.000 g y a 4°C, con el fin de retirar el isopropanol. Eliminado éste, se añadieron 500 µL de etanol al 75% a -20°C, se mezcló con un vortex y se realizó una tercera centrifugación en condiciones similares. El sobrenadante fue retirado en su totalidad, y se dejó secar el sedimento en la campana de gases durante 5-10 minutos.

El sedimento seco de cada tubo fue mezclado con 12 µL de agua libre de actividad nucleasa (*Roche 231-791-2; Penzberg, Alemania*). La cuantificación del RNA se realizó mediante un espectrofotómetro (*NanoPhotometer® Pearl; Implen GmbH, Alemania*), con objeto de calcular la cantidad de RNA sobre el que realizar la síntesis de cDNA, la retrotranscripción (RT).

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA total usando la retrotranscriptasa *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem)* y oligonucleótidos aleatorios. Esta mezcla se sometió a 25°C durante 10 min, 37°C durante 120 min y 85°C durante 5 min. Una vez realizada la RT, y obtenido el cDNA problema para ambos tipos celulares se procedió a su congelación a -20°C.

## Material y Métodos

### 6.2.4.3.2 Evaluación de la eficiencia de los cebadores

Se efectuó una evaluación preliminar para determinar la concentración de cDNA a la que la amplificación de los cebadores empleados resultó más eficiente. Para ello, se descongeló a temperatura ambiente el cDNA, y se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución basal (1/5, 1/25, 1/125).

En placas para PCR de 96 pocillos, se destinaron 16 pocillos para cada dilución. En cada uno de ellos se cargaron 12  $\mu$ L de la siguiente mezcla de reacción:

- 2,5  $\mu$ L del cDNA
- 9,5  $\mu$ L de la muestra optimizada que contiene 6  $\mu$ L PowerUp® SYBR® Green Master Mix (SYBR® Chemistry; Thermo Fischer Cientific A25742)
- 0,5  $\mu$ L de la mezcla del *primer* (Forward + Reverse + H<sub>2</sub>O libre de actividad nucleasa)
- 3  $\mu$ L H<sub>2</sub>O libre de actividad nucleasa.

La evaluación de la eficiencia para cada gen se hizo por duplicado, de manera que por cada placa de 96 pocillos se ensayaron 8 genes. Los cálculos de eficiencia de los *primers* se realizaron sobre cDNA procedente de las CGLOH, de las CGPE y de las MSCMO. Las placas se trataron en el termociclador (CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories; Hercules, California, Estados Unidos), aplicando el programa de PCR constituido por la sucesión de las siguientes fases:

- Desnaturalización inicial de 10 min a 95°C.
- Desnaturalización intermedia con 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 60 segundos a 60 °C.

## Material y Métodos

- Desnaturalización final durante 15 segundos a 95 °C.
- Renaturalización durante 15 segundos a 60 °C.

Los resultados se analizaron con el software *CFX Manager*® Software (Bio Rad). Una vez analizados los datos, se determinó a que concentración de cDNA se debían realizar los experimentos de expresión génica para cada uno de los *primers* a testar. La concentración más adecuada se determinó considerando la pendiente de la curva estándar.

### 6.2.4.3 Amplificación de secuencias de cDNA

Se evaluó la expresión diferencial del panel de genes problema por medio de RT-qPCR, comparando las CGLOH con las CGPE y con MSCMO. Con este fin, se prepararon placas de 96 pocillos aptas para PCR, en las cuales cada gen se estudió respecto al cDNA procedente de los tres tipos celulares. Cada uno de los ensayos por cada gen problema y tipo celular se replicó en 3 pocillos, por lo que cada placa permitió el análisis de 8 genes. El contenido de los pocillos fue idéntico al descrito en para la fase de medición de la eficiencia de la reacción. Las placas fueron procesadas en el termociclador por medio del programa mencionado con anterioridad.

Las eficiencias de los *primers* estaban comprendidas entre el 85% y 100% y los tamaños de fragmentos amplificados entre 110 y 210 pb.

En la Tabla 15 se muestran todos los cebadores utilizados en las reacciones de PCR a tiempo real y el tamaño del producto que amplifican.

## Material y Métodos

	Denominación alternativa	HGNC	MIM	Oligonucleótidos		Tm°	% GC
FSHR	FSHRO, LGR1	3969	*136435	Directo	<i>GGTCCCCAAATCCTGAAAAT</i>	63,7	45
				Reverso	<i>CTTCTGACCTCCCAGGAAT</i>	64,4	55
LHCGR	LCGR, LGR2, LHR	6585	*152790	Directo	<i>TCCTTTCCAGGGAATCAATC</i>	62,7	45
				Reverso	<i>GGCCGGTCTCACTCGAC</i>	64,9	70,5
CYP19A1	Aromatase, P-450AROM	2594	*107910	Directo	<i>CAAGTGCTGAGGCAT</i>	58,3	56,2
				Reverso	<i>GAGAATAGTCGGTGAA</i>	47,6	43,7
CYP19A1	Aromatasa	2594	*107910	Directo	<i>GCCGAATCGAGAGCTGTAAT</i>	63,2	50
				Reverso	<i>GAGAATTCATGCGAGTCTGGA</i>	64,3	47,6
AMH	AMH	464	*600957	Directo	<i>ACAGTGACCTCAGGCCA</i>	64,7	61,1
				Reverso	<i>GCCTGGTGGTCTACACCT</i>	64,1	63,1
INHBB	INHBB	6067	*147390	Directo	<i>ACAAACAGGTTCTGGTTGCC</i>	63,9	50
				Reverso	<i>CGTTTCCGAAATCATCAGC</i>	63,2	47,3
HSD3B1	HSD3B-1	5217	*109715	Directo	<i>CCAGAAATGTCTCCTCCAGC</i>	63,8	55
				Reverso	<i>GGAGATCAGGGTCTTGACA</i>	64,2	55
HSD3B2	HSD3B-2	5218	*613890	Directo	<i>GGCTCATCCAGAATGTCTCC</i>	63,7	55
				Reverso	<i>CTTGGACAAGGCCCTCAGAC</i>	63,8	55
KIT	CD117; c-KIT	6342	*164920	Directo	<i>GTGCTGTCGAAAAATTCAT</i>	61,5	40
				Reverso	<i>CCTGTAGTTTAGTCTGACTGTT</i>	54,3	40,9
THY1	CD90	11801	*188230	Directo	<i>GAAGGATCCAGAACCA</i>	60,3	52,6
				Reverso	<i>TGTCTCAGGGTCAGG</i>	59,2	62,5
ENG	CD105	3349	*131195	Directo	<i>CAAGACCAGGAAGTCCATAG</i>	58,7	50
				Reverso	<i>GGCCTGGGGTACTCAC</i>	58,9	68,7
CD34	CD34	1662	*142230	Directo	<i>GTGACATCAAGGCAGAAATC</i>	59,7	45
				Reverso	<i>TCTCCCCTGTCTTCTTAAA</i>	60,2	45
CD44	--	1681	*107269	Directo	<i>AGCAACTGAGACAGCAACCA</i>	63,8	50
				Reverso	<i>AGACGTACCAGCCATTTGTGT</i>	63,3	47,6
PTPRC	CD45	9666	*151460	Directo	<i>AAGACAACAGTGGAGAAAGG</i>	58,4	45
				Reverso	<i>TTGCTGTAGTCAATCCAGTG</i>	58,9	45
ALCAM	CD166	400	601662	Directo	<i>TCCAGAACCGATGAGGCAGAC</i>	60	54,5
				Reverso	<i>GTAGACGACACCAGCAACAAGG</i>	60	54,5
NT5E	CD73	8021	*129190	Directo	<i>GATAATGTTTGCAGTTCTCA</i>	60,3	40
				Reverso	<i>TTCCATTCAAGTGGACTATC</i>	59,9	40
VCAM	CD106	12663	*192225	Directo	<i>CACACTGTCATTGCGAGC</i>	59,5	38
				Reverso	<i>GCAAGACGTAACCTCTCC</i>	59,0	45
LGR5	GPR49	4504	*606667	Directo	<i>CGCGCGAAAAGATGAAT</i>	61,8	55,5
				Reverso	<i>TCCACATGATTTGGCATTG</i>	57,3	55,5
ITGB1	CD29	6153	*135630	Directo	<i>CAGCTGTGTACTCAATGATAGATT</i>	66,1	50
				Reverso	<i>CAACTGGCCGAAAGATAGCAATGGTGT</i>	64,3	40
NANOG	FLJ12581	20857	*607937	Directo	<i>TCAACGTCTCGAGGAGATT</i>	63,2	37
				Reverso	<i>CAACCTACATCCCAGGGTCT</i>	73,4	48,1

**Material y Métodos**

DPPA3	Stella	19199	*608408	Directo	<i>GCAGCAGGGCACCCCTGGC</i>	63,8	50
				Reverso	<i>TGTGAGAGAGAGGCACTGTACC</i>	62,8	55
SOX2	SRY box 2	11195	*184429	Directo	<i>GGTTCTCGATACTGGTTCCG</i>	76,8	78,9
				Reverso	<i>GTGGAGGAAGCTGACAACAA</i>	63,5	54,5
POUF5F1	Oct4	9221	*164177	Directo	<i>CTTAGATCGTGTGCGGCTTCG</i>	63,5	55
				Reverso	<i>CTCGTAGTTCAGCACAGCAAAC</i>	62,9	50
TERT	TERT	11730	*187270	Directo	<i>GAGTTCAGCAGAGCCTCCAG</i>	68,9	57,1
				Reverso	<i>GCAAAGTGCCTGAGGAGTTT</i>	63,8	50
LMNA	Lamin A	6636	*150330	Directo	<i>GCTATGTTGTACCTCCGGCTT</i>	64,3	60
				Reverso	<i>GCCCCACTTCTTCTAAAGTGATG</i>	64,3	50
DAZL	DAZL	2685	*601486	Directo	<i>TTCTTGACAAAGAAAAGTTGCAATA</i>	64,1	52,3
				Reverso	<i>CGTTGAAATCTGCGAAACA</i>	64,9	47,8
DDX4	VASA	18700	*605281	Directo	<i>CCTCTCTCTTCTGCTTGAAGTTG</i>	62,6	28
				Reverso	<i>AGCGGCTGTACTGCAAAAAC</i>	63,7	40
FGF2	FGFB	3676	*134920	Directo	<i>TGGTTTTTATCTTCAGTCTGG</i>	63,4	47,8
				Reverso	<i>AGCATGTCTCTCTGCATCTC</i>	64,2	50
HGF	HGFB	4893	*142409	Directo	<i>TGGTTCCTTCTGTGCAATCC</i>	62,8	40,9
				Reverso	<i>GTACTCTCGCAGGAAATGGG</i>	64,5	55
EGF	β-urogastrona	3229	*131550	Directo	<i>GATTTTATTTGCGCGGCTC</i>	63,9	47,6
				Reverso	<i>TGATGTGAGTCTGGGCTGAG</i>	63,5	55
BCL2	Bcl-2	990	*151430	Directo	<i>ATCACCCAAACCAAGCATC</i>	63,3	47,3
				Reverso	<i>CCATGATCCTGCTCAATTCC</i>	64,3	55
ESR2	Erb	3648	*601663	Directo	<i>ACGGGGCCCTACTGTAATAA</i>	63,6	45
				Reverso	<i>AGATGCAGCACTGGAAGGAG</i>	64,4	50
CAT	CAT	1516	*115500	Directo	<i>TAATGCTTCCCACACCTTC</i>	62,0	50
				Reverso	<i>CTAGCGAGTTATGGCGACGA</i>	64,6	55
SOD-1	SOD-1	11179	*147450	Directo	<i>TGACCACCACCATGAACTT</i>	63,8	50
				Reverso	<i>CGTCACCGAGGAGAAGTACC</i>	65,2	55
SOD-2	SOD-2	11180	*147460	Directo	<i>GCGTCATAAACCAACAGAG</i>	62,9	45
				Reverso	<i>CTTATCTCGTCTGCCTCATC</i>	63,7	60
CD16	FCGR3A	3619	*146740	Directo	<i>TCACTCGTAGCATGGTCTGC</i>	59,8	45
				Reverso	<i>GGTCCCCTCGTCTGTGATAC</i>	59,0	50
GLO-1	GLO-1	4323	*138750	Directo	<i>ACTCATCCACGATGCCTGTC</i>	64,2	55
				Reverso	<i>GCTGGTGGATGCTCTTCAGT</i>	64,5	60
IGF-1	IGF-1	5464	*147440	Directo	<i>CAACGAGCCTGCGTCCCACC</i>	65,3	55
				Reverso	<i>ACGGAGCCCCCTTGCTGCT</i>	64,5	55
GUSB	Glucuronidase, beta	4696	*611499	Directo	<i>CTGTCACCAAGAGCCAGTTCCT</i>	60	54,5
				Reverso	<i>GGTTGAAGTCTTCACCAGCAG</i>	60	54,5

Tabla 15: Cebadores utilizados para la amplificación de los genes analizados.

**Material y Métodos****6.2.4.3.4 Cuantificación de la expresión génica**

Las cuantificaciones se llevaron a cabo respecto al valor del ciclo umbral registrado en el software *CFX Manager® Software (Bio Rad)*, en base a una cuantificación relativa normalizada según el modelo  $\Delta\Delta Ct$  desarrollado por *PE Applied Biosystems*, cuya cuantificación no depende de la eficiencia de la reacción. Se utilizaron dos modelos de cuantificación relativa de la expresión génica:

- a) Cuantificación relativa normalizada: Este método se basa en el modelo Delta-Delta Ct desarrollado por *PE Applied Biosystems* uno de los más utilizados para obtener cuantificaciones rápidas de muchos genes ya que no tiene en cuenta la eficiencia de la reacción. Los valores obtenidos para cada gen (gen diana) son normalizados con los niveles de Ct obtenidos para un gen calibrador, que en todos los casos consistió en el mismo gen diana. Para ello se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen diana}) - Ct (\text{Control endógeno})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct (\text{calibrador})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Incremento de expresión del gen diana sobre el calibrador}$$

- b) Cuantificación  $2^{-\Delta Ct}$ : Es una derivación del método anterior, mediante la cual se elimina de la ecuación la expresión de la muestra calibradora, usando el gen control endógeno para normalizar.

## Material y Métodos

### 6.2.4.4 Cuantificación de apoptosis mediante Anexina V

Las suspensiones celulares previamente incubadas se centrifugaron 300g, 22°C, 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado, tras lo cual se añadieron 500 µL de Buffer 1X, preparado a partir de la solución madre 20X y agua destilada, y se centrifugó nuevamente. Se retiró el sobrenadante y añadieron 5 µL de solución de Anexina V (*Annexin V-FITC*, Miltenyi Biotec 130-097-928) junto con 50 µL de Buffer 1X. Se incubó de nuevo durante 15 minutos, para añadir después 500 µL de Buffer 1X y centrifugar a continuación.

Tras quitar el sobrenadante, se añadieron 250 µL de Buffer 1X antes de introducir las células en el citómetro de flujo. Los tubos fueron colocados en el soporte del citómetro, previamente enfriado a 4°C, y se añadieron 2.5 µL de solución de Ioduro de Propidio (*Propidium Iodide Solution*; Miltenyi Biotec 130-093-233) al primer tubo. Trascorridos 3 minutos, se añadió ioduro de Propidio al segundo tubo y se inició la lectura. En el momento que el contenido del primer tubo fue aspirado, se añadió Ioduro de Propidio al tercer tubo, y se procedió de forma análoga y sucesiva hasta el final del procedimiento.

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el *Software de análisis MacsQuantify* (Miltenyi Biotec).

## Material y Métodos

### 6.2.5 Definición de términos y variables

#### 6.2.5.1 Términos

Las definiciones adoptadas a los efectos del presente estudio son:

- *Infertilidad*: Ausencia de gestación clínica constatada tras 12 meses de relaciones sexuales con finalidad conceptiva.
- *Donantes de ovocitos*: Pacientes que, de forma altruista, donan óvulos sometiéndose a estimulación ovárica y a punción-aspiración folicular.
- *Endometriosis*: Diagnóstico histopatológico o ecográfico de presencia de endometrio fuera de la cavidad endometrial.
- *Reserva folicular ovárica*: Conjunto de folículos primordiales remanentes en ambos ovarios.
- *Baja reserva folicular ovárica*: Disminución de la reserva folicular ovárica cuya magnitud compromete la fertilidad.
- *Pérdida precoz de reserva funcional ovárica*: Disminución crítica de la reserva funcional ovárica superior a la imputable al envejecimiento ovárico fisiológico.
- *Fallo ovárico oculto*: Disminución crítica de la reserva funcional sin expresión clínica, y constatada por medio de estimadores bioquímicos o biofísicos.
- *Fallo ovárico clínico*: fallo ovárico manifestado por ciclos irregulares, oligomenorrea o amenorrea secundaria, en presencia de un cuadro analítico de hipogonadismo hipergonadotropo.
- *Serología negativa para VHB, VHC, VIH, sífilis*: negatividad de marcadores serológicos de infección (ausencia de AgHBs, AcVHC con RIBA positivos, ausencia de Ac anti VIH con Western Blot confirmatorio positivo, negatividad de RPR/VDRL).

## Material y Métodos

- *Hiperestimulación ovárica controlada*: tratamiento con gonadotropinas para conseguir un desarrollo folicular múltiple que permita la obtención de un número adecuado de ovocitos destinados a tratamiento con fecundación *in vitro*.
- *Punción-aspiración folicular*: Punción folicular transvaginal ecoguiada seguida de aspiración del líquido folicular ovárico.
- *Baja Respuesta Ovárica*: obtención de  $\leq 5$  ovocitos tras hiperestimulación ovárica controlada para FIV-TE.
- *Complejo cúmulo-ovocito*: conjunto constituido por las células de granulosa del cúmulo ooforo, la zona pelúcida y el ovocito.
- *CGLOH*: Células obtenidas mediante aspiración folicular tras hiperestimulación ovárica controlada lavadas y administración de HCG, y posteriormente cultivadas en presencia de LIF.
- *MSCMO*: Células con capacidad de autorregeneración y diferenciación a estirpes celulares de origen mesodérmico. Presentan capacidad de adhesión a superficies de cultivo, morfología fibroblastoide, expresión positiva (>95% de las células) de CD105, CD73, CD90, expresión negativa (< 2% de las células) de CD45, CD34, CD14, CD79, CD19, y HLA-DR, así como capacidad de diferenciación inducida a estirpes celulares mesodérmicas.
- *CGPE*: Células granulosas expandidas que presentan características propias de célula progenitora adulta mesenquimal.
- *Toxicidad experimental inducida*: Exposición controlada a determinados tóxicos endógenos o exógenos.
- *Diferenciación osteogénica*: Adquisición de características funcionales propias de la osteogénesis, manifestadas por presencia de acúmulos intracitoplasmáticos de calcio, en el seno de agregados celulares con morfología característica constituida por la aparición de espacios intercelulares.

## Material y Métodos

- *Diferenciación condrogénica*: Adquisición de características funcionales propias de la condrogénesis, manifestadas por presencia de presencia acúmulos intracitoplasmáticos de proteoglicanos, propios de la actividad de síntesis de los condrocitos.
- *Diferenciación adipogénica*: Adquisición de características funcionales propias de adipogénesis, manifestadas por presencia de presencia de vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas.
- *Adhesión celular*: aposición de las células a un sustrato inerte o a una matriz extracelular sintética.
- *Confluencia celular*: proliferación de células cultivadas *in vitro* hasta ocupar más del 80% de la superficie de los soportes de cultivo.
- *Estrés Oxidativo*: efecto de los radicales libre de oxígeno sobre el metabolismo celular, inducido experimentalmente con tratamiento de las suspensiones celulares con solución de Peroxinitrito.
- *Estrés Carbonílico*: efecto de los productos de glicosilación avanzada de compuestos de carbono sobre el metabolismo celular, inducido experimentalmente con tratamiento de las suspensiones celulares con una solución de Glioxal.
- *Viabilidad celular*: Ausencia de signos de apoptosis y de muerte celular no programada.
- *Apoptosis celular*: Manifestación del conjunto de mecanismos moleculares implicados en la muerte celular programada o fenotipo apoptótico, que incluye el incremento de fosfatidilserina en la lámina externa de la membrana citoplasmática, estimada por medio de la detección de Anexina V.
- *Muerte celular*: Manifestación del conjunto de cambios morfofuncionales asociados a la pérdida de las funciones vitales de la célula, que incluye la disrupción grave de la membrana

## Material y Métodos

citoplasmática y de los sistemas de endomembranas, estimada por medio de la detección de Ioduro de Propidio en la superficie celular.

### 6.2.5.2 Variables

#### ***A) Relativas a las características basales de las donantes de granulosa:***

- *Tipo de donante:* paciente estéril o donante de ovocitos.
- *Edad:* Tiempo transcurrido desde el nacimiento, medido en años completos.
- *Duración de la esterilidad:* medida en años completos.
- *Nivel sérico basal de FSH:* concentración sérica de FSH en día 2<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> de un ciclo espontáneo (UI/L).
- *Infertilidad por factor masculino:* existencia de patología seminal diagnosticada con arreglo a los criterios enunciados en el Manual de Estudio del Semen Humano de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010).
- *Infertilidad por factor tubárico:* antecedentes clínicos concluyentes o resultados de pruebas de imagen compatibles con la existencia de factor tubárico determinante.
- *Duración de la estimulación ovárica:* días de tratamiento con gonadotropinas.
- *Consumo de gonadotropinas:* unidades de actividad FSH administradas a lo largo el tratamiento.
- *Nivel de estradiol sérico en día de administración de HCGr:* concentración sérica de estradiol en el día de la HCGr (pg/mL).
- *Número de folículos mayores de 15 y 17 mm:* recuento de imágenes sonolucetas intraováricas con características morfológicas compatibles con folículos en desarrollo bajo estimulación

## **Material y Métodos**

gonadotrópica y diámetro folicular medio superior a 15 y 17 mm respectivamente.

- *Número de ovocitos obtenidos*: recuento del total de ovocitos obtenidos, con independencia de su calidad, grado de madurez e integridad.
- *Celularidad basal de muestras en origen*: concentración de células de la granulosa por mililitro de suspensión.

### ***B) Relativas a la caracterización morfológica***

- *Adhesión a superficie de cultivo*: capacidad de establecer unión estable a la superficie del soporte de cultivo.
- *Adquisición de morfología fibroblastoide*: modificación de la morfología celular inicial propia de células epiteliales esferoideas, por la aparición progresiva e irreversible de ahusamiento del contorno celular.

### ***C) Relativas a la diferenciación in vitro inducida***

- *Diferenciación osteogénica*: presencia de células que expresan características morfológicas propias de diferenciación osteogénica.
- *Diferenciación condrogénica*: presencia de células que expresan características morfológicas propias de diferenciación condrogénica.
- *Diferenciación adipogénica*: presencia de células que expresan características morfológicas propias de diferenciación adipogénica.

### ***D) Relativas a eficiencia de la expansión de las CGPE***

- *Recuento celular basal*: número absoluto de células granulosa luteinizadas.

## Material y Métodos

- *Recuento celular en primer pase*: número absoluto de células granulosas en expansión determinado en el momento del primer pase del cultivo.
- *Recuento celular en segundo pase*: número absoluto de células granulosas en expansión determinado en el momento de los segundos pases del cultivo.
- *Ratio de expansión en primer pase*: Relación entre el recuento celular en primer pase y el recuento celular basal.
- *Ratio de expansión en segundo pase*: Relación entre el recuento celular en segundo pase y el recuento celular basal.

### **E) Relativas a caracterización inmunofenotípica:**

- *Expresión individual de marcadores*: porcentaje de células positivas en citometría de flujo para cada uno de los marcadores (CD105, CD73, CD90, CD45, CD34, CD14, CD79, CD19, HLA-DR, CD106, VEGF, CD184, CD117, CD31, CD271, CD133, CD3, CD71).
- *Expresión de perfil de célula mesenquimal pluripotente*: porcentaje de células que expresan el inmunofenotipo de célula mesenquimal pluripotente, caracterizado por:
  - Expresión en más del 95% de las células de CD105, CD73, CD90.
  - Expresión en menos del 2% de las células de CD45, CD34, CD14, CD79, CD19, y HLA-DR.
  - Expresión de marcadores adicionales: CD71, CD106, CD184, CD309 como marcadores positivos y CD117, CD31, CD271, CD133, CD3 como marcadores negativos.

## Material y Métodos

### ***F) Relativas a la actividad funcional:***

- Expresión génica estandarizada: nivel de expresión de cada uno de los genes diana analizados en relación con el gen calibrador.

### ***G) Relativas a protección frente a citotoxicidad experimental:***

- *Viabilidad celular*: porcentaje de células sin marcadores de apoptosis ni muerte.
- *Apoptosis celular*: porcentaje de células con detección positiva de anexina V y negativa de Ioduro de Propidio.
- *Muerte celular*: porcentaje de células con detección positiva de Ioduro de Propidio.

## **6.2.6 Métodos estadísticos**

### **6.2.6.1 Estadística descriptiva**

Las variables cuantitativas se han descrito mediante estadísticos de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación típica, e intervalo intercuartil) y las cualitativas por medio de su distribución de frecuencias. La precisión de las estimaciones se informa por medio de los intervalos de confianza al 95% o del error estándar de los estadísticos centrales.

### **6.2.6.2 Estadística inferencial**

Los contrastes de diferencias de medias se han efectuado por medio de la prueba t de Student o mediante ANOVA (con contrastes *post hoc* en caso necesario), en caso de variables en las que se pudo asumir la distribución normal. Para el contraste de la diferencia de distribuciones de variables no normales se han aplicado pruebas no paramétricas

## **Material y Métodos**

como la U de Mann-Whitney, la prueba de la mediana o la de Kruskal-Wallis.

Las diferencias de proporciones se han analizado por medio de la prueba Chi<sup>2</sup>, aplicando la corrección de Yates o el test exacto de Fischer en caso necesario. Si no podía asumirse la normalidad de las variables, se han aplicado pruebas de comparación de proporciones bajo supuestos no paramétricos.

Para los análisis de correlación se han estimado los coeficientes de correlación de Pearson en caso de variables normales, y de Spearman para no normales.

### **6.3 Aspectos éticos y legales**

A lo largo de la realización del estudio, los investigadores se han sometido enteramente a lo establecido por las regulaciones nacionales e internacionales en materia de experimentación con células humanas, y en concreto a las recomendaciones y disposiciones de la revisión vigente de la Declaración de Helsinki-Edimburgo, y del Convenio de Oviedo sobre Derechos Humanos y Biomedicina (Buhring, Tremel et al. 2009).

#### **6.3.1 Aprobación institucional**

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. La autorización para la incorporación al estudio de Instituto Europeo de Fertilidad se obtuvo del CEIC del Hospital Clínico San Carlos mediante el correspondiente procedimiento de ampliación de centros,

## **Material y Métodos**

en el que el CEIC de Hospital General Universitario Gregorio Marañón actuó como órgano de referencia.

### **6.3.2 Evaluación riesgo-beneficio**

Este estudio no ha representado riesgo adicional para las pacientes participantes, que solo estuvieron expuestas a los riesgos generales propios de la Fecundación *In Vitro*, y a los particularmente dependientes de la condición de cada paciente. Dichos riesgos se hicieron constar en el consentimiento específico para el tratamiento.

### **6.3.3 Garantías de confidencialidad y ejercicio de derechos ARCO**

Se han mantenido los máximos niveles de confidencialidad y de rigor en el secreto médico, en estricto cumplimiento de la normativa legal en materia de protección de datos de carácter personal y clínico.

Todo el contenido de las bases de datos del estudio se consideró confidencial, y fue tratada como información sujeta a garantías de reserva. La identidad de los pacientes figura sólo de forma codificada en los documentos del estudio, y sólo los investigadores que han desempeñado labores directamente relacionadas con el proceso asistencial tuvieron acceso a los datos personales completos de los pacientes.

Los investigadores responsables del reclutamiento de las participantes les proporcionaron información expresa, precisa e inequívoca sobre:

## **Material y Métodos**

- La necesidad de incorporar los datos de interés para el estudio a una base informática, cuyo único destino fue su utilización con fines de investigación clínica.
- La ausencia en dicha base de datos acerca de su identidad.
- La posibilidad de ejercitar en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación, y el procedimiento previsto para dicho ejercicio.



# RESULTADOS

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Estudios preliminares de factibilidad**

Las CGLOH empleadas se obtuvieron como producto residual de los líquidos foliculares procedentes de la recuperación ovocitaria de 122 mujeres sometidas a protocolos de estimulación ovárica controlada para FIV y a punción folicular transvaginal ecoguiada, procedentes de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Gregorio Marañón y del Instituto Europeo de Fertilidad. La edad media de las pacientes fue de 34 años, con un rango comprendido entre 18 y 40 años.

Para la puesta a punto de los protocolos, las condiciones de cultivo inicialmente empleadas fueron las descritas por Kossowska-Tomaszczuk (General Assembly of the World Medical 2014) cultivando en DMEM completo + LIF +  $\beta$ -Mercaptoetanol las células procedentes de 2 pacientes. No se observó morfología mesenquimal en ninguno de los 2 cultivos, y trascurridos 7 días hubo una pérdida de la adherencia al sustrato y de la viabilidad celular.

Tras comprobar que el  $\beta$ -Mercaptoetanol tiene la habilidad de desnaturalizar algunas proteínas por su capacidad para separar puentes disulfuro, se eliminó del medio, tras lo cual se cultivaron células de 15 pacientes con DMEM completo + LIF, obteniéndose morfología mesenquimal en día 1 de cultivo en 13 de las 15 pacientes. La confluencia de la superficie del Flask ocurrió a los 13,4 días de cultivo como promedio (DS: 3,8).

Durante el cultivo prolongado, las CGLOH en presencia de LIF pasan a CGPE. De este modo las CGLOH tienden a perder sus características de

## Resultados

CG y adquieren otras similares a las presentes en MSC. Tras la primera confluencia completa, se realizó citometría de flujo, observándose una gran heterogeneidad celular al comparar la muestra por tamaño (SSC) y complejidad (FSC). También se observó que estas células expresan marcadores propios de MSC no tan definidos como cuando disponemos de células con más días de cultivo; por esta razón, se evaluó la expresión de marcadores cuando las células alcanzaron la segunda confluencia completa (37 días de cultivo de media). En esta fase de la expansión, se observó la aparición de marcadores similares característicos de MSC de médula ósea y de grasa establecidos por la ISCT (*Internacional Society Cellular Therapy*), lo que sugiere la conveniencia de caracterizar estas células en pases más tardíos.

Tras tener estandarizadas las condiciones de cultivo, se consideró conveniente acumular material celular mediante criopreservación a -80 °C, usando como crioprotector DMSO, para su posterior almacenamiento en N<sub>2</sub> líquido a -196°C.

## Resultados

### 7.2 Descripción de variables basales

#### 7.2.1 Muestras celulares iniciales

##### 7.2.1.1 Células de la granulosa ovárica

La Tabla 16 resume la distribución de recuentos de CGLOH procedentes de pacientes de FIV y de donantes. Los recuentos celulares medios fueron de  $6,87 \times 10^3$  (DE:  $5,4 \times 10^3$ ) y de  $7,0 \times 10^3$  (DE:  $7,8 \times 10^3$ ) respectivamente.

	Pacientes de FIV (n=97)	Donantes de ovocitos (n=25)
Media	687.541,60	709.727,03
Desviación estándar	544.754,27	785.086,64
Mínimo	160.000	200.000
Máximo	2.800.000	2.920.000
Percentil 25	400.000	320.000
Percentil 50	720.000	720.000
Percentil 75	1.160.000	1.490.000

Tabla 16: Distribución del recuento basal de las muestras de células de la granulosa según su procedencia.

## Resultados

Las características cuantitativas de las muestras de células multipotentes de médula ósea (MSCMO) cedidas por la Unidad de Producción del Laboratorio de Órganos Bioartificiales se resumen en la Tabla 17.

	N.º células
Media	1.356.904,06
Desviación estándar	2.344.029.65
Mínimo	325.000
Máximo	5.580.000
Percentil 25	835.000
Percentil 50	1.432.500
Percentil 75	2.790.000

Tabla 17: Distribución del recuento basal de las muestras de células de médula ósea según su procedencia.

## 7.2.2 Evaluación de la eficiencia de la expansión de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas

### 7.2.2.1 Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano frescas

Los recuentos basales y en primer y segundo pase de 5 muestras individuales de CGLOH seleccionadas al azar se muestran en la Figura 13. La evolución de la celularidad mostró una marcada heterogeneidad, ya que se observaron distintas dinámicas de evolución:

- Reducción del recuento celular desde la fase basal al primer pase, con incremento posterior hasta recuentos inferiores al basal (muestra A) o superiores al mismo (muestras C y E).

## Resultados

- Incremento sucesivo de celularidad basal en segundo y tercer pases, con tendencia a la progresión lineal del recuento (muestra D) o no lineal (muestra B).

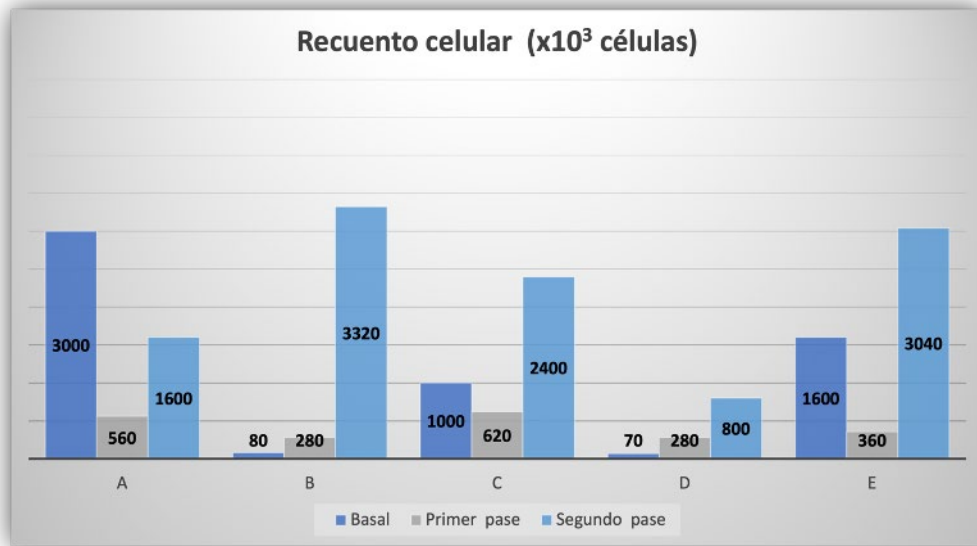


Figura 13: Recuento celular en función del número de pase en 5 muestras distintas de CGLOH frescas.

La Figura 14 muestra los recuentos celulares basales, y en primer y segundo pase, expresados como media y error estándar. El recuento basal promedio observado fue de  $1.150 \times 10^3$  (DE:  $122.5 \times 10^3$ ), y los correspondientes al primer y segundo pases de  $420 \times 10^3$  (DE:  $160 \times 10^3$ ) y  $2.232 \times 10^3$  (DE:  $1038 \times 10^3$ ). El contraste de la diferencia de medias entre recuento basal y al primer pase no resultó significativo, mientras que sí alcanzó significación la comparación entre los recuentos promedio en el primer y segundo pase.

## Resultados

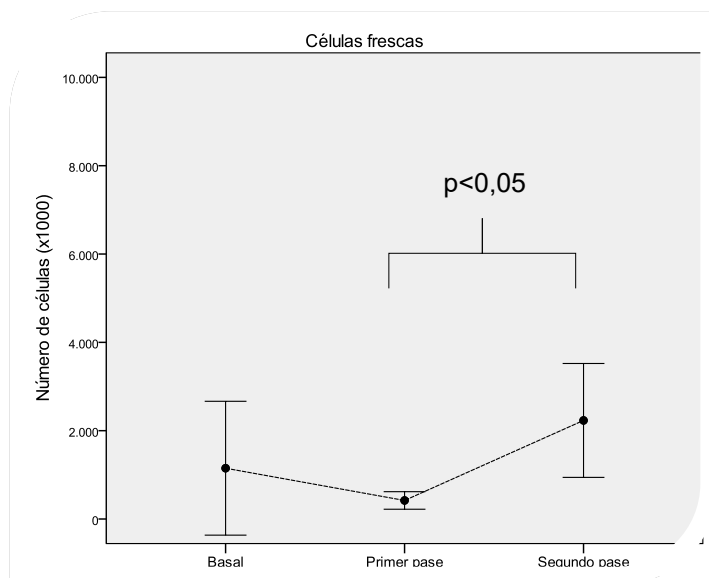


Figura 14: Evolución de la celularidad en función del número de pase de cultivo en CGLOH frescas.

La evolución de celularidad inicial de los cultivos de CGLOH frescas se describe también en términos de ratio de expansión de las muestras ilustradas en la Figura 15. La mayor parte de las muestras presentaron ratios de expansión superiores a 1, con una variabilidad comprendida entre  $< 0,5x$  y  $> 40x$

## Resultados

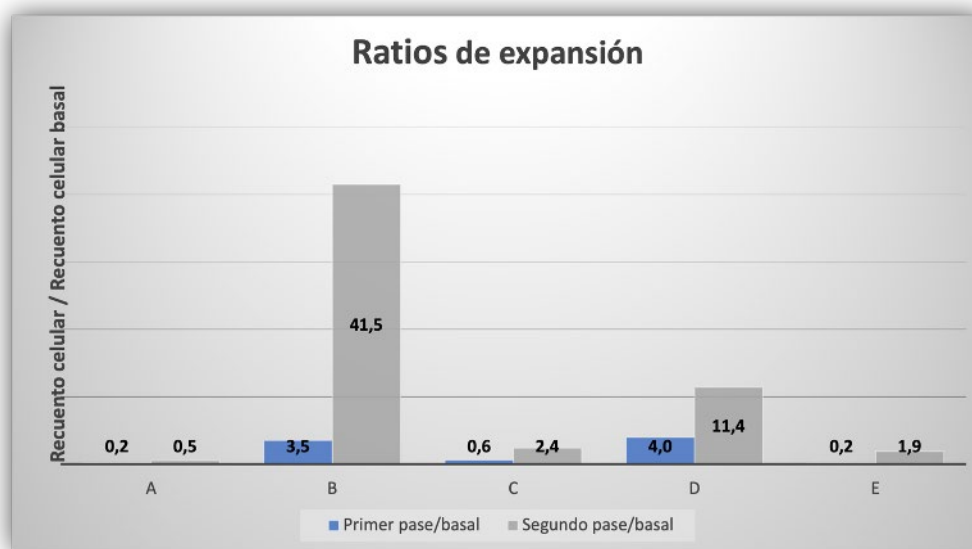


Figura 15: Ratios de expansión en 5 muestras de Células de la Granulosa frescas.

### 7.2.2.2 Células de la Granulosa criopreservadas

Las células CGLOH criogenizadas presentaron supervivencias tras descongelación comprendidas entre el 52,9% y el 32,4%, con una media del 42,8% (desviación estándar: 23,1%).

Se describe seguidamente la evolución del recuento celular de las CGLOH criopreservadas a lo largo del cultivo en las seis muestras sobre las que se realizó esta estimación tras su descongelación. Cuatro de las seis muestras presentaron recuentos celulares superiores al basal en el primer y el segundo pase, mientras que en las dos restantes se observó descenso de la celularidad en el día del primer pase (muestra A), e incluso en ambos pases (muestra B).

## Resultados

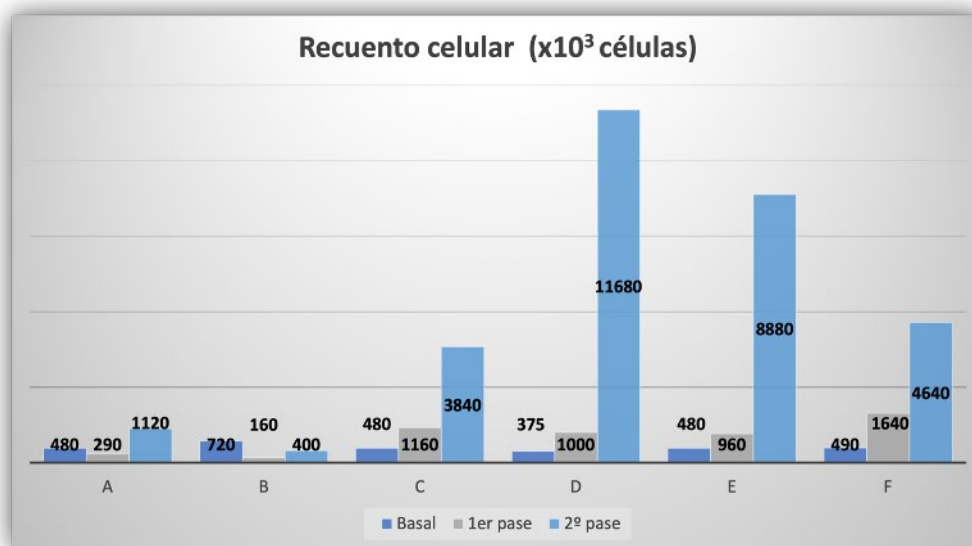


Figura 16: Evolución del recuento celular a lo largo del cultivo para expansión selectiva en seis muestras de Células de la Granulosa descongeladas (A-F).

No se halló correlación significativa entre el recuento celular inicial y el realizado en el primer pase del cultivo (Rho de Spearman: -5,5;  $p=0,25$ ) ni tampoco entre el recuento basal y el correspondiente al segundo pase celular (Rho de Spearman: -0,7;  $p=0,12$ ).

El día del cultivo en el que se efectuó el primer pase varió entre el 20<sup>º</sup> y el 27<sup>º</sup> (mediana: 24 días; IIC: 20-27 días)). El periodo de tiempo comprendido entre primer y segundo pase tuvo una mediana de 11 días de duración (IIC: 9-14 días). La comparación de las distribuciones de muestras apareadas reveló una diferencia significativa en la duración de ambos periodos ( $p<0,02$ ) (Figura 17).

## Resultados

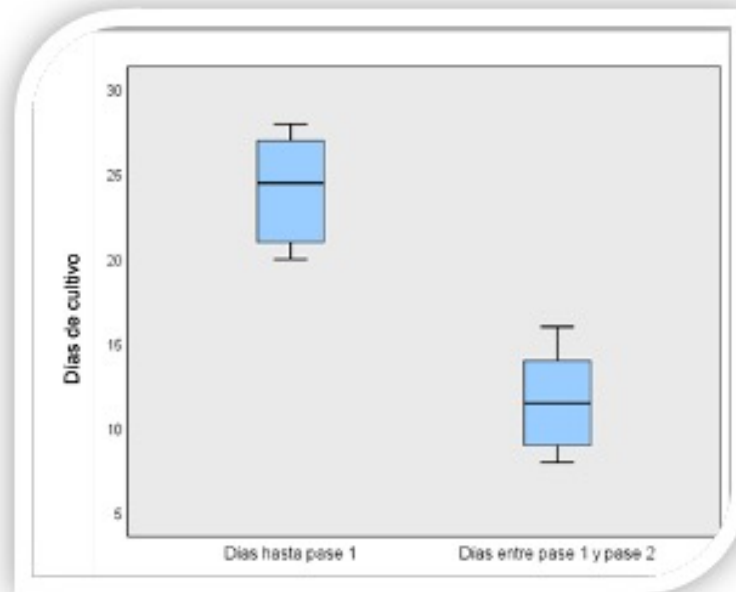


Figura 17: Distribución de la duración de los periodos inicio de cultivo-primer pase y primer pase-segundo pase de cultivo de expansión de Células de la Granulosa descongeladas. Los diagramas de cajas representan mediana, intervalo intercuartil y valores extremos.

La evolución del recuento celular absoluto de los cultivos de CGLOH descongeladas se muestra en la Figura 18. Puede observarse una clara al incremento de la celularidad a medida que se prolonga el cultivo, a pesar de que las medidas del recuento celular no difieren significativamente al comparar el recuento basal con el del día de primer pase ( $p=0.37$ ) ni con el del segundo pase ( $p=0,43$ ).

## Resultados

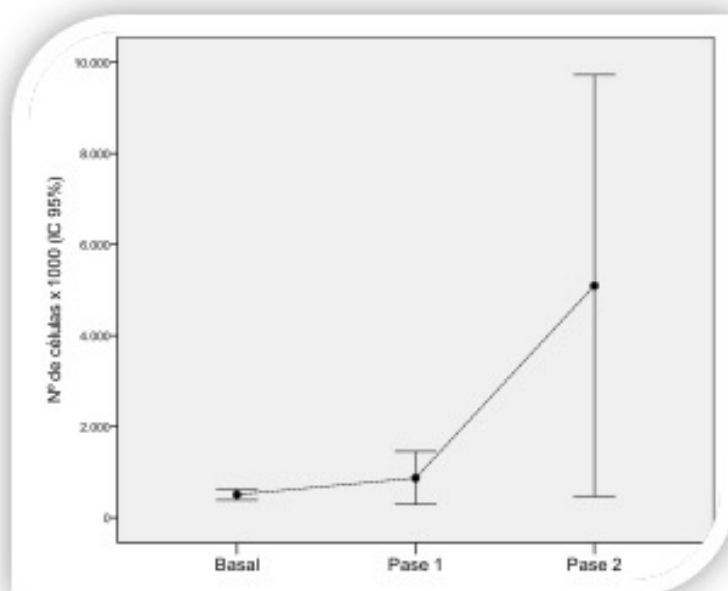


Figura 18: Evolución de la celularidad en función de pase de cultivo de Células de la Granulosa descongeladas.

En el momento del primer pase, que se realizó entre los días 21<sup>º</sup> y 28<sup>º</sup> de cultivo, todas las muestras presentaron incrementos de la celularidad superiores a 2x, y en el segundo pase, efectuado entre el 34<sup>º</sup> y el 41<sup>º</sup>, la celularidad se había incrementado entre 9,5x y 31,1x (Figura 19).

## Resultados

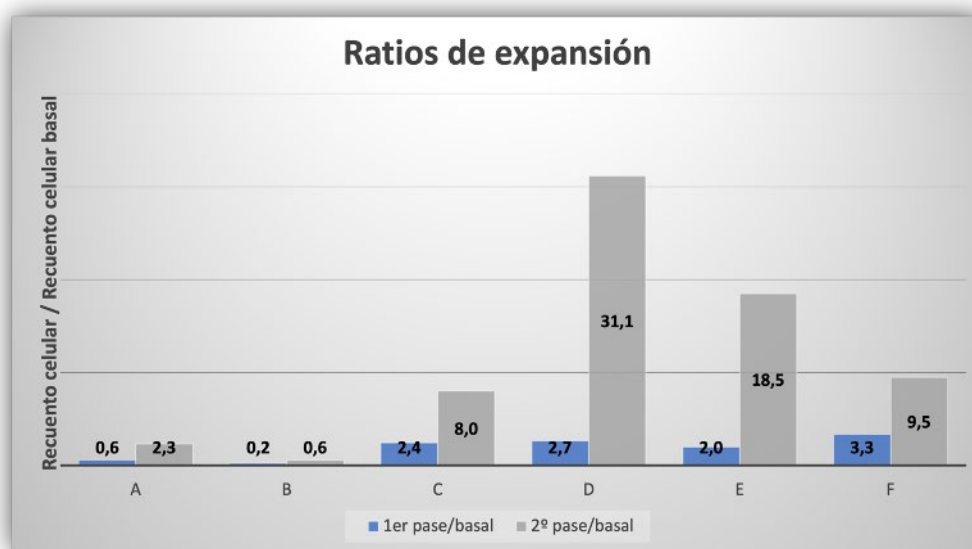


Figura 19: Ratios de expansión en 6 muestras de Células de la Granulosa descongeladas (A-F).

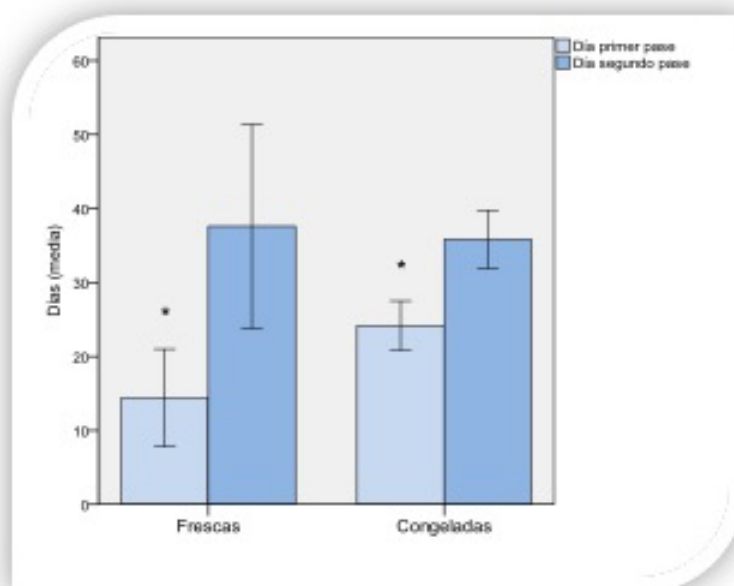
### 7.2.2.3 Comparación de la eficiencia de los cultivos de CGLOH frescas y criopreservadas

La dinámica de la expansión celular de las CGLOH frescas y descongeladas se compara en la Figuras 20 y 21.

La media de días hasta el primer pase fue de 14,4 en frescas frente a 24,1 en congeladas (Diferencia de medias: -9,7 días; IC 95%: -15,6; -3,9; p de la comparación mediante la prueba t de Student: 0,004; comparación no paramétrica de distribuciones: valor p de la prueba de Mann-Whitney: 0,017) (Figura 20). La media de días hasta el segundo pase fue de 37,6 en frescas frente a 35,8 en congeladas (Diferencia de medias: 1,7 días; IC 95%: -9,0; 12,6; p de la comparación mediante la prueba t de Student: 0,72; comparación no paramétrica de distribuciones: valor p de la prueba de Mann-Whitney: 0,79) (Figura 20).

## Resultados

Figura 20: Expansión de Células de la Granulosa frescas vs Células de la Granulosa descongeladas. Las barras representan el error estándar.



Las ratios de expansión en primer y segundo pase de cultivo correspondientes a las CGLOH frescas y criopreservadas se resumen en la Figura 21. No se observaron diferencias significativas en las ratios medias de expansión en primer y segundo pase al comparar los cultivos de CGLOH frescas y CGLOH criopreservadas.

## Resultados

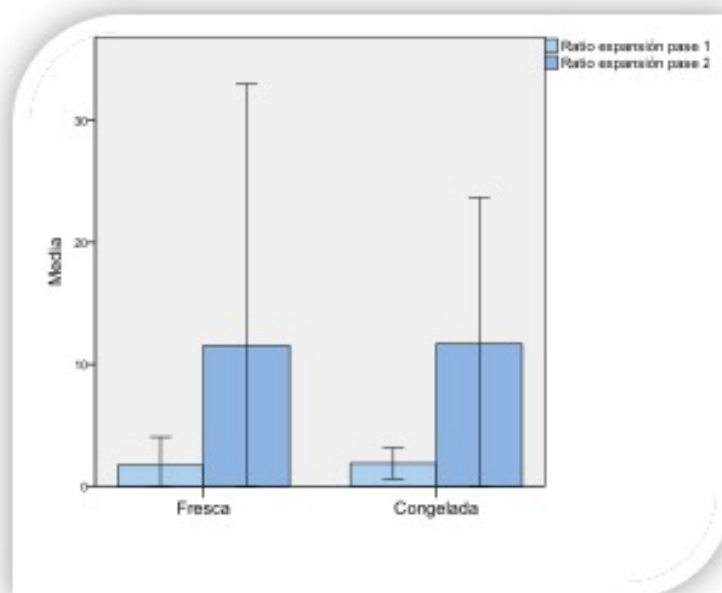


Figura 21: Ratios de expansión en primer y segundo pase en cultivos de CGLOH frescas y criopreservadas. Las barras representan el error estándar.

### 7.3 Caracterización de las CGPE

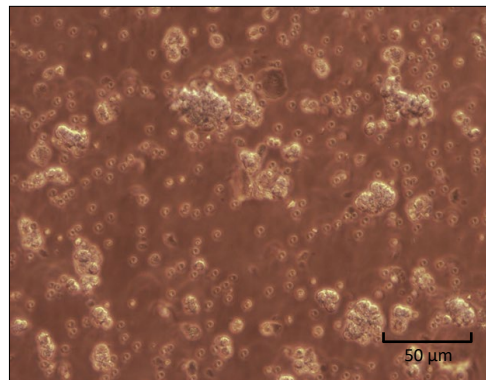
El cultivo prolongado de CGLOH en presencia de LIF permitió la expansión de la población inicial de CGP basalmente existentes, y la reducción progresiva por apoptosis de la población de CGLOH, como se describirá posteriormente. Las CGPE mostraron características propias de MSC, es decir, adherencia al plástico, presencia de marcadores de confirmación, ausencia de marcadores de exclusión y diferenciación selectiva a líneas mesenquimales específicas, adipogénica, condrogénica y osteogénica, por medio de promotores adecuados.

#### 7.3.1 Adhesión a superficie de cultivo

Las Figuras 22 a 26 ilustran la secuencia de cambios morfológicos detectados en los cultivos celulares de CGLOH.

## Resultados

La Figura 22 muestra la fase inicial del cultivo (día 0), constituida por una suspensión de agregados celulares y células aisladas, resultantes de la disgregación de las placas de células granulosas previamente descrita. La morfología de las células es marcadamente homogénea, y se caracteriza por su forma redondeada o levemente elipsoide, su baja relación núcleo/citoplasma y su baja anisocitosis. No se aprecian fenómenos de adhesión celular al sustrato.



*Figura 22: Población de Células de la Granulosa en día 0 de cultivo. Se observan las células en suspensión (Microscopía de contraste de fases, 100x).*

La Figura 23 corresponde a un cultivo en tercer día, en el que se aprecia la persistencia de elementos celulares en suspensión y la aparición de agregados celulares con clara adherencia al sustrato, que resulta aún incipiente.

## Resultados

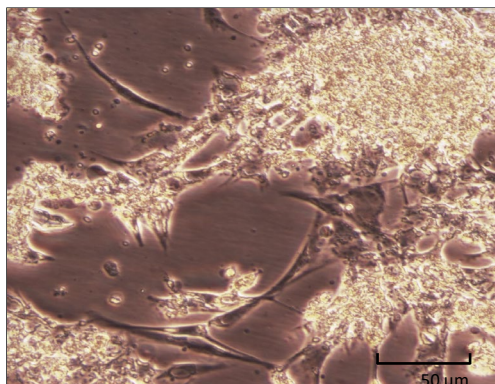


Figura 23: Población de Células de la Granulosa en día 3 en cultivo. Se observan las células adheridas al sustrato junto con células en suspensión (Microscopía de contraste de fases, 100x).

En el 6<sup>o</sup> día de cultivo, las células adheridas al sustrato comienzan a mostrar prolongaciones fusiformes, que generan un incipiente ahusamiento (Figura 24).

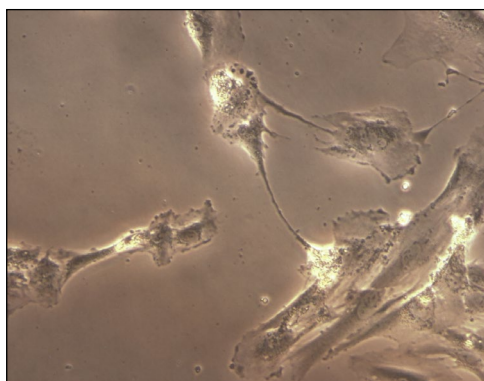


Figura 24: Población de Células de la Granulosa en día 6 de cultivo. Se observa aproximadamente un 40% de adhesión celular (Microscopía de contraste de fases, 200x).

## Resultados

Tras 9 días de cultivo, la adhesión celular alcanza en 70% de la superficie, y la morfología fusiforme se hace más evidente, así como la reducción de la relación núcleo/citoplasma (Figura 25).

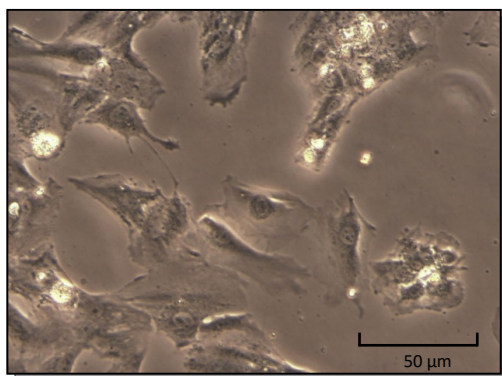


Figura 25: Población de CGLOH en día 9 de cultivo. Se observa aproximadamente un 70% de adhesión celular (Microscopía de contraste de fases, 200x).

La Figura 26 muestra un cultivo en día 15º, en el que se aprecia confluencia celular prácticamente completa y predominio de la morfología fusiforme de los contornos celulares.

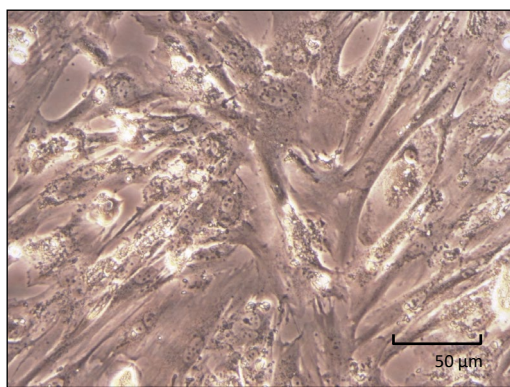


Figura 26: Población de CGLOH en día 15 de cultivo. Se observa una confluencia completa (Microscopía de contraste de fases, 200x).

## Resultados

### 7.3.2 Diferenciación inducida

La diferenciación inducida a estirpes osteogénica, condrogénica y adipogénica, que constituyó una prueba adicional de la pluripotencialidad de las CGLOH se describe seguidamente.

#### 7.3.2.1 Diferenciación osteogénica

En relación con la diferenciación osteogénica, se ha observado cómo las células CGPE, en presencia de LIF y tratadas con medio inductor de la diferenciación osteogénica adquieren la morfología asteriforme propia de los osteoblastos, y presentan depósitos de calcio claramente identificables mediante tinciones específicas en las zonas de confluencia celular en el cultivo en monocapa (Figura 27).

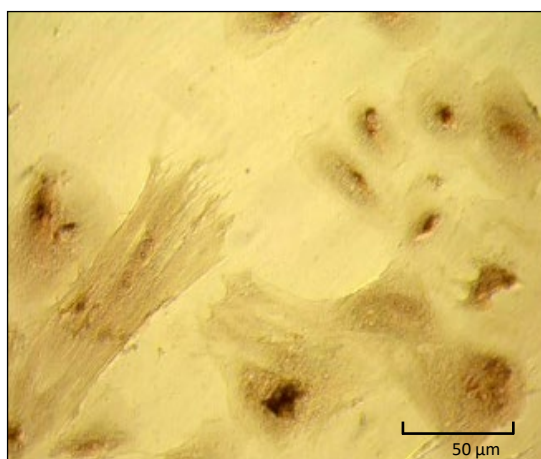


Figura 27: Diferenciación Osteogénica: Tras la tinción con Rojo Alizarín se observan en marrón más oscuro los depósitos de calcio (Microscopía de contraste de fases; 200x).

## Resultados

### 7.3.2.2 Diferenciación condrogénica

Se observó diferenciación condrogénica de CGPE tras cultivo en presencia de LIF y medio inductor específico, que fue puesta de manifiesto por medio de la tinción con Azul de Toluidina, con avidez específica por los proteoglicanos sintetizados por las células condrocíticas (Figura 28).

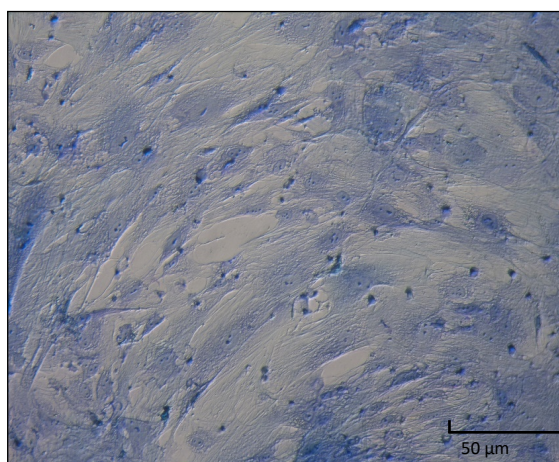
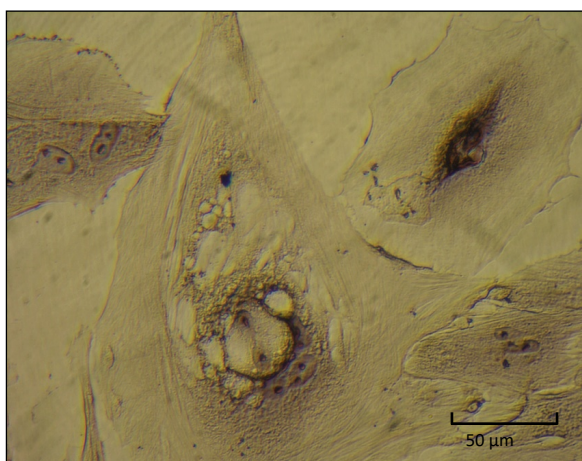


Figura 28: Diferenciación Condrogénica identificada con tinción de Azul de Toluidina. La coloración azul de las células se debe a la presencia de proteoglicanos sintetizados por las células condrocíticas (Microscopía de contraste de fases, 100x).

## Resultados

### 7.3.2.3 Diferenciación adipogénica

Las CGPE son capaces de diferenciarse a adipocitos tras cultivo prolongado en presencia de LIF y medio inductor de la diferenciación adipogénica. Como expresión de esta diferenciación *se* observaron abundantes vacuolas de grasa teñidas de rojo por medio de tinciones lipofílicas específicas.



*Figura 29: Diferenciación Adipogénica visible mediante tinción con Oil Red. Se observan abundantes vacuolas de grasa teñidas de rojo por la naturaleza lipofílica del colorante (Microscopía de contraste de fases, 200x).*

## Resultados

### 7.3.3 Inmunofenotipo

La expresión de marcadores inmunofenotípicos de las CGLOH se cuantificó mediante citometría de flujo con el fin de compararla con la detectada tras cultivo prolongado, es decir, con la exhibida por las CGPE.

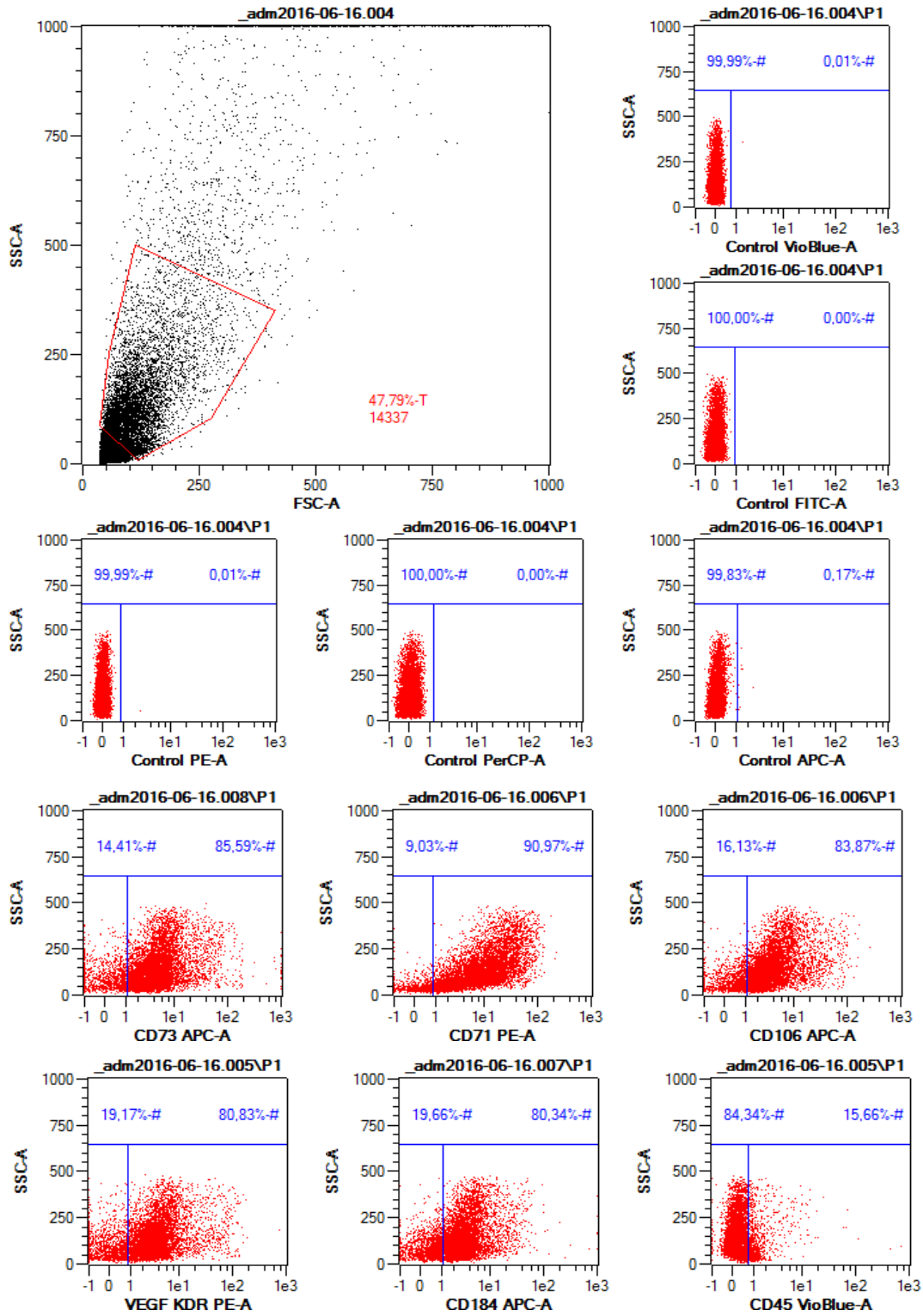
La Tabla 18 muestra las frecuencias de expresión de los marcadores característicos de las MSCMO positivos y negativos analizados en las CGLOH. La Figura 30 contiene los diagramas de tamaño-complejidad y tamaño-complejidad-fluorescencia frente a marcadores específicos obtenidos tras el procesamiento mediante citometría de flujo de estas células. En cuanto a los marcadores positivos, y considerando las cuatro muestras de origen en conjunto, el rango de expresión varió entre el 56,16% de CD184 (pool 3) hasta el 94,92% de CD171 (pool 2). Comparando la expresión entre lotes, se aprecia que dos de ellos (1 y 4) presentan menor diferencia entre los marcadores con máxima y mínima expresión, que sin embargo resulta mayor en los lotes 2 y 3. El rango de las diferencias de la expresión entre lotes para cada marcador quedó comprendido entre 3,95% para CD71 y 34,61% para VEGF. Con respecto a los marcadores negativos, la expresión de 8 de los 12 marcadores estaba por debajo del 6,66%.

**Resultados**

Marcadores positivos	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Diferencia absoluta de expresión
CD73	85.59	75.24	68.33	86.78	18.45
CD71	90.97	94.92	93.99	94.52	3.95
CD106	83.87	75.72	73.47	90.02	16.55
VEGF	80.83	68.49	57.75	92.36	34.61
CD184	83.34	65.22	56.16	88.8	32.64
Marcadores negativos	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Diferencia absoluta de expresión
CD45	15.66	1.8	5.95	19.02	17.22
CD34	7.49	1.39	0.83	5.91	6.66
CD14	9.67	6.36	5.79	10.29	4.5
CD19	2.32	0.38	0.35	1.07	1.97
HLA	17.74	0.3	0.34	15.53	17.44
CD117	0.12	0.1	0.07	0.23	0.16
CD31	4.51	1.25	0.89	5.72	4.83
CD271	1.89	1.68	3.54	0.17	3.37
CD133	2.15	1.95	1.87	3.2	1.33
CD3	1.29	0.14	0.11	0.98	1.18
CD90	5.38	15.05	12.63	3.37	11.68
CD105	11.09	5.96	7.02	17.7	11.74

*Tabla 18: Caracterización inmunofenotípica de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) (% expresión).*

**Resultados**



**Resultados**

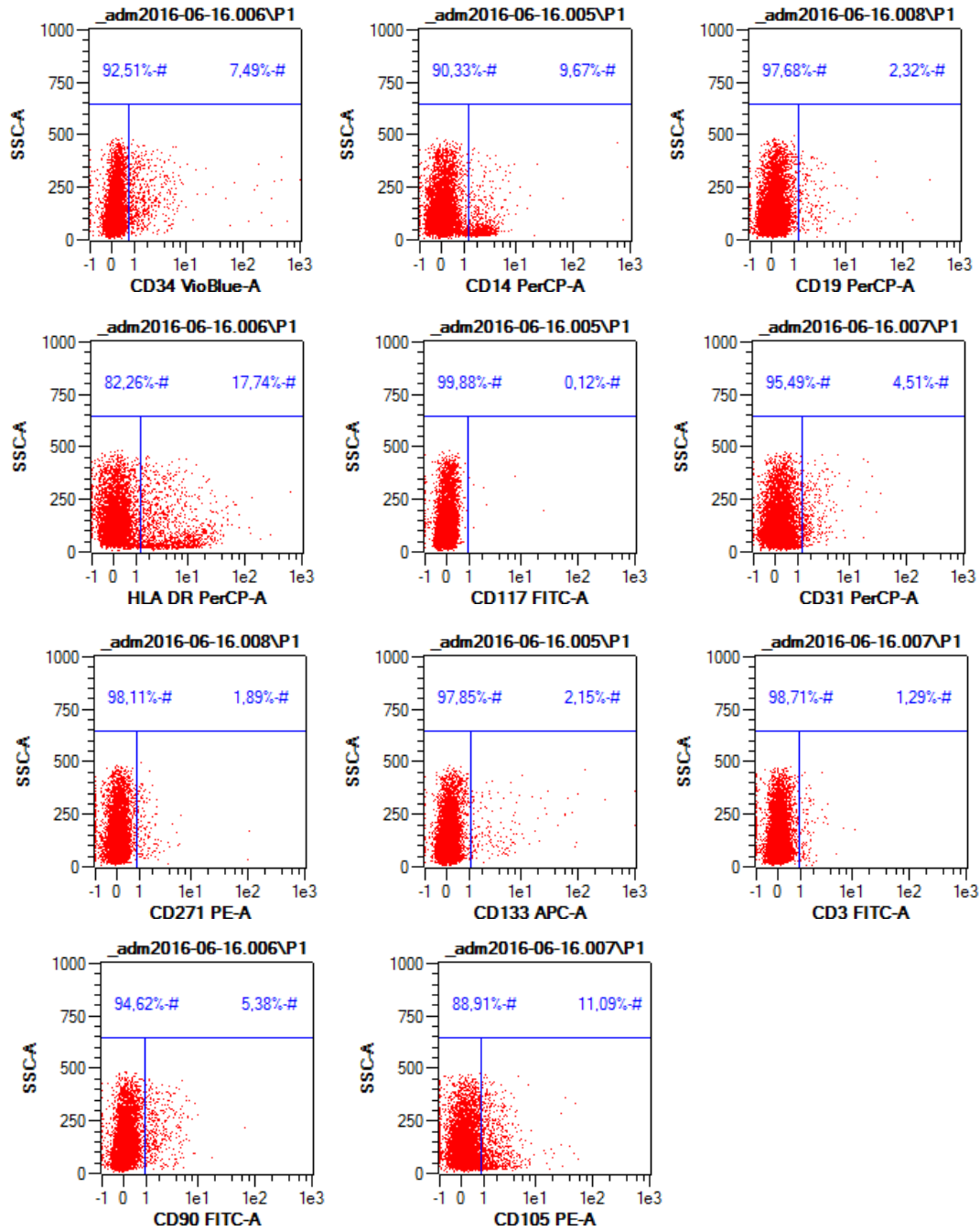


Figura 30: Caracterización inmunofenotípica de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) obtenido con el Software MACSQuantify. Diagramas de tamaño-complejidad y tamaño-complejidad-fluorescencia frente a marcadores específicos.

## Resultados

La Tabla 19 muestra las frecuencias de expresión de los marcadores característicos de las MSCMO positivos y negativos analizados en las CGPE. La Figura 31 contiene los diagramas de tamaño-complejidad y tamaño-complejidad-fluorescencia frente a marcadores específicos obtenidos tras el procesamiento mediante citometría de flujo de estas células. En cuanto a los marcadores positivos, y considerando las cuatro muestras de origen en conjunto, el rango de expresión varió entre el 53,68% de CD106 (pool 4) hasta el 99,99% de CD73 (pool 1). Comparando la expresión entre lotes, se aprecia que dos de ellos (1 y 3) presentan menor diferencia entre los marcadores con máxima y mínima expresión, que sin embargo resulta mayor en los lotes 2 y 4. El rango de las diferencias de la expresión entre lotes para cada marcador quedó comprendido entre 0,46% para CD73 y 34,82% para CD184. Con respecto a los marcadores negativos, la expresión de 9 de los 10 marcadores estaba por debajo del 3,29%.

**Resultados**

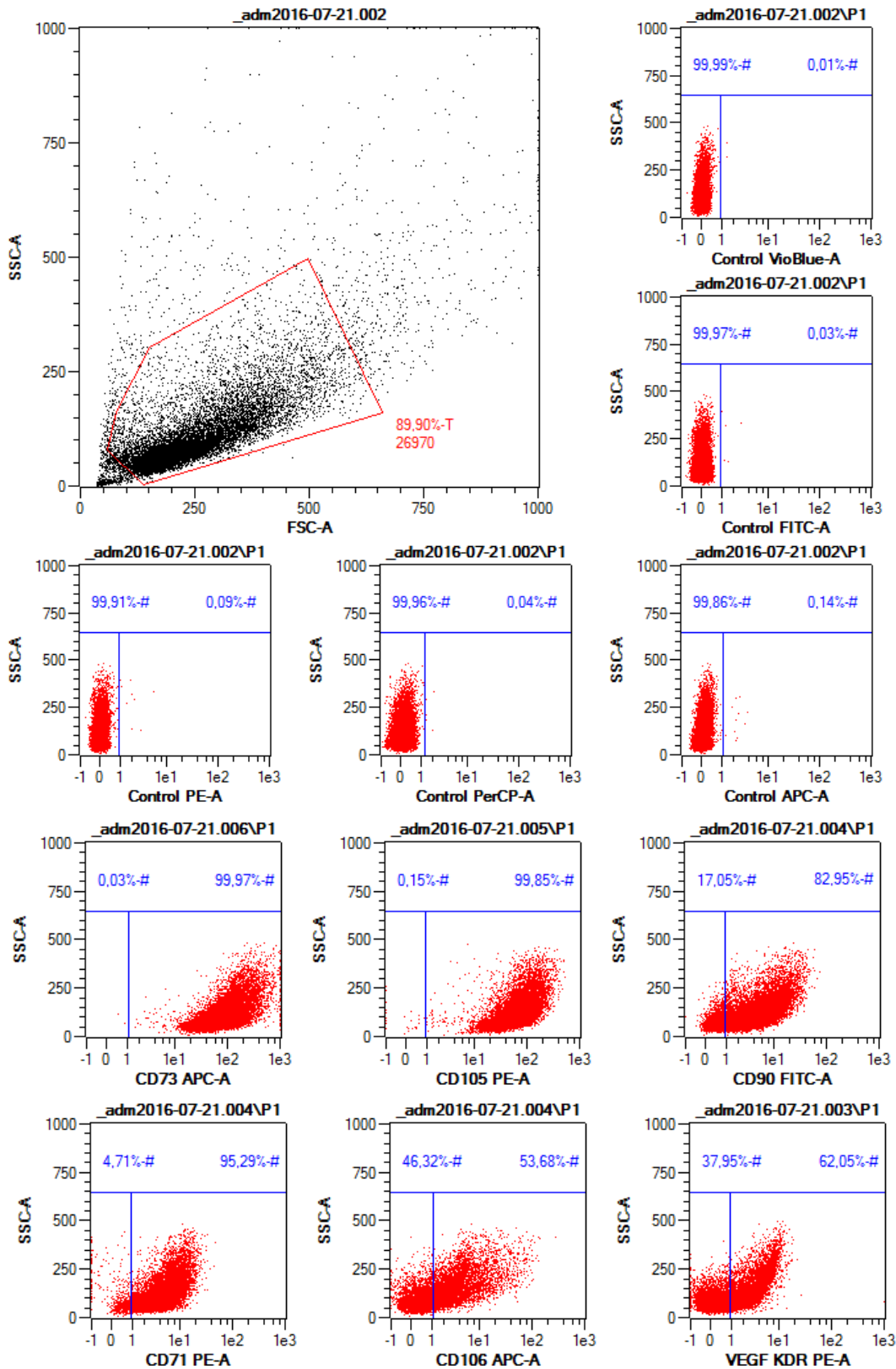
Marcadores positivos	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Diferencia absoluta de expresión
CD73	99.99	99.53	99.91	99.97	0.46
CD105	99.67	98.95	98.96	99.85	0.9
CD90	90.45	88.16	61.61	82.95	28.84
CD71	97.6	97.85	97.71	95.29	2.56
CD106	83.05	80.19	69.13	53.68	29.37
VEGF	92.22	76.16	74.91	62.05	30.17
CD184	89.69	54.87	70.94	81.11	34.82
Marcadores negativos	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Diferencia absoluta de expresión
CD45	4.76	1.47	1.52	1.79	3.29
CD34	2.16	1.31	1.93	0.34	1.82
CD14	3.12	2.41	2.23	0.5	2.62
CD19	2.39	2.44	3.01	0.93	2.08
HLA	1.44	0.54	0.2	0.04	1.4
CD117	1.11	1.95	0.14	0.15	1.81
CD31	3.46	1.84	0.47	0.54	2.99
CD271	26.42	26.7	23.62	8.66	18.04
CD133	1.54	0.43	1.04	0.72	1.11
CD3	3.07	3.91	3.79	1.4	2.51

*Tabla 19: Caracterización inmunofenotípica de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (% expresión).*

## Resultados

Además de los marcadores recomendados por la ISCT (*Internacional Society Cellular Therapy*), se añadieron, como marcadores positivos CD71, CD106, VEGF, CD184 y como marcadores negativos CD117, CD31, CD271, CD133, CD3. La Tabla 18 muestra los porcentajes de expresión de ambos grupos de marcadores detectados en cuatro lotes de cultivo de CGPE. En todos los lotes analizados se detectaron expresiones de marcadores positivos en más del 50% de las células. La expresión de los marcadores positivos CD73, CD105 y CD71 fue, de forma consistente, la más elevada en los cuatro lotes analizados, y superior al 95% en todos ellos. El resto de marcadores positivos (CD90, CD106, VEGF, CD184) presentó perfiles de expresión ligeramente más bajos y heterogéneos. Con respecto a los marcadores negativos básicos y adicionales analizados, todos presentaron niveles de expresión inferiores al 5% (en incluso al 3%), con la excepción de CD71, del que se detectaron expresiones comprendidas entre el 8,6% y el 23,4% en los distintos lotes analizados.

**Resultados**



## Resultados

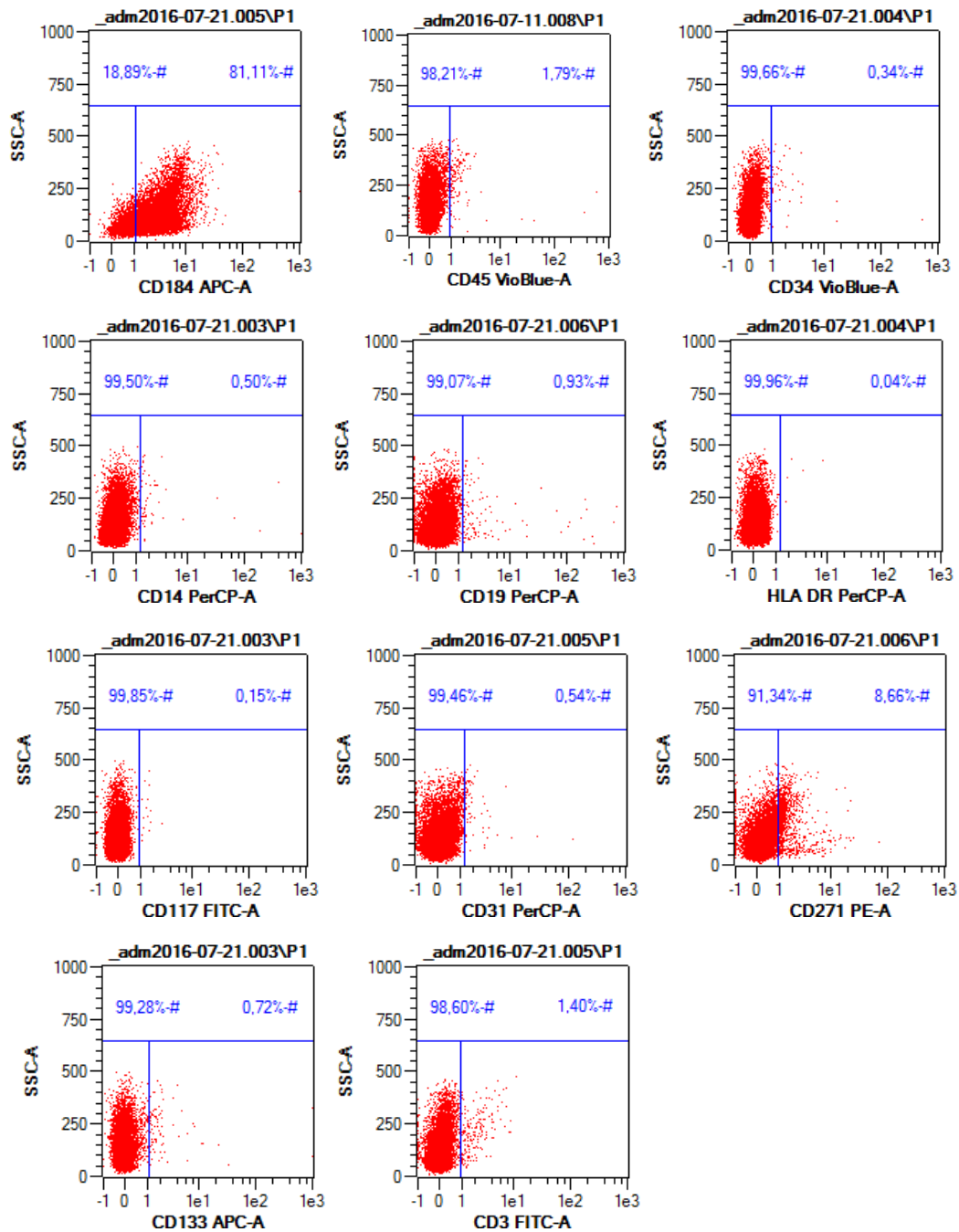


Figura 31: Caracterización inmunofenotípica de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) obtenido con el Software MACSQuantify. Diagramas de tamaño-complejidad y tamaño-complejidad-fluorescencia frente a marcadores específicos.

**Resultados**

Si comparamos ambas poblaciones celulares observamos como las CGPE presentan positividad para CD90 o Thy 1, marcador característico de MSC y CD105 o Endoglina, glucoproteína de membrana tipo I, marcadores con expresión muy baja en las CGLOH. La Expresión de HLA-DR (Antígeno de histocompatibilidad), que alcanzó el 17% en uno de los lotes de CGLOH, desapareció en las CGPE.

Marcadores	Células de la Granulosa Luteinizadas		Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas	
	Pool 1	Pool 2	Pool 1	Pool 2
CD73	85.59	75.24	99.99	99.53
CD71	90.97	94.92	97.6	97.85
CD106	83.87	75.72	83.05	80.19
VEGF	80.83	68.49	92.22	76.16
CD184	83.34	65.22	89.69	54.87
CD45	15.66	1.8	4.76	1.47
CD34	7.49	1.39	2.16	1.31
CD14	9.67	6.36	3.12	2.41
CD19	2.32	0.38	2.39	2.44
HLA-DR	17.74	0.3	1.44	0.54
CD117	0.12	0.1	1.11	1.95
CD31	4.51	1.25	3.46	1.84
CD271	1.89	1.68	26.42	26.7
CD133	2.15	1.95	1.54	0.43
CD3	1.29	0.14	3.07	3.91
CD90	5.38	15.05	90.45	88.16
CD105	11.09	5.96	99.67	98.95

Tabla 20: Caracterización de las *Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH)* vs *Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE)* (% expresión)

## Resultados

### 7.3.3.1 Expresión génica

La pluripotencialidad de las CGLOH ha sido evaluada también aplicando metodologías de análisis de expresión génica diferencial. Se comparó el perfil de expresión génica de las CGLOH frente al de las CGPE y las MSCMO. Este estudio comparó la expresión de un conjunto de 36 genes, que incluían genes relacionados con la memoria funcional de origen (*FSHR*, *LHGCR*, *Cyp19a1*, *AMH*, *INHB*, *HSD2B2* y *HSD3B1*), con multipotencialidad de células progenitoras adultas hematopoyéticas (*CD117*, *CD90*, *CD105* y *CD34*), con estirpe celular hematopoyética (*CD44* y *CD45*), con multipotencialidad de células progenitoras adultas mesenquimales (*CD166*, *CD73*, *CD106*, *LRG5* y *CD29*), con pluripotencialidad embrionaria (*NANOG*, *DPPA3*, *SOX2*, *POUF5*, *TERT* y *LAMINA*) y germinal (*DAZL* y *DDX4*) y genes relacionados con actividades citoprotectoras (*FGF2*, *HGF*, *EGF*, *IGF1*, *BCL2*, *CAT*, *SOD 1*, *SOD 2*, *GLO1* y *ESR 2*).

Si estudiamos los genes relacionados con la memoria funcional de origen, las CGPE, en comparación con las CGLOH, presentan una expresión significativamente menor de LHR, FSHR, actividad Aromatasa, actividad HSD3B2 y AMH, comportándose de forma similar a como lo hacen las MSCMO, excepto con la AMH, que al contrario de lo que podía pensarse, este último tipo celular presenta una expresión mayor que la que presentan las CGLOH.

## Resultados

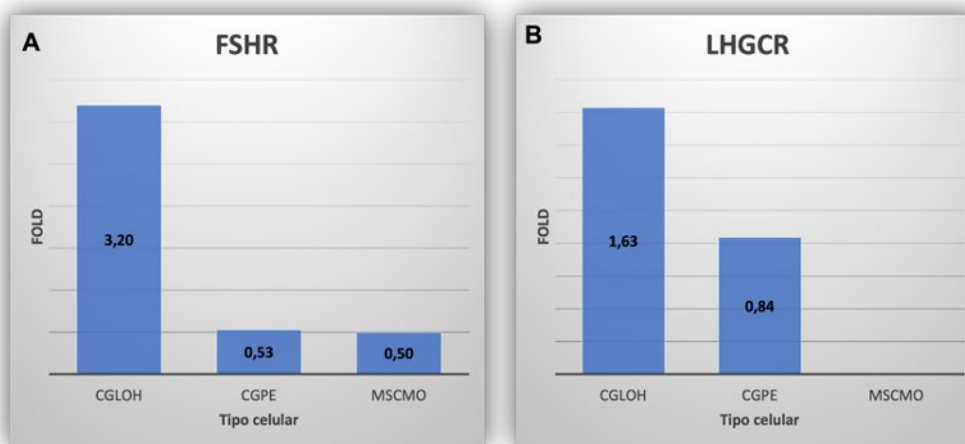
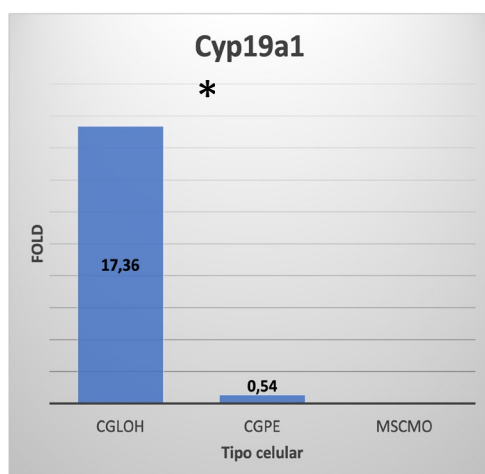


Figura 32: Expresión génica relativa de FSHR (A) y LHGCR (B) según tipo celular.

Figura 33: Expresión génica relativa de Cyp19a1 según tipo celular.



**Resultados**

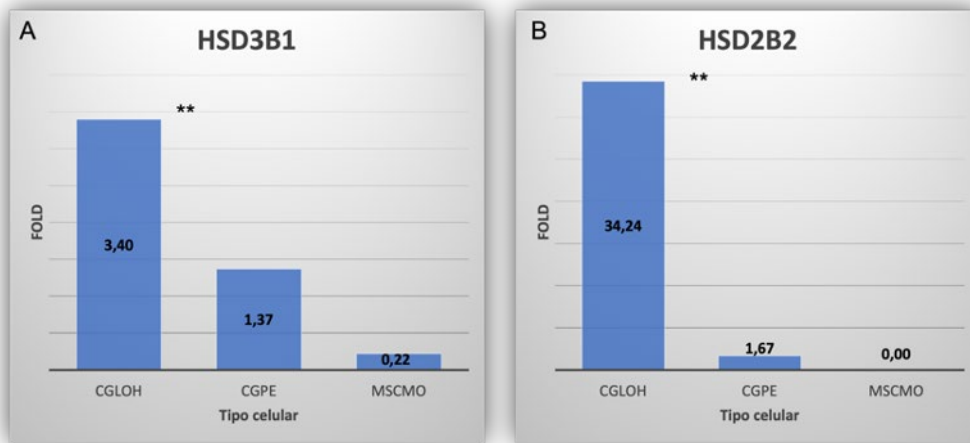


Figura 34: Expresión génica relativa de HSD3B1 (A) y HSD2B2 (B) según tipo celular.

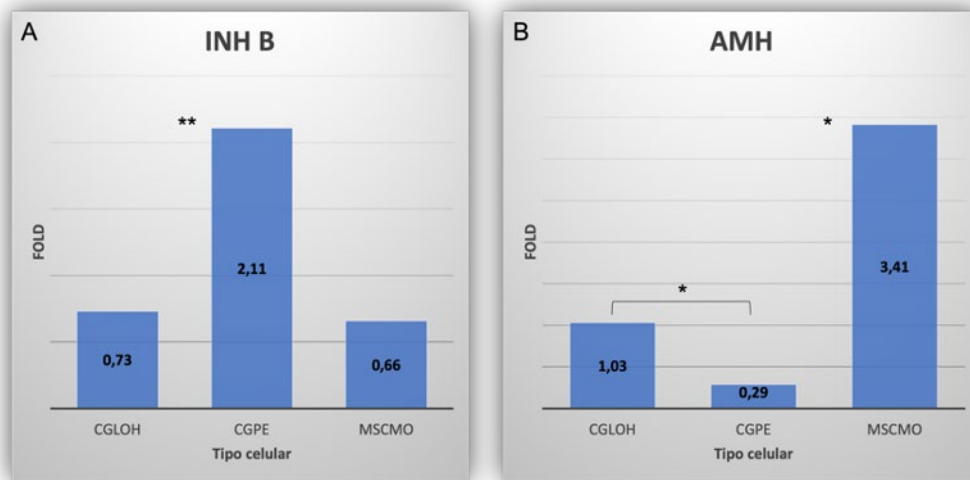


Figura 35: Expresión génica relativa de INH B (A) y AMH (B) según tipo celular.

En referencia a los genes relacionados con multipotencialidad de células progenitoras adultas hematopoyéticas, las CGPE se comportan de un modo similar a como lo hacen las MSCMO, presentando mayor expresión de c-kit, Thy-1 y ENG que las CGLOH.

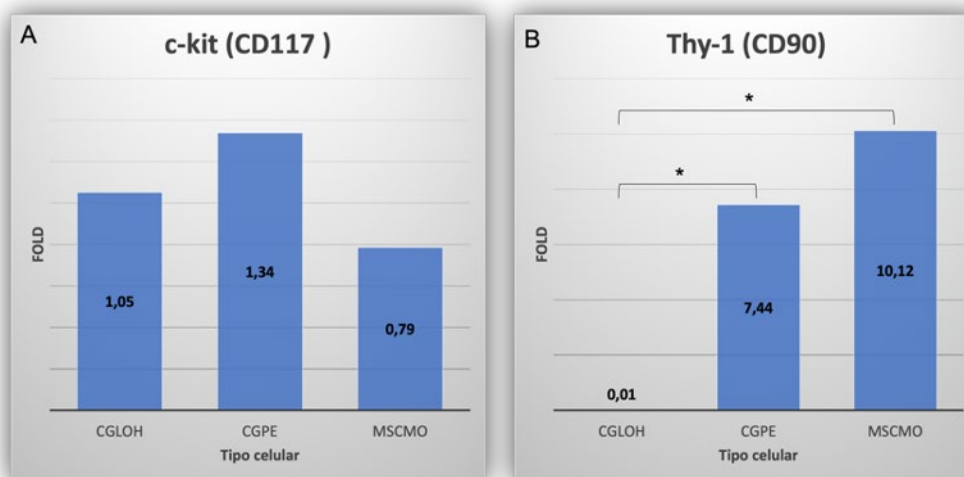
**Resultados**

Figura 36: Expresión génica relativa de KIT (CD117) (A) y THY1 (CD90) (B) según tipo celular.

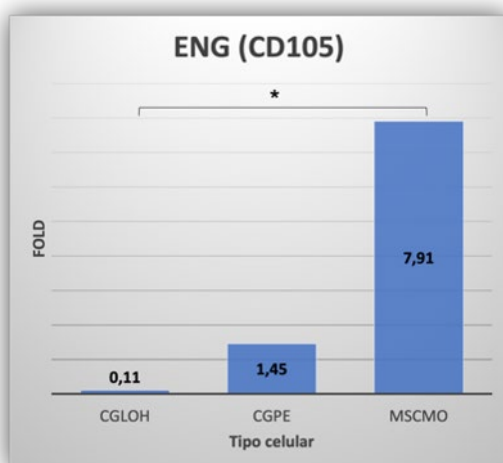


Figura 37: Expresión génica relativa de ENG (CD105) según tipo celular.

Los genes relacionados con la estirpe celular hematopoyéticas, las CGPE se comportan de un modo similar a como lo hacen las MSCMO, presentando menor expresión de CD45 que las CGLOH. En cambio, la expresión de CD44 es similar en las CGLOH y en las CGPE, pero más elevada en las MSCMO.

**Resultados**

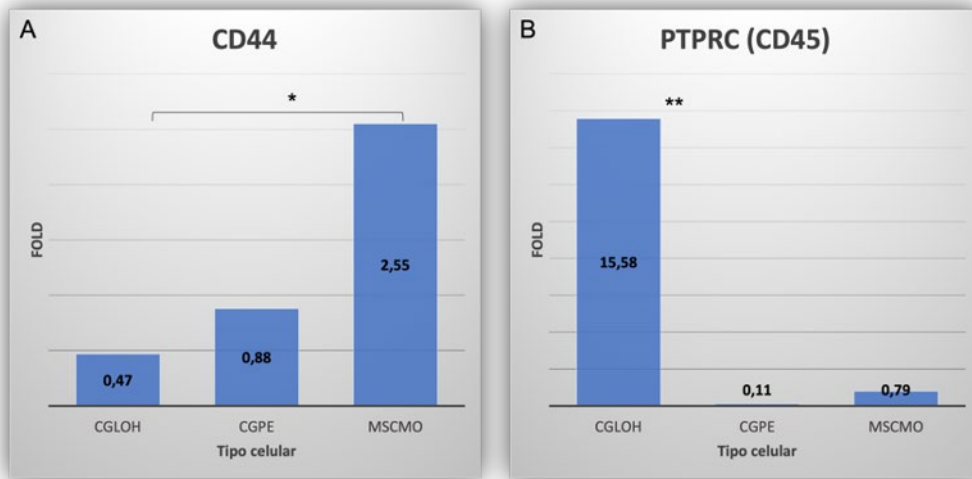


Figura 38: Expresión génica relativa de CD44 (A) y PTPRC (CD45) (B) según tipo celular.

La expresión de los genes relacionados con multipotencialidad de células progenitoras adultas mesenquimales, en todos los casos fue mayor en las CGPE y en las MSCMO que en las CGLOH.

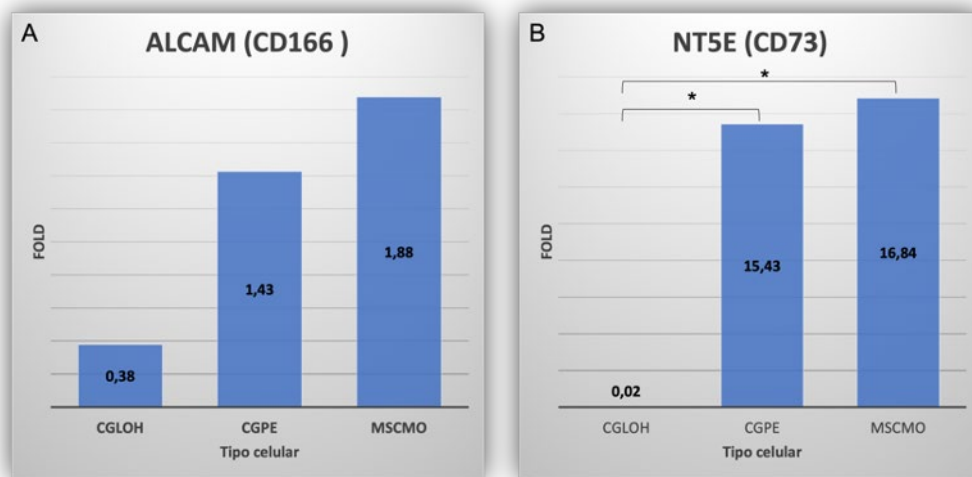


Figura 39: Expresión génica relativa de ALCAM (CD166) (A) y NT5E (CD73) (B) según tipo celular.

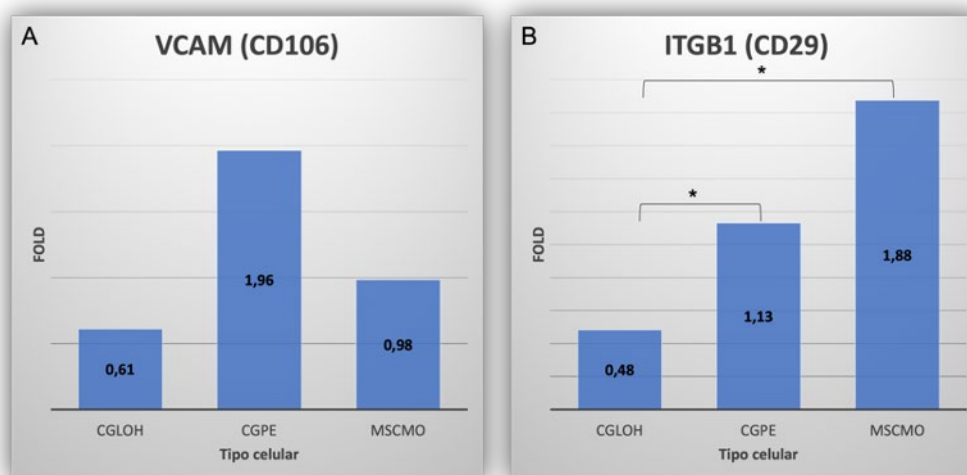
**Resultados**

Figura 40: Expresión génica relativa de VCAM (CD106) (A) e ITGB1 (CD29) (B) según tipo celular.

En cuanto a los genes relacionados con pluripotencialidad embrionaria, DPPA3, POUF5 y LMNA, presentan mayor expresión en las CGPE y las MSCMO que en las CGLOH. En cambio, la expresión de SOX2 y TERT es más baja en las CGLOH y en las CGPE que en las MSCMO.

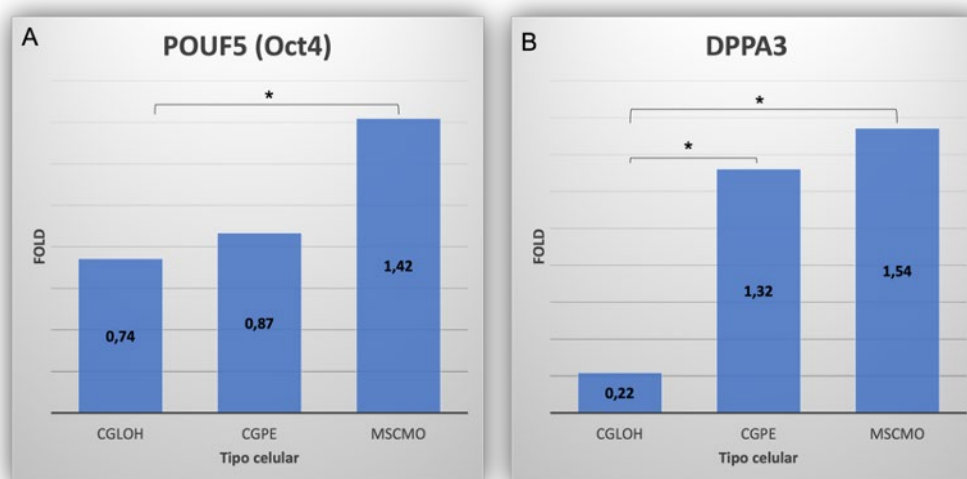


Figura 41: Expresión génica relativa de POUF5 (Oct4) (A) y DPPA3 (A) según tipo celular.

## Resultados

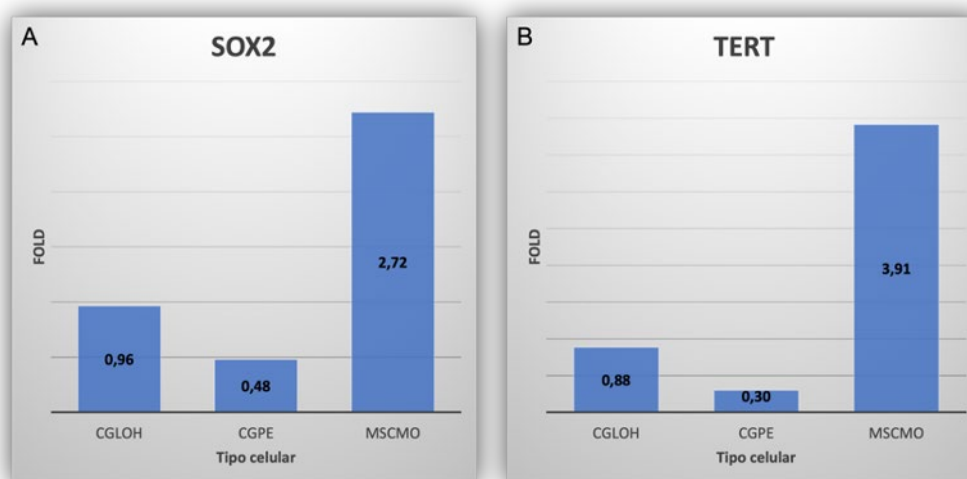


Figura 42: *Expresión génica relativa de SOX2 (A) y TERT (B) según tipo celular.*

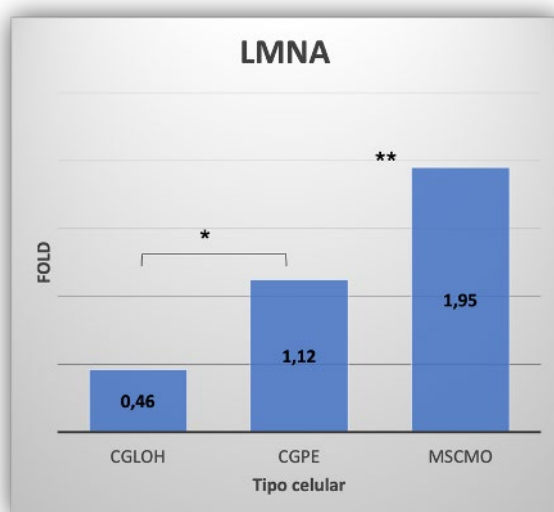


Figura 43: *Expresión génica relativa de LMNA según tipo celular.*

Los genes relacionados con pluripotencialidad germinal no se expresaron en ninguno de los tres tipos celulares.

## Resultados

En cuanto a los genes relacionados con actividades citoprotectoras, las CGPE presentan una mayor expresión de FGF2, EGF, IGF-1, SOD1, CAT y GLO 1 que las CGLOH, pero en contra de lo que se preveía, presentan menor expresión de HGF, ESR2 y BCL2.

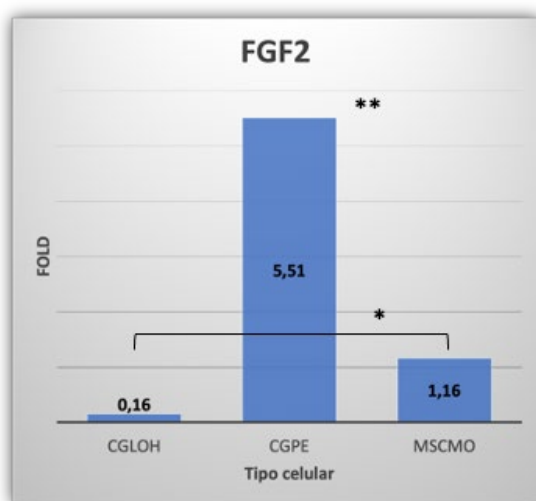


Figura 44: Expresión génica relativa de FGF2 según tipo celular.

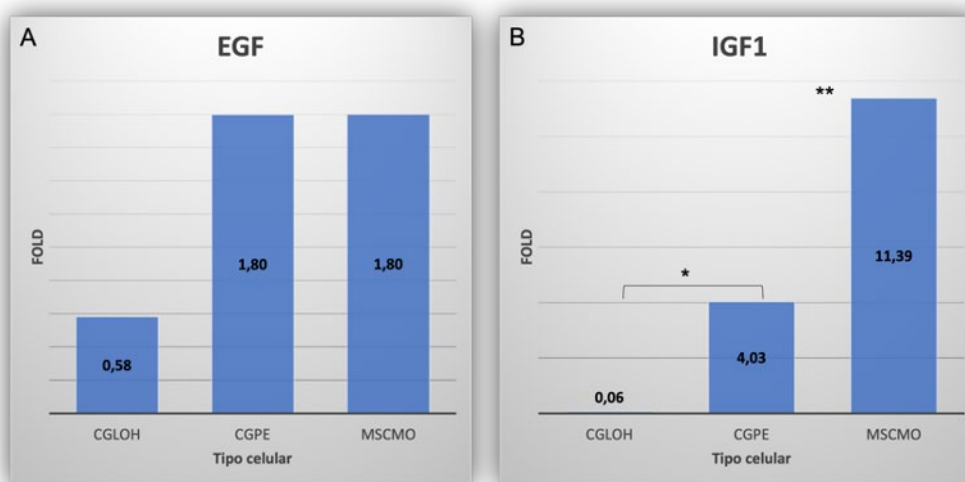


Figura 45: Expresión génica relativa de EGF (A) y IGF1 (B) según tipo celular

## Resultados

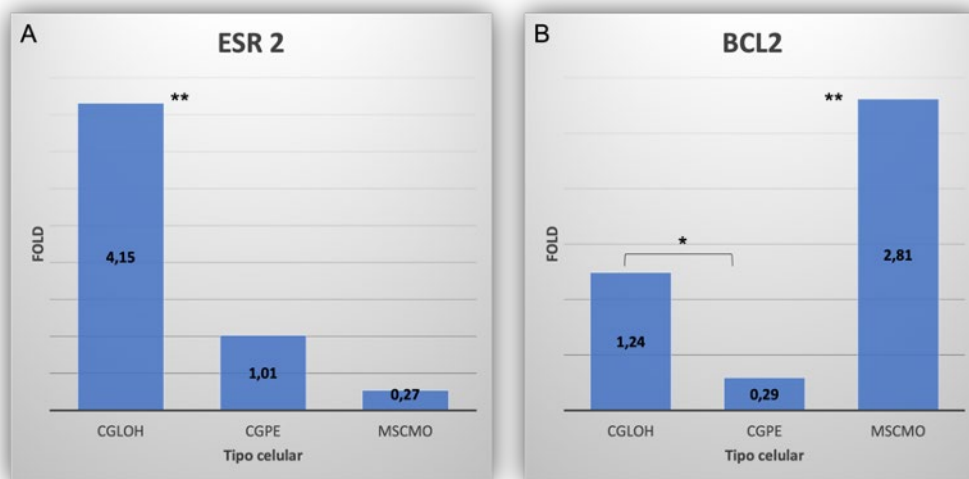


Figura 46: Expresión génica relativa de ESR 2 (A) y BCL2 (B) según tipo celular.

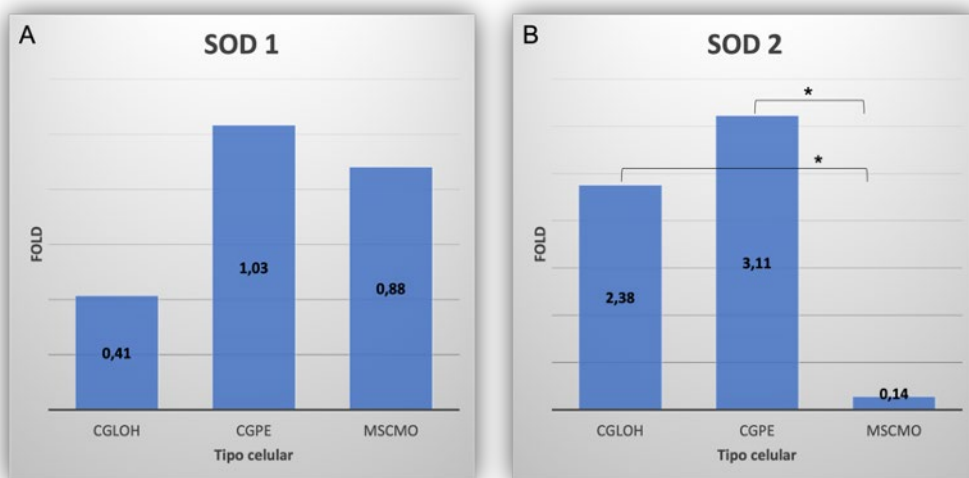


Figura 47: Expresión génica relativa de SOD 1 (A) y SOD 2 (B) según tipo celular.

## Resultados

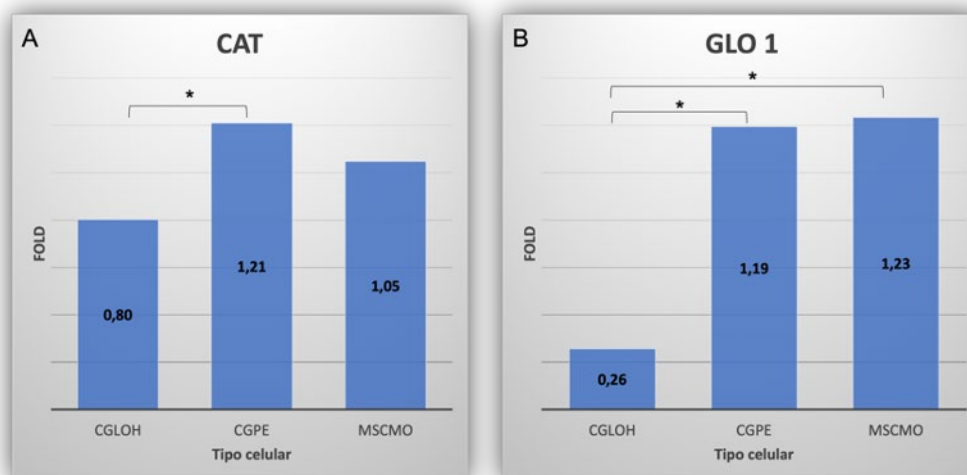


Figura 48: Expresión génica relativa de CAT (A) y GLO 1 (B) según tipo celular

En resumen, las CGPE presentan características funcionales diferenciadoras respecto de las CGLOH, que incluyen menor expresión de marcadores funcionales propios de CG y mayor de actividades relacionadas con la promoción de la proliferación celular, de la angiogénesis y de la protección frente a la apoptosis.

### **Análisis de agrupamiento (*PermutMatrix*).**

Se realizó un análisis gráfico de agrupamiento (clustering) con el objetivo de establecer un perfil de expresión génica global para las CGLOH, para las CGPE y para las MSCMO usando el programa *PermutMatrix* (Caraux et al., 2005). Este programa representa los valores numéricos de expresión en una escala de gradación de colores. Los datos fueron agrupados por tipo celular usando el análisis de similitud de McQuitty (1966). El análisis muestra una mayor similitud entre los perfiles de expresión de CGLOH y de CGPE (ajuste,  $R=0.978$ ), como cabría esperar dado el origen de las células.

## Resultados

Este análisis gráfico permite identificar a simple vista las similitudes y diferencias a nivel de expresión génica entre los tres tipos celulares, y permite identificar potenciales marcadores específicos de tipo celular.

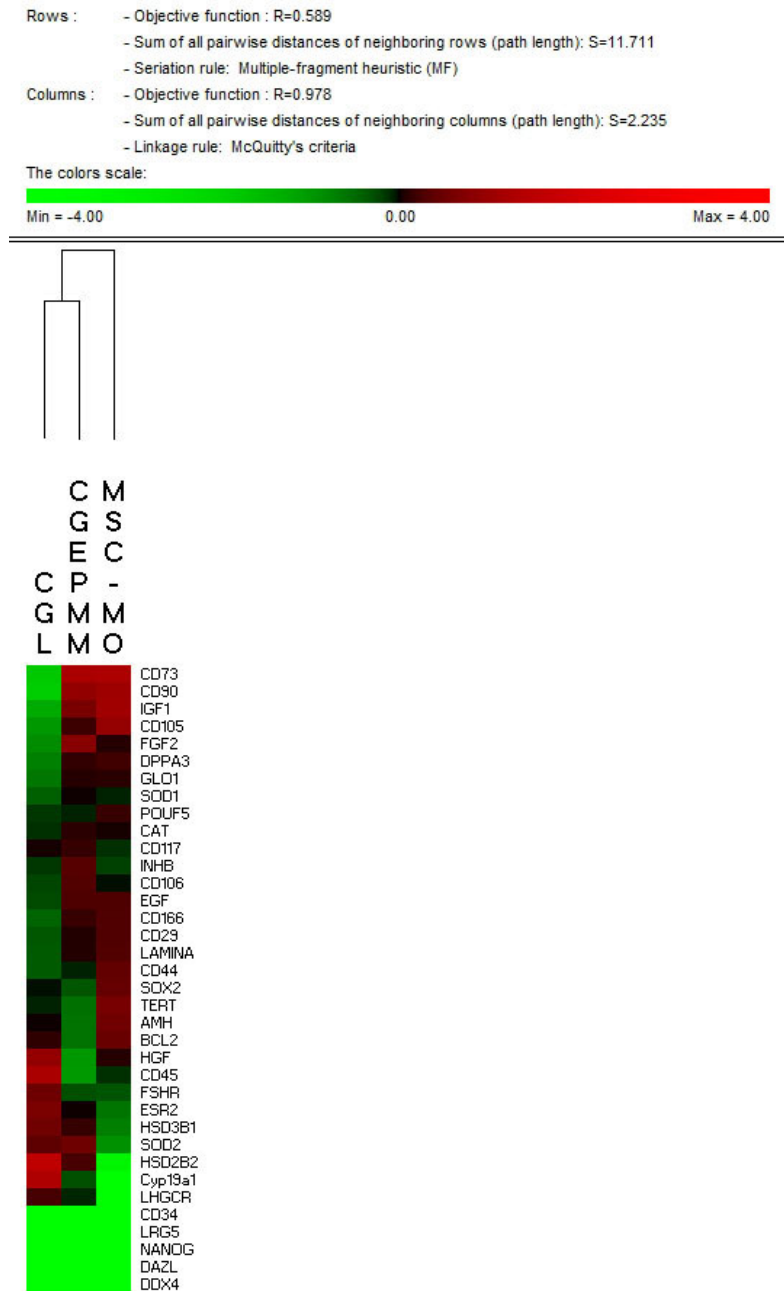


Figura 49: Análisis de agrupamiento (clustering).

## Resultados

### **7.3.4 Evaluación de la capacidad protectora frente a citotoxicidad experimental**

Las CGPE tienen efecto protector frente a la toxicidad celular ejercida sobre la CGLOH, y ejercen dicho efecto por medio de la síntesis de factores protectores frente a la apoptosis, inductores de la angiogénesis y promotores de la proliferación celular.

El cocultivo con CGPE reduce significativamente los niveles de apoptosis, medida mediante Anexina V, en un modelo de toxicidad experimental sobre las CGLOH sometidas a OS y a CS.

El cocultivo con CGPE reduce la apoptosis/muerte celular inducida por peroxidación experimental de las CGLOH.

El cocultivo con CGPE reduce la apoptosis/muerte celular inducida por toxicidad experimental con especies reactivas de carbono de las CGLOH.

#### **7.3.4.1 Estrés oxidativo**

Al estudiar cómo evoluciona la viabilidad de las CGLOH con el paso del tiempo en las diferentes condiciones de cultivo, se observa que hay una disminución de la misma en todos los casos entre los dos primeros tiempos de estudio para luego mantenerse constante a lo largo de los diferentes tiempos. En el caso en el que las CGLOH están en presencia del tóxico por sí solas, la viabilidad se presenta prácticamente nula a partir del segundo tiempo de estudio.

## Resultados

La viabilidad inicial de las CGLOH en presencia del tóxico y de las CGPE es superior a la que presentan las CGLOH solas en presencia del tóxico, pero 15 veces inferior a la que presentan las CGLOH en presencia de tóxico y de las MSCMO.

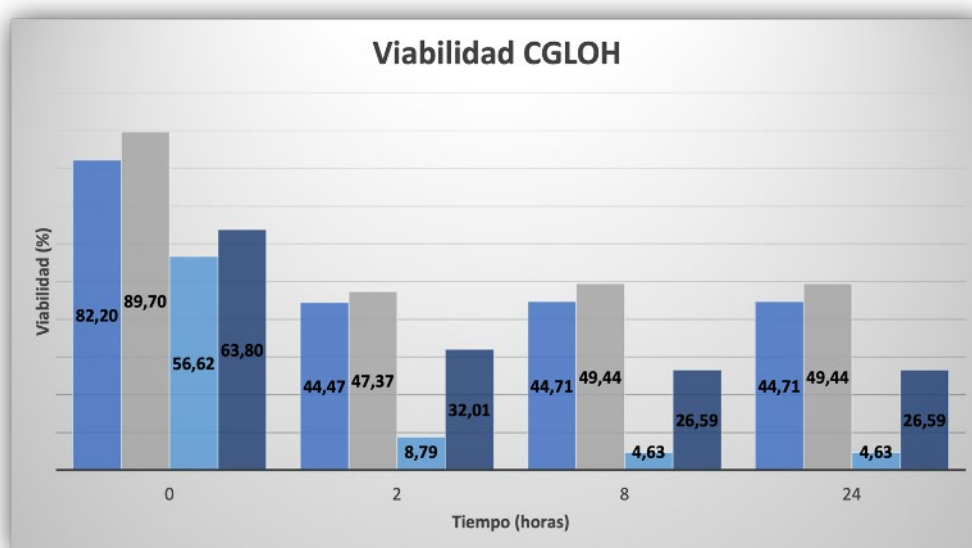


Figura 50: Viabilidad de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adición de tóxico (AZUL OSCURO); con adición del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Viabilidad se define como el % de células viables con respecto al número total de células iniciales).

En el caso de la apoptosis, hay una disminución de la misma entre los dos primeros tiempos de exposición al tóxico en todas las condiciones de cultivo, para luego mantenerse, excepto en las CGLOH en presencia del tóxico y de las MSCMO donde se observa un ligero incremento.

La apoptosis inicial es mayor en las CGLOH solas con el tóxico que el resto, parámetro que se iguala entre las diferentes condiciones de cultivo en el segundo tiempo de exposición, para incrementarse

## Resultados

ligeramente con el paso del tiempo en las CGLOH en presencia del toxico y de MSCMO.

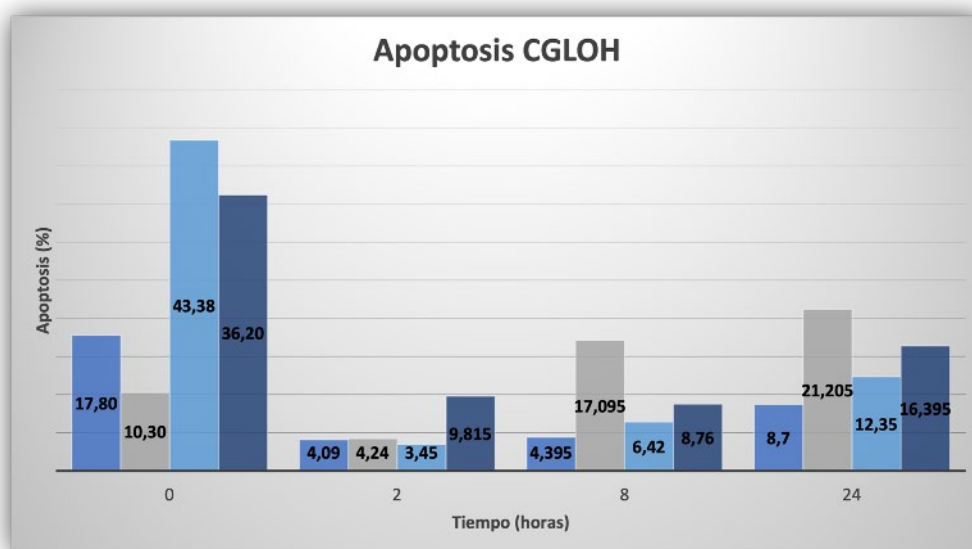


Figura 51: Apoptosis de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adición de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Apoptosis se define como el % de células apoptóticas con respecto al número total de células iniciales).

La muerte de las CGLOH, aumenta de forma significativa en todos los casos desde el primer tiempo de exposición. Esta muerte permanece constante a lo largo del tiempo, excepto en el caso de las CGLOH en presencia del tóxico y MSCMO donde disminuye ligeramente del segundo tiempo de exposición al tercero y al cuarto.

## Resultados

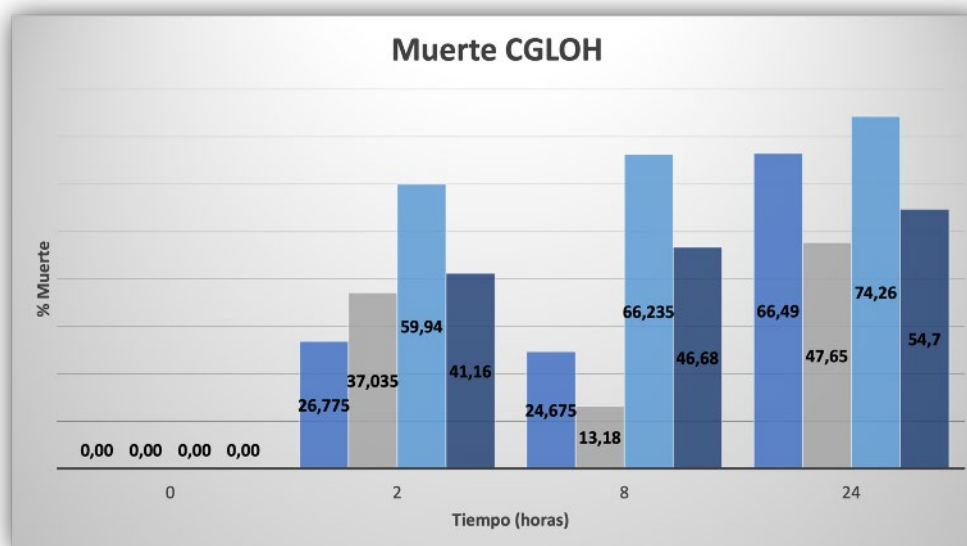


Figura 52: Muerte de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adicción de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Muerte se define como el % de células muertas con respecto al número total de células iniciales).

### Según el tipo celular

Cuando cultivas las CGLOH solas, la viabilidad de las mismas disminuye del primer al segundo tiempo de cultivo, para luego permanecer estable a medida que éste avanza. La apoptosis disminuye también del primer al segundo tiempo para sufrir un ligero incremento del tercer al cuarto tiempo de cultivo celular, es decir, a las 24 horas. La muerte aparece en el segundo tiempo de cultivo, a las 2 horas, y sufre un incremento a las 24 horas.

## Resultados

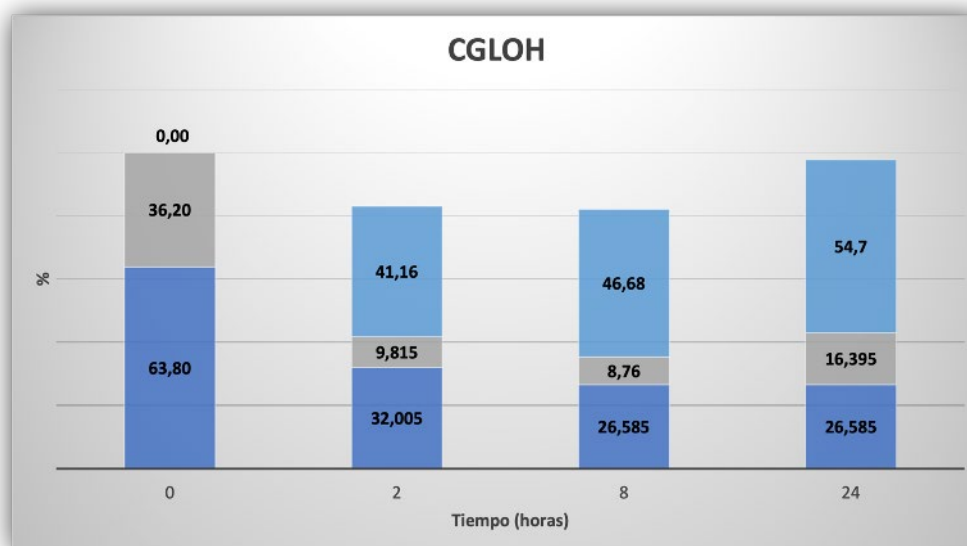


Figura 53: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin tóxico a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas).

Al cultivar las CGLOH en presencia del tóxico (Peroxinitrito), la viabilidad de las mismas disminuye drásticamente del primer al segundo tiempo de cultivo, para luego permanecer estable a medida que éste avanza. La apoptosis disminuye también del primer al segundo tiempo de cultivo para mantenerse estable. En cambio, la muerte aparece muy incrementada en el segundo tiempo de cultivo, a las 2 horas, y continúa ascendiendo ligeramente a medida que avanza el mismo.

## Resultados

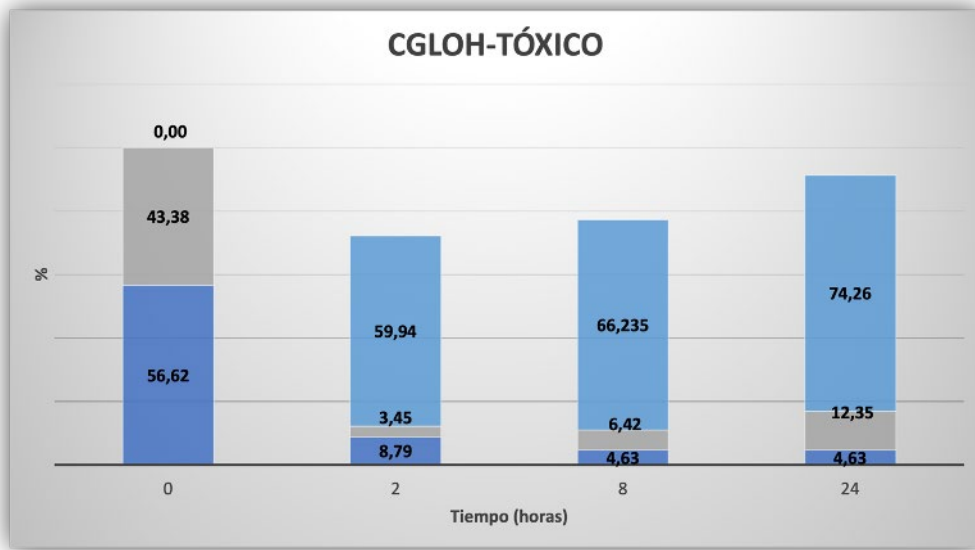


Figura 54: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia del tóxico (Peroxinitrito) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas).

Al cultivar las CGLOH en presencia del tóxico (Peroxinitrito) y de las CGPE, la viabilidad de las mismas disminuye del primer al segundo tiempo de cultivo, para luego permanecer estable a medida que éste avanza. La apoptosis disminuye también del primer al segundo tiempo de cultivo para incrementarse ligeramente a las 24 horas. En cambio, la muerte aparece a las 2 horas, permanece estable en el segundo y tercer tiempo y sufre un incremento significativo a las 24 horas de cultivo.

## Resultados

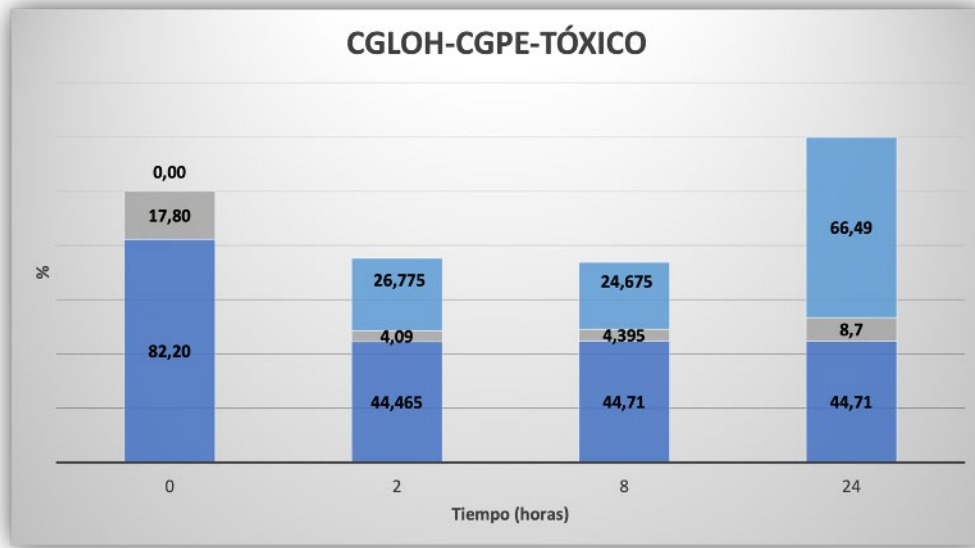


Figura 55: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia de las Células (de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) y del tóxico (Peroxinitrito) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas).

Cuando cultivamos las CGLOH en presencia del tóxico (Peroxinitrito) y de las MSCMO, la viabilidad de las mismas disminuye ligeramente del primer al segundo tiempo de cultivo, para luego permanecer estable a medida que éste avanza. La apoptosis sufre un incremento a las 8 y a las 24 horas de cultivo. La muerte aparece a las 2 horas, disminuye ligeramente a las 8 horas de cultivo y vuelve a sufrir un incremento a las 24 horas.

## Resultados

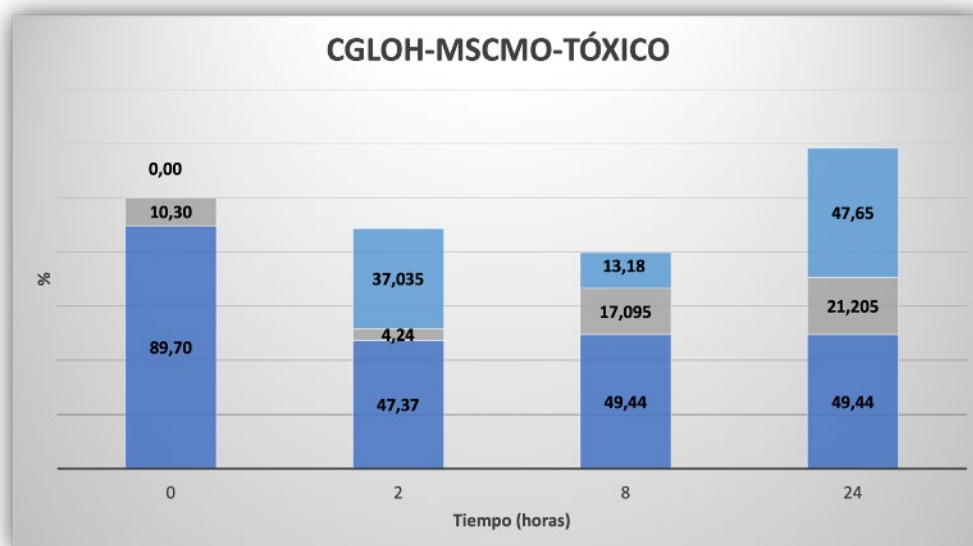


Figura 56: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) y del tóxico (Peróxinitrito) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas).

### 7.3.4.2 Estrés carbonílico

Al estudiar cómo evoluciona la viabilidad de las CGLOH con el paso del tiempo en las diferentes condiciones de cultivo, se observa que hay una disminución de la misma desde el inicio del cultivo a las 2 horas, se mantiene constante a las 8 horas, pero se observa nuevamente una disminución a las 24 horas. Cuando las CGLOH están en presencia del tóxico por sí solas, la viabilidad se presenta prácticamente nula a partir del segundo tiempo de estudio.

La viabilidad inicial de las CGLOH en presencia del tóxico y de las CGPE es superior a la que presentan las CGLOH solas en presencia del tóxico, pero inferior a la que presentan las CGLOH en presencia de tóxico y de las MSCMO.

## Resultados

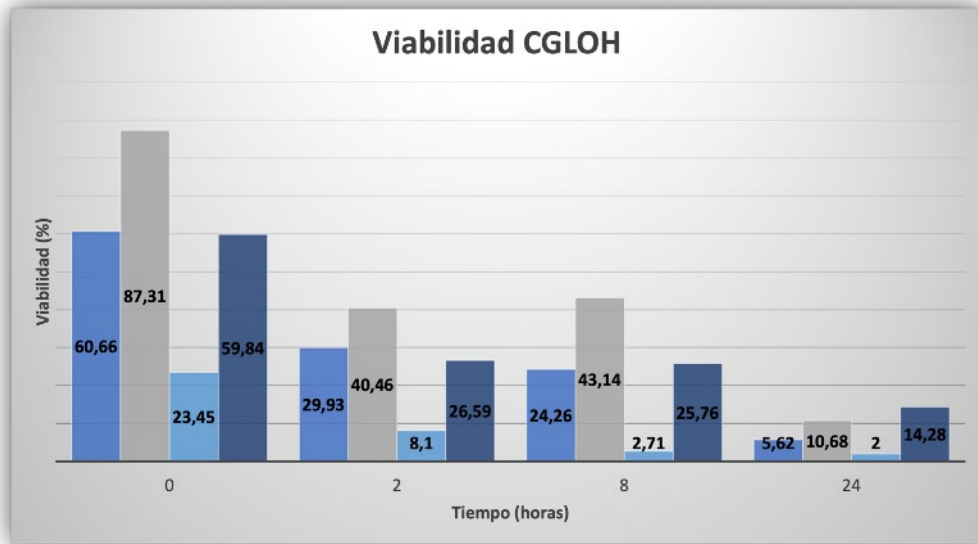


Figura 57: Viabilidad de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adicción de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO)) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Viabilidad se define como el % de células viables con respecto al número total de células iniciales).

En el caso de la apoptosis, a tiempo 0 es muy elevada en las CGLOH en presencia del tóxico. Hay una disminución de la misma entre los dos primeros tiempos en todas las condiciones de cultivo, sufriendo un pequeño incremento a las 8 horas en todos los casos, excepto en las CGLOH en presencia de Glioxal, donde el aumento es mucho mayor, pasando del 20% a las 2 horas de cultivo a casi el 70% a las 8 horas. En el último tiempo la apoptosis en todas las condiciones es similar.

## Resultados

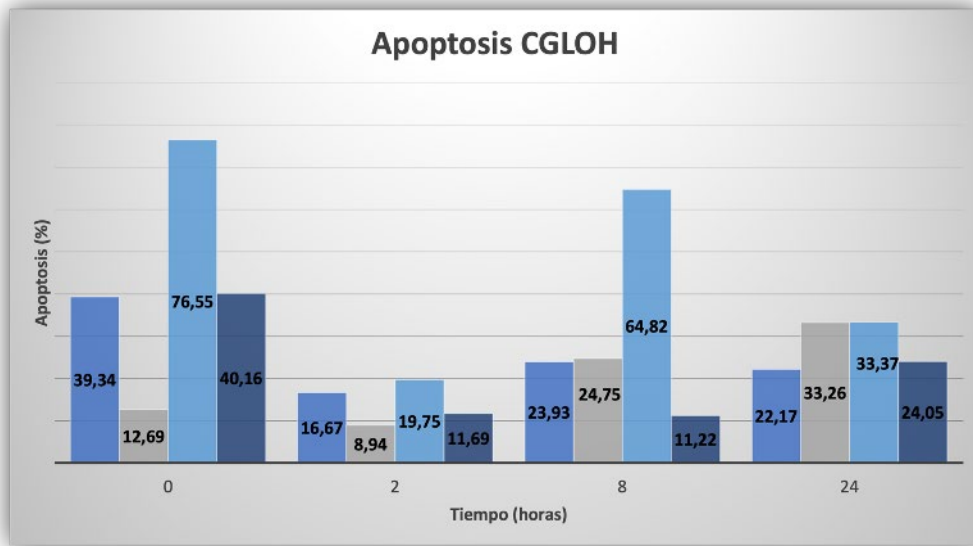


Figura 58: Apoptosis de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adición de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Apoptosis se define como el % de células apoptóticas con respecto al número total de células iniciales).

La muerte de las CGLOH, aumenta de forma significativa en todos los casos desde el inicio del cultivo a las 2 horas. Esta muerte permanece constante a lo largo del tiempo, excepto en el caso de las CGLOH en presencia del tóxico y de MSCMO donde disminuye ligeramente del a las 8 horas.

## Resultados

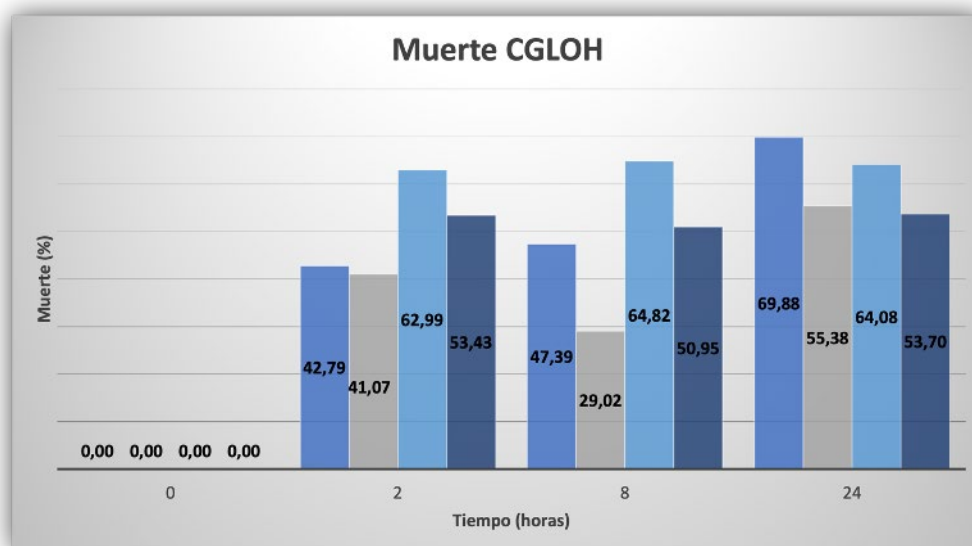


Figura 59: M Muerte de las Células de la Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin adicción de tóxico (AZUL OSCURO); con adicción del tóxico (Peroxinitrito) (CELESTE), en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) (GRIS), en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) (AZUL CLARO) y estudiado a diferentes tiempos (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas). (Muerte se define como el % de células muertas con respecto al número total de células iniciales).

### Según el tipo celular

Cuando cultivas las CGLOH solas, la viabilidad de las mismas disminuye del primer al segundo tiempo de cultivo, permanece estable a las 2 horas y a las 8 horas, para volver a disminuir ligeramente a las 24 horas. La apoptosis disminuye también del primer al segundo tiempo para sufrir un ligero incremento del tercer al cuarto tiempo de cultivo celular, es decir, a las 24 horas. La muerte aparece a las 2 horas, y permanece estable durante todo el cultivo.

## Resultados

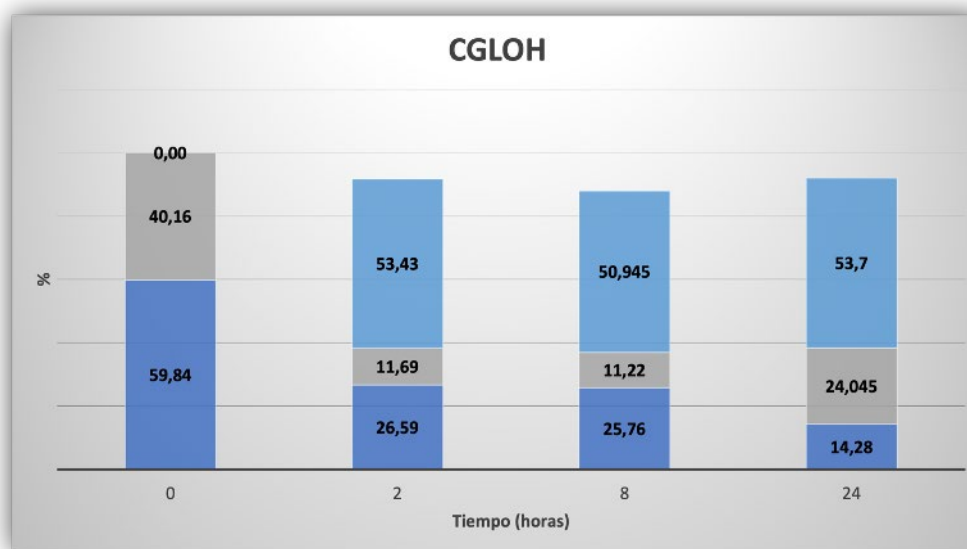


Figura 60: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Granulosa Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) sin tóxico a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas).

Al cultivar las CGLOH en presencia del tóxico (Glioxal) la viabilidad de las mismas disminuye drásticamente del primer al segundo tiempo de cultivo, para luego permanecer estable a medida que éste avanza. La apoptosis disminuye también del primer al segundo tiempo de cultivo, sufre un incremento considerable a las 8 horas y vuelve a disminuir a las 24. En cambio, la muerte aparece muy incrementada en el segundo tiempo de cultivo, a las 2 horas, y permanece estable a medida que avanza el mismo.

## Resultados

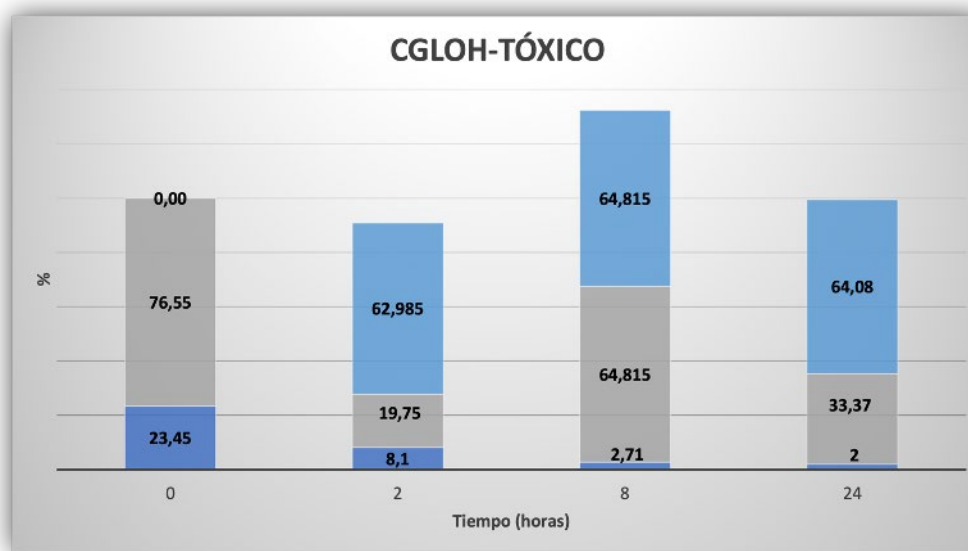


Figura 61: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Granulosas Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia del tóxico (Glioxal) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas).

Al cultivar las CGLOH en presencia del tóxico (Glioxal) y de las Células de la CGPE, la viabilidad de las mismas disminuye del primer al segundo tiempo de cultivo, permanece estable a las 2 y a las 8 horas y vuelve a disminuir a las 24 horas de cultivo. La apoptosis disminuye ligeramente a las 2 horas, para volver a aumentar ligeramente a las 8 horas. En cambio, la muerte aparece a las 2 horas, permanece estable en el segundo y tercer tiempo y sufre un incremento significativo a las 24 horas de cultivo.

## Resultados

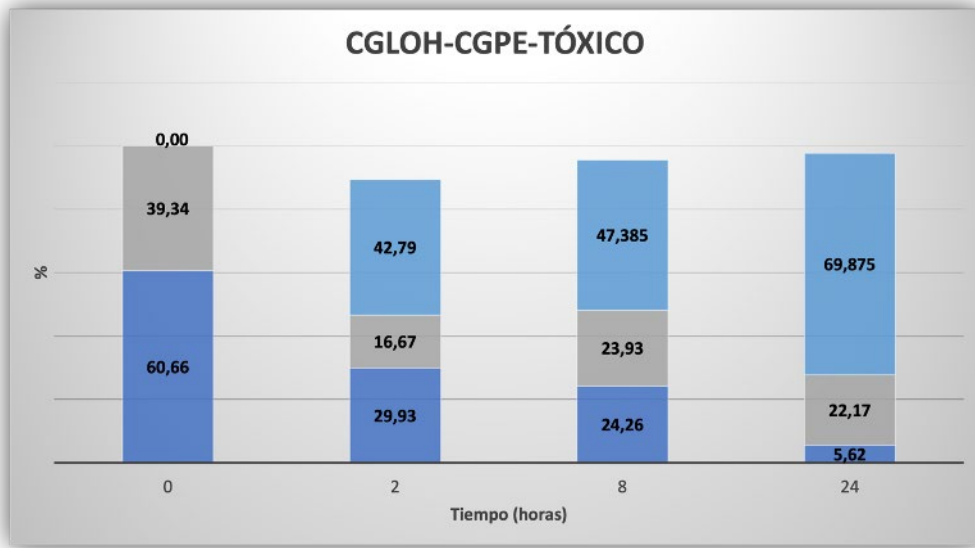


Figura 62: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Granulosas Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia de las Células de la Granulosa Progenitoras Expandidas (CGPE) y del tóxico (Glioxal) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas).

Cuando cultivamos las Células de la Granulosa Luteinizadas (CGLOH) en presencia del tóxico (Glioxal) y de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO), la viabilidad de las mismas disminuye ligeramente del primer al segundo tiempo de cultivo, permanece estable a las 2 y a las 8 horas y vuelve a disminuir a las 24 horas de cultivo. La apoptosis sufre un incremento a las 8 y a las 24 horas de cultivo. La muerte aparece a las 2 horas, disminuye ligeramente a las 8 horas de cultivo y vuelve a sufrir un incremento a las 24 horas.

## Resultados

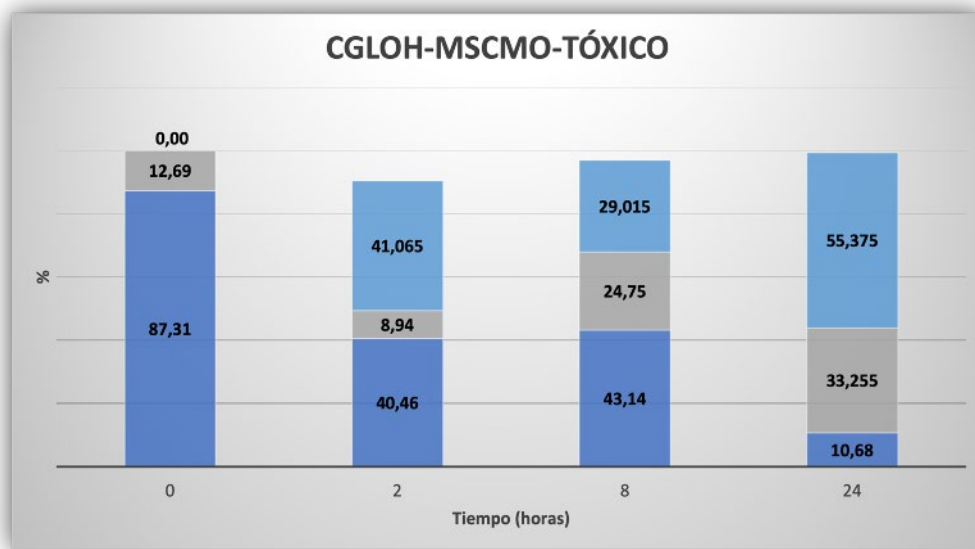


Figura 63: Viabilidad (AZUL OSCURO), apoptosis (GRIS) y muerte (AZUL CLARO) de las Granulosas Luteinizadas de Ovario Humano (CGLOH) en presencia de las Células Mesenquimales de Médula Ósea (MSCMO) y del tóxico (Glioxal) a diferentes tiempos de cultivo (Tiempo 0, a las 2 horas, a las 8 horas y a las 24 horas).

# DISCUSIÓN

## 8. DISCUSIÓN

Las células de la granulosa luteinizada utilizadas en el presente estudio derivan de los restos de celulares presentes en el líquido folicular y del corte de complejos cúmulo-corona-ovocito obtenidos por medio de estimulación ovárica tanto de pacientes tratadas por infertilidad en el contexto de un programa clínico de Fecundación *In Vitro* (FIV) como de donantes de ovocitos con destino a uso reproductivo. La selección de pacientes infértiles tratadas con FIV y englobadas en un rango amplio de edad (entre 18 y 40 años) estuvo orientada por la intención de trabajar con lotes celulares similares a los que proporcionarían las pacientes de un entorno clínico habitual, con el fin de dotar al presente estudio, cercano a una evaluación de prueba de concepto, de cierta proyección clínica. Los estudios previos que han partido de lotes iniciales de células granulosas del mismo origen han aplicado criterios similares (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009).

El estudio de factibilidad destinado a la evaluación preliminar de los procedimientos de expansión y caracterización y a su modificación en caso necesario, se realizó con una fracción de las muestras disponibles, que en concreto procedían a 17 pacientes. Las muestras celulares utilizadas en esta fase constituían una parte de las cedidas por dichas pacientes, por lo que la fracción restante de las células cedidas fue empleada en la fase experimental propiamente dicha.

Los recuentos celulares de las muestras procedentes de pacientes de FIV y de donantes de ovocitos utilizados en la fase de evaluación de factibilidad y en la fase experimental fueron marcadamente

## Discusión

heterogéneos, como ponen de manifiesto la magnitud las desviaciones estándar y de los rangos intercuartílicos en relación con la media y de la mediana de las distribuciones. Este amplio rango de celularidades, determinado por las características de las pacientes y de los resultados de la estimulación, contribuyen a aproximar las condiciones en las que se han desarrollado los procedimientos experimentales a la variabilidad que caracteriza los escenarios clínicos. Además, ha permitido analizar la eficiencia de la expansión celular por medio de las ratios de expansión y del intervalo entre pases de cultivo partiendo de condiciones basales no homogéneas.

Esta heterogenidad celular, junto con consideraciones sobre las condiciones basales previas a la expansión de estudios previos (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009) (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009) y la necesidad de aplicar los procedimientos de expansión de forma homogénea, determinaron la decisión de criopreservar los lotes celulares, y de expandir conjuntamente las poblaciones celulares basales procedentes de distintas pacientes y/o donantes, de forma similar a la previamente publicada por los grupos precitados. La finalidad de este procedimiento fue asegurar una reserva celular suficiente para atender las necesidades impuestas por los diseños experimentales, así como para disminuir el posible efecto de la variabilidad biológica. Este sistema, de indudables ventajas conceptuales y logísticas, incrementó ligeramente la complejidad del proceso de acumulación celular, pues obligó a la depleción selectiva de células CD3+, con el objeto de evitar la reacción de inmunidad celular.

## Discusión

La elección aleatorizada de los alícuotas celulares frescas y descrogenizadas para cada ensayo de expansión tuvo por objeto no determinar el rendimiento de los cultivos a través de la utilización de las muestras con mayor celularidad, con el propósito último de analizar pragmáticamente la dinámica de la expansión celular. Esta medida, de la que no hemos hallado precedentes en la metodología de los estudios previos, podría haber tenido como alternativa la elección de conjuntos de alícuotas para su descongelación y expansión conjunta en función de su recuento celular basal, configurando así poblaciones basales para expansión dotadas de mayor uniformidad. Se prefirió la elección aleatoria para primar la compensación de la variabilidad biológica, a la que se añadió el interés por conocer si la celularidad basal se asociaba al rendimiento de la expansión de los cultivos.

La expansión de células que presenta primariamente o adquieren características propias de células mesenquimales pluripotentes es un paso clave para su aplicación en modelos experimentales de protección y regeneración tisular que aspiren a resultar clínicamente versátiles. Como señala una reciente revisión (McKee, 2017), la posible utilidad clínica de estas células requiere expandirlas hasta alcanzar los niveles de calidad y cantidad requeridos. Los métodos tradicionales de expansión, que son los aplicados en la metodología de este estudio, incluyen el cultivo en soportes físicos bidimensionales usando como soporte nutricional y metabólico soluciones de xenocompuestos bioextractivos o sintéticos. Las ventajas de estos sistemas incluyen su simplicidad y bajo coste, así como la facilidad para su estandarización. Como principales inconvenientes se han señalado la tendencia a la pérdida progresiva de clonalidad y de capacidad de diferenciación, y la

## Discusión

reducción la capacidad de proliferación a medida que se incrementa el número de pases.

Los experimentos destinados al análisis de la dinámica de expansión de las muestras CGLOH frescas mostraron una tendencia general a la expansión progresiva de moderada magnitud, con primer pase por confluencia total a los 10-25 días de cultivo. También se observó cierta heterogeneidad en la evolución de la celularidad evaluada en el primer pase, que se vio reducida en dos de las tres muestras. Este hallazgo se ha puesto en relación con la probable regresión de la población de células diferenciadas a las que los factores tróficos añadidos al medio de expansión celular no logran rescatar de la apoptosis (Varras, Griva et al. 2012). El rendimiento relativo de la capacidad de expansión de las CGLOH frescas estuvo comprendido entre 0,5 y 40 múltiplos de la celularidad basal, con una media de 11,6 múltiplos. La magnitud de la diferencia entre la muestra con menor expansión, única que experimenta regresión de la celularidad, y la de mayor capacidad proliferativa podría estar en relación con la celularidad basal o con la regresión transitoria de la expansión en primer pase, aunque la limitación del número de muestras analizado con este propósito no permite concluir al respecto. La capacidad de expansión de la población inicial de CGLOH, cuya composición relativa se irá modificando según indican las variaciones en los perfiles inmunofenotípicos que se detallan más adelante, puede considerarse limitada en comparación con otras poblaciones de células que expresan marcadores propios de células mesenquimales pluripotentes .

Con respecto al rendimiento de la expansión de las CGLOH previamente criogenizadas, el comportamiento de las siete muestras estudiadas fue

## Discusión

similar: no se apreció asociación entre los recuentos celulares basales y los obtenidos en los días de primer y segundo pase. Considerando que los procesos de descongelación, siembra y cultivo fueron uniforme y paralelamente, la influencia de los mismos no parece determinar de forma relevante la dinámica de expansión de las células criopreservadas, que estaría más relacionada con las capacidades tróficas de cada muestra. No obstante, el diseño de nuestro estudio no permite concluir al respecto. En seis de las siete muestras se observó expansión de la población celular inicial en el recuento realizado en el segundo pase de cultivo, con ratios comprendidos entre 6 y 16 múltiplos de los valores basales.

El análisis de la proliferación celular en cultivo por medio de recuento celular y de las ratios de expansión de células frescas y criopreservadas identifica, según nuestros resultados, un comportamiento similar. No obstante, considerando la reducción de la celularidad absoluta, que reduce en más del 50% las células viables y susceptibles de expansión, el rendimiento de expansión absoluto de las de las CGLOH resulta reducida por la criopreservación previa.

La rentabilidad cuantitativa de los procesos de expansión de poblaciones celulares con características de células multipotentes aplicables en estrategias de protección y/o regeneración tisular constituye un punto clave en el análisis de factibilidad de estos procesos. La utilización de métodos de cultivo bidimensional clásicos para la expansión celular, y en concreto para la de células con características de MSC se considera poco eficiente para la producción masiva. Los sistemas de cultivo en soportes bidimensionales tienden a favorecer la aparición de alteraciones morfológicas celulares, y su uso

## Discusión

se asocia a patrones de diferenciación heterogénea y parcial de las poblaciones celulares cultivadas. En comparación con estos, los sistemas de cultivo tridimensional proporcionan una mayor eficiencia de expansión, por lo que resultan de elección en la producción celular de alta escala. Nuestro estudio ha aplicado métodos de expansión celular básica, destinados a identificar la subpoblación inicial de CGLOH con características de MSC y a verificar de forma exploratoria su dinámica de expansión, que no ha sido objeto de análisis previos. Por otro lado, el análisis de los fenómenos de diferenciación espontánea y del establecimiento de relaciones funcionales intercelulares y con la matriz extracelular no forman parte de los objetivos del estudio. La eficiencia de la expansión de las poblaciones de las CGLOH con características de MSC por medio de cultivo en estructuras tridimensionales o a través del uso de biorreactores representa una línea e investigación futura de indudable interés .

Las primeras descripciones de células ováricas de mamíferos con rasgos propios de célula progenitora son relativamente recientes: fueron identificadas a finales de la década de los 2000 en epitelio superficial ovárico humano y de varias especies de mamíferos , en células de la teca ovárica humana y en estroma ovárico murino (Gong 2010).

Las CGLOH, de fácil acceso a través de los programas clínicos de fecundación *in vitro*, constituyen un modelo muy utilizado en el estudio de los mecanismos de maduración del folículo ovárico y de las vías de señalización implicadas en la misma (Dzafic 2013). Se ha sugerido que esta población celular es probablemente un conjunto heterogéneo de células con diferentes grados de maduración y distintas propiedades

## Discusión

funcionales (Jozkowiak 2020), que incluye una fracción minoritaria de células con características propias de célula progenitora mesenquimal (Dominici 2006), y susceptible de expansión en condiciones de cultivo convencionales para células progenitoras. Este hallazgo, constatado en el presente estudio, está en consonancia con observaciones anteriores realizados tanto sobre células granulosas humanas (Takagi 2005) como sobre células granulosas de ovario porcino , murino (Takagi 2005) y bovino .

El grupo de Kossowska-Tomaszczuk describió por primera vez el aislamiento, tras cultivo *in vitro* prolongado, de una subpoblación de las CGLOH obtenidas a partir de aspiración ovocitaria en el contexto de programas clínicos de fecundación *in vitro*, y cultivadas en DMEM completo al que se añadió LIF y  $\beta$ -Mercaptoetanol. Este estudio inicial, al igual que los publicados posteriormente por el mismo grupo (Kossowska-Tomaszczuk 2013) y por otros autores , aplicó un método de caracterización de la población de CGLOH basado la comprobación de los estándares definidos por la *International Society for Cellular Therapy* (Dominici 2006), al que se añade la evaluación de la reducción progresiva de la expresión de marcadores funcionales propios de CGLOH en la población celular expandida mediante cultivo apropiado para células progenitoras.

La metodología de cultivo y expansión celular empleada por el presente estudio replicó inicialmente la propuesta por la publicación inicial de Kossowska-Tomaszczuk (Kossowska 2009). Este procedimiento consistía en el cultivo la fracción celular procedente del aspirado folicular en presencia de LIF y de  $\beta$ -mercaptoetanol como agente antioxidante estándar. Los referidos autores justifican la necesidad de incorporar el LIF al medio de cultivo por medio de un estudio previo de

## Discusión

viabilidad de los cultivos, que observó una escasa supervivencia de las GCLOH en cultivo carente de LIF. Por el contrario, la adición de LIF a los cultivos (tras la constatación de la existencia de receptores específicos) se asoció a una supervivencia celular muy prolongada, a aparición de adherencia celular al sustrato de cultivo, y una expresión de FSHR más persistente en el tiempo. Sin embargo, el uso del  $\beta\beta$ -mercaptoetanol (10 mM) y de otros aditivos al medio básico de cultivo (DMEM) se adopta como medida rutinaria.

Los ensayos preliminares destinados a definir la metodología definitiva del presente estudio hallaron una relación clara entre la adición de  $\beta$ -mercaptoetanol al medio de cultivo a las concentraciones indicadas y la reducción drástica de la supervivencia celular, así como a la ausencia de adquisición de morfología mesenquimal, que no se apreció en ninguno de los cultivos. El uso de  $\beta$ -mercaptoetanol determinó además pérdida de la adherencia al sustrato y de la viabilidad celular. Una vez realizados los cultivos de la fase de análisis de factibilidad, y suponiendo que la exposición a  $\beta$ -mercaptoetanol podría generar un incremento de desnaturalización proteica en las células tratadas por su capacidad para separar puentes disulfuro, se decidió eliminar del medio y a asumir la pérdida de efecto antioxidante. Los cultivos carentes de este aditivo permitieron observar la morfología celular mesenquimal esperada, la adhesión al sustrato y la confluencia de los cultivos.

En consonancia con nuestras observaciones, los resultados de estudios previos indican que el cultivo durante más de 7 días de CGLOH en presencia de LIF determinan la progresiva desaparición de la morfología esferoidea característica, que se ve progresivamente sustituida por una morfología fusiforme, con conservación de la formación de uniones intercelulares y de adherencia al sustrato.

## Discusión

Al igual que en el estudio de Kossowska-Tomaszczuk, realizado sobre CGLOH nuestros experimentos obtuvieron la diferenciación selectiva a líneas mesenquimales específicas (adipogénica, condrogénica y osteogénica) mediante medios condicionados adecuados. El estudio de Mattioli aplica un modelo de diferenciación inducida en células granulosa animales obtenidos en fase folicular y lútea. Estas células fueron cultivadas en matrices tridimensionales poliméricas durante tres semanas en presencia de medios específicos de diferenciación osteogénica (DMEM suplementado con ácido ascórbico 50 $\mu$ M,  $\beta$ -glicerol fosfato 10 mM, dexametasona 0,2  $\mu$ M y suero fetal bovino reducido al 10%), e inyectadas posteriormente en la región dorsal de ratones inmunotolerantes. Estos autores confirmaron la expresión de marcadores de diferenciación osteogénica en los cultivos *in vitro*, por medio de la detección de actividad Fosfatasa Alcalina y expresión de genes de Osteocalcina y RUNX2, propios de actividad osteogénica. Además, mediante tinción argéntica de Von Kossa evidenciaron la existencia de mineralización de la matriz extracelular de los cultivos de células obtenidas a partir de la expansión de células granulosa. Estas células presentaban una clara expresión de marcadores de actividad osteogénica, que en contraposición resultó menos intensa y más tardía en los cultivos procedentes de la expansión de células granulosa no expuestas a la acción luteinizante. El examen de las áreas de inóculo en la región dorsal de los ratones inmunotolerantes de las poblaciones celulares porcinas expandidas reveló la presencia de depósitos de hidroxapatita, confirmando la viabilidad *in vivo* de estas células y su actividad osteogénica persistente. En nuestro estudio se detectaron de forma masiva depósitos intra y extracelulares de minerales de calcio con técnicas histológicas convencionales aceptadas para la

## Discusión

caracterización de la diferenciación osteogénica inducida, y sin recurrir al modelo de inóculo murino.

La observación de Mattioli respecto al distinto potencial de diferenciación inducida entre las células granulosas luteinizadas y las obtenidas en fase folicular tras estímulo gonadotrópico abre una vía de análisis específico. Estos autores sugieren que la acción de LH podría favorecer la expansión más eficiente de células con potencial pluripotente, aunque el perfil de expresión positiva (Sox2, Nanog y TERT) y negativa (OCT4) de marcadores de pluripotencialidad fue comparable en ambas poblaciones. Nuestro estudio no ha incluido experimentos específicos para evaluar la posible asociación entre la acción diferenciadora de la actividad LH y la susceptibilidad de las CGLOH expandidas para la diferenciación osteogénica inducida. La limitación básica que ha impedido incorporar estos diseños experimentales ha sido la inaccesibilidad a células granulosas humanas no luteinizadas.

Con el fin de identificar la subpoblación de CGLOH con capacidades de pluripotencialidad se detectaron, mediante citometría de flujo, los marcadores específicos propios de células pluripotentes de origen mesenquimal, así como los propios de la diferenciación celular específica de origen. Entre los escasos estudios previos al respecto, cabe destacar por su interés los realizados por Kossowska-Tomaszczuk, Varras y Mattioli. Estos tres análisis se basan en la evaluación evolutiva del perfil de expresión de marcadores de pluripotencialidad en cultivos *in vitro* de CG.

## Discusión

Según los resultados del estudio de Kossowska-Tomaszczuk el cultivo prolongado de CGLOH en presencia de LIF (Leukemia Inhibiting Factor) permite observar una desaparición progresiva de marcadores funcionales propios de CG diferenciadas (FSH-R y aromatasas p-450) y la positividad, mantenida durante todo el proceso de cultivo, de OCT4, marcador característico de pluripotencialidad de células epiteliales. Varras detectó expresión de OCT4 en el 48% de las pacientes estudiadas, mientras que la expresión de DAZL, otro marcador de estirpe germinal, fue negativa (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009). Estos resultados divergen los obtenidos por Mattioli, cuyas observaciones no detectaron expresión de OCT4 ni basalmente ni a lo largo del cultivo.

En el estudio de Kossowska-Tomaszczuk, las CGLOH con capacidad para expresar OCT4 resultaron también positivas para varios marcadores específicos de MSC CD29, CD44, CD90, CD105, CD117 y CD166 y negativas para CD73. Otra prueba adicional de su pluripotencialidad fue la diferenciación inducida a estirpes osteogénica, condrogénica y neurogénica.

Los marcadores específicos de pluripotencialidad en células de estirpe germinal estudiados por Kossowska-Tomaszczuk (Nanog, Vasa y Stellar) resultaron negativos en las células obtenidas por expansión de los cultivos iniciales de CGLOH. La expresión de Nanog, fue también estudiada por Mattioli, que detectó positividad desde la fase basal de los cultivos. Este autor identificó la positividad de otros dos marcadores de pluripotencialidad mesenquimal (SOX2 y TERT), que fue detectada igualmente en fase basal de cultivo.

## Discusión

Nuestros resultados confirman que las CGLOH presentan, tras cultivo prolongado, características propias de células mesenquimales de médula ósea y de tejido adiposo establecidos por la *ISCT*. Las células expandidas mediante cultivo mostraron consistentemente positividad para CD73, CD105 y CD90 y detección negativa de CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR. Nuestro protocolo de estudio añadió marcadores adicionales a los básicos recomendados por la *ISCT*, con la intención de mejorar la caracterización celular. Con este propósito se incorporó el análisis de marcadores positivos CD71, CD106, VEGF, CD184 y negativos CD117, CD31, CD271, CD133, CD3.

La pluripotencialidad de las CGLOH ha sido evaluada también aplicando metodologías de análisis de expresión génica diferencial. El grupo de *Dzafic* compara el perfil de expresión génica de las CG procedentes de aspiraciones foliculares de pacientes tratadas con FIV, con un control positivo constituido por MSCMO, y otro negativo, para el que se usaron fibroblastos de dermis humana. La sobreexpresión más intensa se detectó para IL10 y CD45, pero también en CD49f, que es una conocida molécula de adhesión considerada también marcador de diferenciación de las CGLOH. Dentro del grupo de genes sobre expresados se identificaron genes específicos de pluripotencialidad mesenquimal, asociados a pluripotencialidad, o implicados en líneas de diferenciación específica.

En consecuencia, la posibilidad de expansión selectiva de subpoblaciones celulares basales capaces de expresar marcadores propios de células pluripotentes de estirpe mesenquimal, establecida con anterioridad y replicada en nuestro estudio a través de métodos simplificados, es hallazgo previo y complementario a la demostración

## Discusión

de la aptitud de las CGLOH como material basal para la generación de iPSC. El grupo de Chuang (Chuang 2013) demostró la posibilidad de inducir iPSC a partir de CGLOH procedentes de programas clínicos de FIV-TE que fueron expandidas conjuntamente en condiciones de cultivo convencional similares a las aplicadas por nuestro estudio, y transfectadas sucesivamente con plásmidos retrovirales que contenían secuencias como OCT3/4, SOX2, KLF4 y MYC. Las células pluripotentes inducidas resultantes mostraron características morfológicas, dinámicas de crecimiento, necesidades tróficas y expresión de marcadores muy similares a las de las células pluripotentes embrionarias (ESC).

Nuestro trabajo ha comparado la expresión de genes relacionados con la memoria funcional de origen en CGPE, frente a la observada en CGLOH. Las primeras han mostrado una expresión significativamente menor de LHR, FSHR, CYP19A1, HSD3B2, HSD2B2 y AMH, comportándose de forma similar a como lo hacen las MSCMO, excepto con respecto a la expresión de AMH. A diferencia de lo observado respecto a otras expresiones génicas propias de la 'memoria funcional de origen', las CGPE mostraron una mayor expresión de AMH. El papel regulador de AMH en los procesos de diferenciación, proliferación y regulación tisular es bien conocido en el ámbito de la organogénesis embrionaria. La AMH, como el resto de los componentes de la familia de mediadores del TGF- $\beta$ , ejerce su señalización a través de receptores del tipo serín-treonín-quinasa de clases I y II, así como por medio de proteínas SMAD, receptores regulados por las mismas. Se ha señalado que el receptor de AMH tipo I podría corresponderse con receptores I a componentes de la familia de BMP (di Clemente, 2003), lo que podría representar una vía de conexión entre la expresión de AMH y el

## Discusión

incremento de expresión de actividades enzimáticas propias de células mesenquimales.

La expresión de genes relacionados con multipotencialidad de células progenitoras adultas hematopoyéticas observada en las CGPE ha sido análoga a la propia de las MSCMO. Las células expandidas a partir de CGLOH han mostrado incremento de la expresión de c-kit, Thy-1 y ENG en comparación con la población basal de origen. La expresión de genes relacionados con multipotencialidad de células progenitoras adultas mesenquimales, resultó además mayor en las CGPE y las MSCMO que en las CGLOH en todos los casos. En cambio, los genes relacionados con pluripotencialidad germinal no se expresaron en ninguno de los tres tipos celulares, hallazgo que resulta de nuevo coherente con los perfiles de expresión propios de células pluripotentes mesenquimales.

En relación a los genes con actividad citoprotectora, las CGPE presentan una mayor expresión de FGF2, EGF, IGF-1, SOD1, CAT y GLO 1; pero en cambio, y en contra de lo que se preveía, presentan menor expresión de HGF, ESR2 y BCL2.

En resumen, las CGPE presentan características funcionales diferenciadoras respecto de las CGLOH, que incluyen menor expresión de marcadores funcionales propios de CG y mayor de actividades relacionadas con la promoción de la proliferación celular, de la angiogénesis y de la protección frente a la apoptosis.

Al realizar un análisis gráfico de agrupamiento (PermutMatrix) para establecer un perfil de expresión génico global para los 3 tipos celulares con los que estamos trabajando, para las CGLOH, para las CGPE y para

## Discusión

las MSCMO, se encontró una mayor similitud entre los perfiles de expresión de CGLOH y de CGPE, como cabría esperar dado el origen de las células.

La evaluación de la capacidad protectora de nuestra población celular frente a citotoxicidad experimental, medida mediante viabilidad, apoptosis y muerte celular, nos permitió observar que las CGPE tienen efecto protector frente a la toxicidad celular ejercida sobre las CGLOH, y ejercen dicho efecto por medio de la síntesis de factores protectores frente a la apoptosis, inductores de la angiogénesis y promotores de la proliferación celular.

Tras someter a las CGLOH a una citotoxicidad experimental inducida tanto por peroxidación, usando Peroxinitrito como tóxico, y por especies reactivas de carbono, usando Glioxal, vemos que la viabilidad de estas células disminuye con el paso del tiempo en las diferentes condiciones de cultivo, pero es mayor cuando las CGLOH están en presencia de las CGPE o de las MSCMO, siendo además mayor cuando están en presencia de las MSCMO que cuando están en cocultivo con las CGPE.

Al medir apoptosis y muerte celular, cuantificando la expresión de Anexina V y Ioudoro de Propidio respectivamente mediante citometría de flujo, observamos que esta es mayor en las CGLOH solas que cuando están en presencia de las CGPE y de las MSCMO.

En cuanto a muerte celular se refiere, esta es menor cuando las CGLOH están en presencia de MSCMO únicamente cuando hablamos de peroxidación, mientras que, si se trata de estrés carbonílico, la muerte,

## Discusión

aunque aumenta en todos los supuestos, es menor cuando las CGLOH están en presencia de CGPE y de MSCMO que cuando están solas.

Según los resultados obtenidos y tras realizar los experimentos pertinentes, vemos que en nuestro estudio se cumplen las hipótesis planteadas:

- 1) El cultivo prolongado de CGLOH en presencia de LIF permite la expansión de la población inicial de CGP basalmente existentes, y la reducción progresiva por apoptosis de la población de CGLOH. Las CGP así expandidas, expresan marcadores de propios de célula mesenquimal pluripotente y ausencia de marcadores de pluripotencialidad embrionaria, y son susceptibles de diferenciación selectiva a líneas mesenquimales específicas, adipogénica, condrogénica, osteogénica, por medio de promotores adecuados.
- 2) Las Células de la CGPE presentan características funcionales diferenciadoras respecto de las CGLOH, que incluyen menor expresión de marcadores funcionales propios de CG (LHr, actividad aromatasas, actividad HSD3B2), y mayor de actividades relacionadas con la promoción de la proliferación celular, de la angiogénesis y de la protección frente a la apoptosis (HGF, VEGF, IGF-1, FGF-b, bax y bcl-2).
- 3) El cocultivo con CGPE reduce la apoptosis y la muerte celular inducida de las CGLOH inducidas por toxicidad experimental con Peroxinitrito, en comparación con la observada en cultivos de CGLOH sin adición de CGPE. Esta hipótesis no se cumple totalmente, ya que este parámetro aumenta ligeramente con el paso del tiempo en las CGLOH cuando están en presencia de las MSCMO. En el caso de la toxicidad experimental inducida por

## **Discusión**

especies reactiva de carbono tanto la apoptosis como la muerte celular es mayor en las CGLOH por si solas que cuando están en presencia de las CGPE y de MSCMO.

Durante la realización de este estudio, se presentaron una serie de limitaciones, como fueron la baja celularidad obtenida de las pacientes incluidas en el estudio y el tener que criopreservar todas las muestras, con la consiguiente muerte celular post descongelación que este proceso conlleva.

## **PLANTEAR PROYECCIONES FUTURAS**

### **Protección frente a citotoxicidad farmacológica**

La toxicidad germinal mediada por citotóxicos, representa un modelo clásico de pérdida de capacidad reproductiva como terapia sistémica cuya implicación es imperativa para el control de gran número de enfermedades oncológicas y de enfermedades autoinmunes. La progresiva mejora de la supervivencia y de la calidad de vida de los pacientes quimio expuestos ha generado una reciente sensibilidad hacia las posibilidades de prevención y tratamiento del fallo germinal quimio inducido. La pérdida de reserva funcional ovárica causada por la quimioterapia está en relación con el tipo y dosis del agente administrado, así como la edad de la paciente en el momento de la exposición. Desgraciadamente los agentes quimioterápicos más comúnmente aplicados suelen ser también los de mayor toxicidad germinal, como ocurre con los agentes alquilantes. Diferentes estudios señalan que la pérdida folicular inducida por Ciclofosfamida tiene su origen en la capacidad de este fármaco para activar la apoptosis celular

## **Discusión**

de CG y ovocitos, con la consiguiente pérdida de unidades foliculares (Oki, Ono et al. 2012).

La respuesta de las CG y de las células germinales a los efectos citotóxicos de los agentes quimioterápicos está mediada por un gran número de vías metabólicas, sobre las que podrían ensayarse estrategias de prevención de la toxicidad germinal quimio inducida.

### **Mecanismos de protección celular**

En los últimos años ha habido un interés creciente en el posible uso de la medicina regenerativa y las células madre adultas, particularmente las derivadas de médula ósea (MSCMO), en combinación con el deterioro de órganos y tejidos relacionado con la edad. Gran parte del conocimiento actual sobre la biología de las células madre adultas deriva de estudios en los cuales las células madre o progenitoras fueron evaluadas por su habilidad para mejorar la función de órganos en enfermedades o lesiones (Bagheripour, Zavareh et al. 2017) (Hoang, Ho et al. 2019), o bien, en estudios in vitro en los cuales las MSCMO son capaces de diferenciarse en diferentes líneas celulares si se exponen a medios condicionados específicas de cada línea (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009).

El eje reproductor femenino proporciona un modelo excelente para entender la degeneración que se produce en los órganos con la edad, ya que los ovarios experimentan una disminución funcional y fallan a una edad relativamente temprana (Varras, Griva et al. 2012). En un estudio realizado en ratón, se usó el sistema reproductor femenino como modelo para investigar si la disminución fisiológica en la función del órgano con la edad podía posponerse mediante el uso de MSCMO. Los

## **Discusión**

resultados mostraron que una infusión mensual de MSCMO, sostenía la función del eje reproductor durante una edad cronológica avanzada. La infusión de las MSCMO procedentes de donantes jóvenes fue efectiva y permitía el mantenimiento de la función reproductiva del órgano sólo si se administraban a una edad en la que el órgano aún era funcional .

Plantearse estrategias de este tipo es lo que nos ha llevado a pensar en el uso de las CGPE, por su semejanza con las MSC obtenidas de otros tejidos, en pacientes infértiles y así lograr una mejora del desarrollo folicular y con ello una mejora de la fertilidad de estas pacientes.

## **Regeneración tisular**

La regeneración tisular u orgánica, representada en su máxima expresión por creación de órganos bioartificiales ha sido abordada experimentalmente a partir del desarrollo de las técnicas de ingeniería tisular *in vivo* e *in vitro*, y ha adquirido especial interés a partir del conocimiento de las propiedades de biointegración de las MSC.

Los modelos más evaluados son los de regeneración de tejido cardiaco afectado por lesión o necrosis isquémica mediante el uso de MSCMO, o inducidas desde MSC (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009). Para estudiar las posibilidades de regeneración tisular y funcional del miocardio infartado se han desarrollado modelos experimentales de parches de células progenitoras soportadas en matrices sintéticas acelulares, así como ensayos de recelularización de órgano completo a partir de matrices conjuntivas acelulares obtenidas mediante descelularización de corazones íntegros (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009).

## Discusión

En modelos de lesión tisular miocárdica in vivo, se ha sugerido que los mecanismos inflamatorios desencadenados por la isquemia constituirían la señalización que determina la integración preferente de las células progenitoras exógenas en el lecho lesional (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009). En los modelos de órgano completo descelularizado, el control de la distribución espacial de las células pluripotentes exógenas en la matriz conjuntiva acelular podría ser ejercido por ciertas proteínas estructurales como colágeno V y laminina, así como por moléculas de adhesión como la fibronectina, especialmente abundantes en elementos estructurales como las membranas basales de los epitelios. Estos componentes tisulares son a la vez soporte arquitectural de los tejidos e interfases de relación entre componentes conjuntivos y epiteliales de los mismos, como ocurre en el folículo de la cortical ovárica.

La aplicación de la terapia celular por medio de células progenitoras a la regeneración del folículo ovárico, así como su protección frente a la atresia inducida por apoptosis fisiológica o por efecto de noxas, parece un enfoque notablemente análogo al anterior, aunque presenta notables diferencias. En primer lugar, los elementos celulares del folículo ovárico son somáticos, Células de la Teca (Kossowska-Tomaszczuk, De Geyter et al. 2009) y CG, y germinales, ovocito. Las células de los compartimentos tecal y granuloso del folículo son de estirpe conjuntiva en el primer caso, y epitelial en el segundo. Por otro lado, su disposición espacial en el folículo desde las fases iniciales de su crecimiento y diferenciación constituye un patrón de organización morfofuncional relativamente sencilla, aunque necesaria para la compleja serie de interrelaciones metabólicas y de señalización celular que se establecen entre las mismas por medio de mecanismos endocrinos, paracrinos y autocrinos.

## Discusión

La matriz extracelular ovárica está constituida por diferentes componentes entre de los que destacan varios tipos de colágeno, junto con otras moléculas también capaces de modular procesos funcionales ováricos tales como la foliculogénesis y la luteinización (Varras, Griva et al. 2012). Diferentes estudios han mostrado que tanto el colágeno tipo I como el tipo IV, presentes en la lámina basal y en la granulosa folicular respectivamente, así como otras proteínas tales como la laminina son capaces de interactuar con las CG circundantes por medio de las integrinas que estas últimas expresan en su membrana. Estos datos permitirían formular hipótesis sobre la capacidad de la matriz extracelular ovárica para señalar procesos de orientación, proliferación e incorporación tisular de CG incorporadas a la estructura folicular. En el mencionado estudio de Takehara, la inmunolocalización de las MSCMO murinas utilizadas como terapia celular protectora frente a la quimio toxicidad inducida por fosforamida demostró que se hallaban presentes tan solo en la teca de los folículos de los ovarios trasplantados y no en su capa granulosa.

La biointegración de elementos celulares pluripotentes con un posible efecto regenerativo o protector deberían por tanto reconocer señales específicas de tropismo, como de estímulo de la diferenciación funcional específica. Algunas evidencias sugieren que las MSC trasplantadas en el ovario murino se disponen fundamentalmente en el estroma conjuntivo, y no son detectables en el componente granuloso de los folículos al término de 8 semanas de cultivo, lo cual no impide un claro efecto protector del trasplante contra la toxicidad experimental inducida con Ciclofosfamida. En caso de existir, este tropismo podría estar mediado por señales moleculares expresadas por células conjuntivas diferenciadas, como las tecaes, o presentes en la matriz

## **Discusión**

extracelular. En todo caso, la información sobre los mecanismos reguladores de la biointegración de las células pluripotentes en el tejido ovárico humano reviste un indudable interés y no ha sido aún analizada.



# CONCLUSIONES

## 9. CONCLUSIONES

- 1) El cultivo de CGLOH descriogenizadas constituye un modelo válido para el estudio de la expansión y diferenciación de células progenitoras presentes en la granulosa folicular humana.
  
- 2) El cultivo prolongado de CGLOH permite identificar, como parte del conjunto celular heterogéneo resultante, una subpoblación de células con morfología mesenquimal.
  
- 3) Las CGPE así expandidas, expresan marcadores de propios de célula mesenquimal pluripotente y ausencia de marcadores de pluripotencialidad embrionaria, y son susceptibles de diferenciación selectiva a líneas mesenquimales específicas.
  
- 4) Las CGPE presentan menor expresión de marcadores funcionales propios de CGLOH y mayor de actividades relacionadas con la promoción de la proliferación celular, de la angiogénesis y de la protección frente a la apoptosis.
  
- 5) El cocultivo de CGLOH junto con CGPE reduce la apoptosis y la muerte celular inducida por toxicidad experimental tanto con Peroxinitrito como con especies reactiva de carbono (Gloxal).

# BIBLIOGRAFÍA

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abir, R., B. Fisch, S. Jin, M. Barnnet, S. Freimann, R. Van den Hurk, D. Feldberg, S. Nitke, H. Krissi and A. Ao (2004). "Immunocytochemical detection and RT-PCR expression of leukaemia inhibitory factor and its receptor in human fetal and adult ovaries." Mol Hum Reprod **10**(5): 313-319.
- Abulafia, O. and D. M. Sherer (2000). "Angiogenesis of the ovary." Am J Obstet Gynecol **182**(1 Pt 1): 240-246.
- Ackert, C. L., J. E. Gittens, M. J. O'Brien, J. J. Eppig and G. M. Kidder (2001). "Intercellular communication via connexin43 GAP junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse." Dev Biol **233**(2): 258-270.
- Alison, M. R., R. Poulson, R. Jeffery, A. P. Dhillon, A. Quaglia, J. Jacob, M. Novelli, G. Prentice, J. Williamson and N. A. Wright (2000). "Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells." Nature **406**(6793): 257.
- Andersen, C. Y. and D. Ezcurra (2014). "Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins." Reprod Biol Endocrinol **12**: 128.
- Ashkenazi, H., X. Cao, S. Motola, M. Popliker, M. Conti and A. Tsafiriri (2005). "Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response." Endocrinology **146**(1): 77-84.
- Attaran, M. and G. P. Gidwani (2003). "Adolescent endometriosis." Obstet Gynecol Clin North Am **30**(2): 379-390.
- Bagheripour, N., S. Zavareh, M. T. Ghorbanian, S. H. Paylakhi and S. R. Mohebbi (2017). "Changes in the expression of OCT4 in mouse ovary during estrous cycle." Vet Res Forum **8**(1): 43-48.

## Bibliografía

- Baranao, J. L. and J. M. Hammond (1984). "Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells." Biochem Biophys Res Commun **124**(2): 484-490.
- Basta, G. (2008). "Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications." Atherosclerosis **196**(1): 9-21.
- Belli, M. and S. Shimasaki (2018). "Molecular Aspects and Clinical Relevance of GDF9 and BMP15 in Ovarian Function." Vitam Horm **107**: 317-348.
- Berisha, B., H. H. Meyer and D. Schams (2010). "Effect of prostaglandin F2 alpha on local luteotropic and angiogenic factors during induced functional luteolysis in the bovine corpus luteum." Biol Reprod **82**(5): 940-947.
- Berisha, B. and D. Schams (2005). "Ovarian function in ruminants." Domest Anim Endocrinol **29**(2): 305-317.
- Beyer, E. C., D. L. Paul and D. A. Goodenough (1990). "Connexin family of GAP junction proteins." J Membr Biol **116**(3): 187-194.
- Bieback, K., S. Kern, H. Kluter and H. Eichler (2004). "Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." Stem Cells **22**(4): 625-634.
- Boland, N. I. and R. G. Gosden (1994). "Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles." J Reprod Fertil **101**(2): 369-374.
- Bondy, C. and J. Zhou (1993). "Insulin-like growth factor system gene expression in the postpubertal human ovary." Ann N Y Acad Sci **687**: 65-76.
- Borgbo, T., B. B. Povlsen, C. Y. Andersen, R. Borup, P. Humaidan and M. L. Grondahl (2013). "Comparison of gene expression profiles in granulosa and cumulus cells after ovulation induction with either human chorionic gonadotropin or a gonadotropin-releasing hormone agonist trigger." Fertil Steril **100**(4): 994-1001.

## Bibliografía

- Borowczyk, E., M. L. Johnson, J. J. Bilski, P. P. Borowicz, D. A. Redmer, L. P. Reynolds and A. T. Grazul-Bilska (2006). "Expression of GAP junctional connexins 26, 32, and 43 mRNA in ovarian preovulatory follicles and corpora lutea in sheep." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(10): 1011-1020.
- Breckwoldt, M., N. Selvaraj, D. Aharoni, A. Barash, I. Segal, V. Insler and A. Amsterdam (1996). "Expression of Ad4-BP/cytochrome P450 side chain cleavage enzyme and induction of cell death in long-term cultures of human granulosa cells." *Mol Hum Reprod* **2**(6): 391-400.
- Buckler, H. (2005). "The menopause transition: endocrine changes and clinical symptoms." *J Br Menopause Soc* **11**(2): 61-65.
- Buhring, H. J., S. Treml, F. Cerabona, P. de Zwart, L. Kanz and M. Sobiesiak (2009). "Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets." *Ann N Y Acad Sci* **1176**: 124-134.
- Butts, S., H. Riethman, S. Ratcliffe, A. Shaunik, C. Coutifaris and K. Barnhart (2009). "Correlation of telomere length and telomerase activity with occult ovarian insufficiency." *J Clin Endocrinol Metab* **94**(12): 4835-4843.
- Camp, T. A., J. O. Rahal and K. E. Mayo (1991). "Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary." *Mol Endocrinol* **5**(10): 1405-1417.
- Campbell, B. K. (1999). "The modulation of gonadotrophic hormone action on the ovary by paracrine and autocrine factors." *Anat Histol Embryol* **28**(4): 247-251.
- Caspar, D. L., D. A. Goodenough, L. Makowski and W. C. Phillips (1977). "GAP junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction." *J Cell Biol* **74**(2): 605-628.
- Cedrin-Durnerin, I., S. Bulwa, F. Herve, B. Martin-Pont, M. Uzan and J. N. Hugues (1996). "The hormonal flare-up following gonadotrophin-releasing

## Bibliografía

hormone agonist administration is influenced by a progestogen pretreatment." Hum Reprod **11**(9): 1859-1863.

Ciuffreda, M. C., G. Malpasso, P. Musaro, V. Turco and M. Gnechi (2016). "Protocols for in vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Chondrogenic and Adipogenic Lineages." Methods Mol Biol **1416**: 149-158.

Clement, F. and D. Monniaux (2013). "Multiscale modelling of ovarian follicular selection." Prog Biophys Mol Biol **113**(3): 398-408.

Colter, D. C., R. Class, C. M. DiGirolamo and D. J. Prockop (2000). "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3213-3218.

Couzinet, B., S. Brailly, P. Bouchard and G. Schaison (1992). "Progesterone stimulates luteinizing hormone secretion by acting directly on the pituitary." J Clin Endocrinol Metab **74**(2): 374-378.

Chandra, V., S. G. S. Phadnis, P. D. Nair and R. R. Bhonde (2009). "Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells." Stem Cells **27**(8): 1941-1953.

Chang, H. M., J. C. Cheng and P. C. Leung (2013). "Theca-derived BMP4 and BMP7 down-regulate connexin43 expression and decrease GAP junction intercellular communication activity in immortalized human granulosa cells." J Clin Endocrinol Metab **98**(3): E437-445.

Chang, H. M., J. C. Cheng, E. Taylor and P. C. Leung (2014). "Oocyte-derived BMP15 but not GDF9 down-regulates connexin43 expression and decreases GAP junction intercellular communication activity in immortalized human granulosa cells." Mol Hum Reprod **20**(5): 373-383.

Chegini, N. and R. S. Williams (1992). "Immunocytochemical localization of transforming growth factors (TGFs) TGF-alpha and TGF-beta in human ovarian tissues." J Clin Endocrinol Metab **74**(5): 973-980.

**Bibliografía**

- Chen, J., S. Torcia, F. Xie, C. J. Lin, H. Cakmak, F. Franciosi, K. Horner, C. Onodera, J. S. Song, M. I. Cedars, M. Ramalho-Santos and M. Conti (2013). "Somatic cells regulate maternal mRNA translation and developmental competence of mouse oocytes." Nat Cell Biol **15**(12): 1415-1423.
- Chen, Y. C., H. M. Chang, J. C. Cheng, H. D. Tsai, C. H. Wu and P. C. Leung (2015). "Transforming growth factor-beta1 up-regulates connexin43 expression in human granulosa cells." Hum Reprod **30**(9): 2190-2201.
- Christenson, L. K. and R. L. Stouffer (1997). "Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles." J Clin Endocrinol Metab **82**(7): 2135-2142.
- Chun, S. Y., K. M. Eisenhauer, S. Minami, H. Billig, E. Perlas and A. J. Hsueh (1996). "Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor." Endocrinology **137**(4): 1447-1456.
- Chun, S. Y., K. M. Eisenhauer, S. Minami and A. J. Hsueh (1996). "Growth factors in ovarian follicle atresia." Semin Reprod Endocrinol **14**(3): 197-202.
- Daheron, L., S. L. Opitz, H. Zaehres, M. W. Lensch, P. W. Andrews, J. Itskovitz-Eldor and G. Q. Daley (2004). "LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells." Stem Cells **22**(5): 770-778.
- Das, S., R. Chattopadhyay, S. Ghosh, S. Ghosh, S. K. Goswami, B. N. Chakravarty and K. Chaudhury (2006). "Reactive oxygen species level in follicular fluid--embryo quality marker in IVF?" Hum Reprod **21**(9): 2403-2407.
- Dazzi, F., R. Ramasamy, S. Glennie, S. P. Jones and I. Roberts (2006). "The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis." Blood Rev **20**(3): 161-171.

**Bibliografía**

deMoura, M. D., D. Choi, E. Y. Adashi and D. W. Payne (1997). "Insulin-like growth factor-I-mediated amplification of follicle-stimulating hormone-supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: enhancement of steroidogenic enzyme activity and expression." Biol Reprod **56**(4): 946-953.

Devroey, P., B. C. Fauser, K. Diedrich and G. Evian Annual Reproduction Workshop (2009). "Approaches to improve the diagnosis and management of infertility." Hum Reprod Update **15**(4): 391-408.

Dewailly, D., G. Robin, M. Peigne, C. Decanter, P. Pigny and S. Catteau-Jonard (2016). "Interactions between androgens, FSH, anti-Mullerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary." Hum Reprod Update **22**(6): 709-724.

Diamanti-Kandarakis, E., I. Katsikis, C. Piperi, E. Kandaraki, A. Piouka, A. G. Papavassiliou and D. Panidis (2008). "Increased serum advanced glycation end-products is a distinct finding in lean women with polycystic ovary syndrome (PCOS)." Clin Endocrinol (Oxf) **69**(4): 634-641.

Diamanti-Kandarakis, E., C. Piperi, P. Korkolopoulou, E. Kandaraki, G. Levidou, A. Papalois, E. Patsouris and A. G. Papavassiliou (2007). "Accumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats." J Mol Med (Berl) **85**(12): 1413-1420.

Diamanti-Kandarakis, E., C. Piperi, E. Patsouris, P. Korkolopoulou, D. Panidis, L. Pawelczyk, A. G. Papavassiliou and A. J. Duleba (2007). "Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries." Histochem Cell Biol **127**(6): 581-589.

Dizerega, G. S. and G. D. Hodgen (1981). "FOLLICULOGENESIS IN THE PRIMATE OVARIAN CYCLE." Endocrine Reviews **2**(1): 27-49.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The

## Bibliografía

International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.

Dzafic, E., M. Stimpfel, S. Novakovic, P. Cerkovnik and I. Virant-Klun (2014). "Expression of mesenchymal stem cells-related genes and plasticity of aspirated follicular cells obtained from infertile women." Biomed Res Int **2014**: 508216.

Dzafic, E., M. Stimpfel and I. Virant-Klun (2013). "Plasticity of granulosa cells: on the crossroad of stemness and transdifferentiation potential." J Assist Reprod Genet **30**(10): 1255-1261.

Eaton, P. (2006). "Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures." Free Radic Biol Med **40**(11): 1889-1899.

Elvin, J. A., C. Yan, P. Wang, K. Nishimori and M. M. Matzuk (1999). "Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary." Mol Endocrinol **13**(6): 1018-1034.

Fang, J., H. Xu, C. Yang, S. Kayarthodi, R. Matthews, V. N. Rao and E. S. Reddy (2014). "Molecular Mechanism of Activation of Transforming Growth Factor Beta/Smads Signaling Pathway in Ets Related Gene-Positive Prostate Cancers." J Pharm Sci Pharmacol **1**(1): 82-85.

Fang, J., H. Xu, C. Yang, S. Morsalin, S. Kayarthodi, K. Rungsriruriyachai, U. Gunnal, B. McKenzie, V. N. Rao and E. S. Reddy (2014). "Ets Related Gene and Smad3 Proteins Collaborate to Activate Transforming Growth Factor-Beta Mediated Signaling Pathway in ETS Related Gene-Positive Prostate Cancer Cells." J Pharm Sci Pharmacol **1**(3): 175-181.

Fatemi, H. M. and I. Van Vaerenbergh (2015). "Significance of premature progesterone rise in IVF." Curr Opin Obstet Gynecol **27**(3): 242-248.

Fehrer, C. and G. Lepperdinger (2005). "Mesenchymal stem cell aging." Exp Gerontol **40**(12): 926-930.

## Bibliografía

- Fitzpatrick, S. L., D. L. Carlone, R. L. Robker and J. S. Richards (1997). "Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge." Steroids **62**(1): 197-206.
- Fleming, T. H., P. M. Humpert, P. P. Nawroth and A. Bierhaus (2011). "Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process: a mini-review." Gerontology **57**(5): 435-443.
- Fraser, H. M. and S. F. Lunn (2000). "Angiogenesis and its control in the female reproductive system." Br Med Bull **56**(3): 787-797.
- Fried, G. and H. Wramsby (1998). "Increase in transforming growth factor beta1 in ovarian follicular fluid following ovarian stimulation and in-vitro fertilization correlates to pregnancy." Hum Reprod **13**(3): 656-659.
- Fu, X., Y. He, C. Xie and W. Liu (2008). "Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage." Cytotherapy **10**(4): 353-363.
- Fujii, E. Y. and M. Nakayama (2010). "The measurements of RAGE, VEGF, and AGEs in the plasma and follicular fluid of reproductive women: the influence of aging." Fertil Steril **94**(2): 694-700.
- Fukuda, S., M. Orisaka, K. Tajima, K. Hattori and F. Kotsuji (2009). "Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells." J Ovarian Res **2**(1): 17.
- Gabler, C., A. Plath-Gabler, G. J. Killian, B. Berisha and D. Schams (2004). "Expression pattern of fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) system members in bovine corpus luteum endothelial cells during treatment with FGF-2, VEGF or oestradiol." Reprod Domest Anim **39**(5): 321-327.
- Gale, N. W. and G. D. Yancopoulos (1999). "Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development." Genes Dev **13**(9): 1055-1066.

## Bibliografía

Genazzani, A. D., C. Strucchi, M. Luisi, E. Casarosa, C. Lanzoni, E. Baraldi, F. Ricchieri, H. Mehmeti and A. R. Genazzani (2006). "Metformin administration modulates neurosteroids secretion in non-obese amenorrhoeic patients with polycystic ovary syndrome." Gynecol Endocrinol **22**(1): 36-43.

General Assembly of the World Medical, A. (2014). "World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects." J Am Coll Dent **81**(3): 14-18.

Gershon, E., V. Plaks and N. Dekel (2008). "GAP junctions in the ovary: expression, localization and function." Mol Cell Endocrinol **282**(1-2): 18-25.

Gill, V., V. Kumar, K. Singh, A. Kumar and J. J. Kim (2019). "Advanced Glycation End Products (AGEs) May Be a Striking Link Between Modern Diet and Health." Biomolecules **9**(12).

Gittens, J. E., K. J. Barr, B. C. Vanderhyden and G. M. Kidder (2005). "Interplay between paracrine signaling and GAP junctional communication in ovarian follicles." J Cell Sci **118**(Pt 1): 113-122.

Glick, A. B. (2004). "TGFbeta1, back to the future: revisiting its role as a transforming growth factor." Cancer Biol Ther **3**(3): 276-283.

Goede, V., G. Fleckenstein, M. Dietrich, R. G. Osmers, W. Kuhn and H. G. Augustin (1998). "Prognostic value of angiogenesis in mammary tumors." Anticancer Res **18**(3C): 2199-2202.

Gordon, J. D., S. Mesiano, C. J. Zaloudek and R. B. Jaffe (1996). "Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation." J Clin Endocrinol Metab **81**(1): 353-359.

Gospodarowicz, D. and K. K. Thakral (1978). "Production a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(2): 847-851.

## Bibliografía

- Gougeon, A. (1996). "Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses." Endocr Rev **17**(2): 121-155.
- Granot, I. and N. Dekel (1994). "Phosphorylation and expression of connexin-43 ovarian GAP junction protein are regulated by luteinizing hormone." J Biol Chem **269**(48): 30502-30509.
- Granot, I. and N. Dekel (2002). "The ovarian GAP junction protein connexin43: regulation by gonadotropins." Trends Endocrinol Metab **13**(7): 310-313.
- Grazul-Bilska, A. T., L. P. Reynolds, J. J. Bilski and D. A. Redmer (2001). "Effects of second messengers on GAP junctional intercellular communication of ovine luteal cells throughout the estrous cycle." Biol Reprod **65**(3): 777-783.
- Grove, J. E., E. Bruscia and D. S. Krause (2004). "Plasticity of bone marrow-derived stem cells." Stem Cells **22**(4): 487-500.
- Guthrie, H. D., W. M. Garrett and B. S. Cooper (1998). "Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells." Biol Reprod **58**(2): 390-396.
- Gutierrez, C. G., J. H. Ralph, E. E. Telfer, I. Wilmut and R. Webb (2000). "Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro." Biol Reprod **62**(5): 1322-1328.
- Hanahan, D. (1997). "Signaling vascular morphogenesis and maintenance." Science **277**(5322): 48-50.
- Harman, D. (2006). Free Radical Theory of Aging: An Update Increasing the Functional Life Span. Understanding and Modulating Aging. S. Rattan, P. Kristensen and B. F. C. Clark. **1067**: 10-21.
- Havelock, J. C., W. E. Rainey and B. R. Carr (2004). "Ovarian granulosa cell lines." Mol Cell Endocrinol **228**(1-2): 67-78.
- Hennet, M. L. and C. M. Combelles (2012). "The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation." Int J Dev Biol **56**(10-12): 819-831.

## Bibliografía

- Hillier, S. G. and M. Tetsuka (1997). "Role of androgens in follicle maturation and atresia." Baillieres Clin Obstet Gynaecol **11**(2): 249-260.
- Hirshfield, A. N. (1986). "PATTERNS OF H-3 THYMIDINE INCORPORATION DIFFER IN IMMATURE RATS AND MATURE, CYCLING RATS." Biology of Reproduction **34**(1): 229-235.
- Hirshfield, A. N. (1991). "Theca cells may be present at the outset of follicular growth." Biol Reprod **44**(6): 1157-1162.
- Hoang, S. N., C. N. Q. Ho, T. T. P. Nguyen, C. C. Doan, D. H. Tran and L. T. Le (2019). "Evaluation of stemness marker expression in bovine ovarian granulosa cells." Anim Reprod **16**(2): 277-281.
- Hoff, J. D., M. E. Quigley and S. S. Yen (1983). "Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation." J Clin Endocrinol Metab **57**(4): 792-796.
- Hofmann, S. M., H. J. Dong, Z. Li, W. Cai, J. Altomonte, S. N. Thung, F. Zeng, E. A. Fisher and H. Vlassara (2002). "Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse." Diabetes **51**(7): 2082-2089.
- Hsu, C. J., S. D. Holmes and J. M. Hammond (1987). "Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement." Biochem Biophys Res Commun **147**(1): 242-247.
- Huang, H., Y. Shi and F. Zhou (1996). "[Effects of assisted ovarian stimulation with leuprolide acetate on alterations of plasma estradiol levels and newly synthesized endometrial proteins]." Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi **31**(2): 103-106.
- Hugues, J. N. (2012). "Impact of 'LH activity' supplementation on serum progesterone levels during controlled ovarian stimulation: a systematic review." Hum Reprod **27**(1): 232-243.
- Hutz, R. J., D. J. Dierschke and R. C. Wolf (1990). "Role of estradiol in regulating ovarian follicular atresia in rhesus monkeys: a review." J Med Primatol **19**(6): 553-571.

## Bibliografía

Inagi, R. (2011). "Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress." Methods Enzymol **491**: 361-380.

Ito, M., T. Harada, M. Tanikawa, A. Fujii, G. Shiota and N. Terakawa (2001). "Hepatocyte growth factor and stem cell factor involvement in paracrine interplays of theca and granulosa cells in the human ovary." Fertil Steril **75**(5): 973-979.

Jakeman, L. B., J. Winer, G. L. Bennett, C. A. Altar and N. Ferrara (1992). "Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues." J Clin Invest **89**(1): 244-253.

Jang, K. S., K. S. Lee, S. H. Yang and S. S. Jeun (2010). "In vivo Tracking of Transplanted Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Murine Model of Stroke by Bioluminescence Imaging." J Korean Neurosurg Soc **48**(5): 391-398.

Jang, S., H. H. Cho, Y. B. Cho, J. S. Park and H. S. Jeong (2010). "Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin." BMC Cell Biol **11**: 25.

Jeppesen, J. V., S. G. Kristensen, M. E. Nielsen, P. Humaidan, M. Dal Canto, R. Fadini, K. T. Schmidt, E. Ernst and C. Yding Andersen (2012). "LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles." J Clin Endocrinol Metab **97**(8): E1524-1531.

Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-49.

Jiang, Y. H., B. Vaessena, T. Lenvik, M. Blackstad, M. Reyes and C. M. Verfaillie (2002). "Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain." Experimental Hematology **30**(8): 896-904.

## Bibliografía

- Jinno, M., M. Takeuchi, A. Watanabe, K. Teruya, J. Hirohama, N. Eguchi and A. Miyazaki (2011). "Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and achievement of pregnancy by assisted reproductive technology." Hum Reprod **26**(3): 604-610.
- Johnson, M. L., D. A. Redmer, L. P. Reynolds, J. J. Bilski and A. T. Grazul-Bilska (2002). "GAP junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone." Endocrine **18**(3): 261-270.
- Juengel, J. L. and K. P. McNatty (2005). "The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development." Hum Reprod Update **11**(2): 143-160.
- Kalea, A. Z., N. Reiniger, H. Yang, M. Arriero, A. M. Schmidt and B. I. Hudson (2009). "Alternative splicing of the murine receptor for advanced glycation end-products (RAGE) gene." FASEB J **23**(6): 1766-1774.
- Kamat, B. R., L. F. Brown, E. J. Manseau, D. R. Senger and H. F. Dvorak (1995). "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development." Am J Pathol **146**(1): 157-165.
- Kawai, T., T. Mihara, I. Kawashima, Y. Fujita, C. Ikeda, H. Negishi, J. S. Richards and M. Shimada (2012). "Endogenous acetaldehyde toxicity during antral follicular development in the mouse ovary." Reprod Toxicol **33**(3): 322-330.
- Keel, B. A., J. M. Hildebrandt, J. V. May and J. S. Davis (1995). "Effects of epidermal growth factor on the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in monolayer cultures of porcine granulosa cells." Endocrinology **136**(3): 1197-1204.
- Kidder, G. M. and A. A. Mhawi (2002). "GAP junctions and ovarian folliculogenesis." Reproduction **123**(5): 613-620.
- Kim, J. M., D. L. Boone, A. Auyeung and B. K. Tsang (1998). "Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is

## Bibliografía

associated with increased levels of Fas and Fas ligand in the rat ovary." Biol Reprod **58**(5): 1170-1176.

Kirillova, A., B. Martazanova, N. Mishieva and M. Semenova (2021). "Follicular waves in ontogenesis and female fertility." Biosystems **210**: 104558.

Knight, P. G. and C. Glister (2006). "TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development." Reproduction **132**(2): 191-206.

Kol, S. and E. Y. Adashi (1995). "Intraovarian factors regulating ovarian function." Curr Opin Obstet Gynecol **7**(3): 209-213.

Kossowska-Tomaszczuk, K. and C. De Geyter (2013). "Cells with stem cell characteristics in somatic compartments of the ovary." Biomed Res Int **2013**: 310859.

Kossowska-Tomaszczuk, K., C. De Geyter, M. De Geyter, I. Martin, W. Holzgreve, A. Scherberich and H. Zhang (2009). "The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles." Stem Cells **27**(1): 210-219.

Kossowska-Tomaszczuk, K., P. Pelczar, S. Guven, J. Kowalski, E. Volpi, C. De Geyter and A. Scherberich (2010). "A novel three-dimensional culture system allows prolonged culture of functional human granulosa cells and mimics the ovarian environment." Tissue Eng Part A **16**(6): 2063-2073.

Kyrou, D., M. Al-Azemi, E. G. Papanikolaou, P. Donoso, K. Tziomalos, P. Devroey and H. M. Fatemi (2012). "The relationship of premature progesterone rise with serum estradiol levels and number of follicles in GnRH antagonist/recombinant FSH-stimulated cycles." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **162**(2): 165-168.

Laborde, N., M. Carril, S. Cheviakoff, H. D. Croxatto, E. Pedroza and J. M. Rosner (1976). "The secretion of progesterone during the periovulatory period in women with certified ovulation." J Clin Endocrinol Metab **43**(5): 1157-1163.

## Bibliografía

- Lail-Trecker, M., R. Gulati and J. J. Peluso (1998). "A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in regulating normal and neoplastic cells of reproductive tissues." *J Soc Gynecol Investig* **5**(3): 114-121.
- Lee, H. J., K. S. Kim, I. H. Park and S. U. Kim (2007). "Human neural stem cells over-expressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model." *PLoS One* **2**(1): e156.
- Li, Q., J. E. Agno, M. A. Edson, A. K. Nagaraja, T. Nagashima and M. M. Matzuk (2011). "Transforming growth factor beta receptor type 1 is essential for female reproductive tract integrity and function." *PLoS Genet* **7**(10): e1002320.
- Lindeberg, M., K. Carlstrom, O. Ritvos and O. Hovatta (2007). "Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis." *Hum Reprod* **22**(2): 401-406.
- Linton, S., M. J. Davies and R. T. Dean (2001). "Protein oxidation and ageing." *Exp Gerontol* **36**(9): 1503-1518.
- Liu, T., Q. Y. Qin, J. X. Qu, H. Y. Wang and J. Yan (2020). "Where are the theca cells from: the mechanism of theca cells derivation and differentiation." *Chin Med J (Engl)* **133**(14): 1711-1718.
- Liu, X., P. Qiao, A. Jiang, J. Jiang, H. Han, L. Wang and C. Ren (2015). "Paracrine Regulation of Steroidogenesis in Theca Cells by Granulosa Cells Derived from Mouse Preantral Follicles." *Biomed Res Int* **2015**: 925691.
- Liu, Y., L. Lin and R. Zarnegar (1994). "Modulation of hepatocyte growth factor gene expression by estrogen in mouse ovary." *Mol Cell Endocrinol* **104**(2): 173-181.
- Mackay, A. M., S. C. Beck, J. M. Murphy, F. P. Barry, C. O. Chichester and M. F. Pittenger (1998). "Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow." *Tissue Eng* **4**(4): 415-428.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T.

**Bibliografía**

- J. Daly, S. Davis, T. N. Sato and G. D. Yancopoulos (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." Science **277**(5322): 55-60.
- Makowski, L., D. L. Caspar, W. C. Phillips and D. A. Goodenough (1977). "GAP junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data." J Cell Biol **74**(2): 629-645.
- Malickova, K., R. Jarosova, K. Rezabek, T. Fait, J. Masata, I. Janatkova, T. Zima and M. Kalousova (2010). "Concentrations of sRAGE in serum and follicular fluid in assisted reproductive cycles--a preliminary study." Clin Lab **56**(9-10): 377-384.
- Matos, L., D. Stevenson, F. Gomes, J. L. Silva-Carvalho and H. Almeida (2009). "Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells." Mol Hum Reprod **15**(7): 411-419.
- Matsuda, F., N. Inoue, N. Manabe and S. Ohkura (2012). "Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells." J Reprod Dev **58**(1): 44-50.
- Mattioli, M., A. Gloria, M. Turriani, P. Berardinelli, V. Russo, D. Nardinocchi, V. Curini, M. Baratta, E. Martignani and B. Barboni (2012). "Osteo-regenerative potential of ovarian granulosa cells: an in vitro and in vivo study." Theriogenology **77**(7): 1425-1437.
- Mauro, A., M. Turriani, A. Ioannoni, V. Russo, A. Martelli, O. Di Giacinto, D. Nardinocchi and P. Berardinelli (2010). "Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells." Vet Res Commun **34 Suppl 1**: S25-28.
- May, J. V., J. P. Frost and D. W. Schomberg (1988). "Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor-beta on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation." Endocrinology **123**(1): 168-179.
- McReynolds, S., M. Dzieciatkowska, B. R. McCallie, S. D. Mitchell, J. Stevens, K. Hansen, W. B. Schoolcraft and M. G. Katz-Jaffe (2012).

## Bibliografía

"Impact of maternal aging on the molecular signature of human cumulus cells." Fertil Steril **98**(6): 1574-1580 e1575.

Merhi, Z. (2014). "Advanced glycation end products and their relevance in female reproduction." Hum Reprod **29**(1): 135-145.

Merhi, Z., E. A. McGee and E. Buyuk (2014). "Role of advanced glycation end-products in obesity-related ovarian dysfunction." Minerva Endocrinologica **39**(3): 167-174.

Micevych, P. and K. Sinchak (2008). "Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain." Mol Cell Endocrinol **290**(1-2): 44-50.

Miyazawa, K. (2010). "Hepatocyte growth factor activator (HGFA): a serine protease that links tissue injury to activation of hepatocyte growth factor." FEBS J **277**(10): 2208-2214.

Monga, R., I. Sharma, T. K. Datta and D. Singh (2011). "Characterization of serum-free buffalo granulosa cell culture and analysis of genes involved in terminal differentiation from FSH- to LH-responsive phenotype." Domest Anim Endocrinol **41**(4): 195-206.

Mukai, T., T. Nagamura-Inoue, T. Shimazu, Y. Mori, A. Takahashi, H. Tsunoda, S. Yamaguchi and A. Tojo (2016). "Neurosphere formation enhances the neurogenic differentiation potential and migratory ability of umbilical cord-mesenchymal stromal cells." Cytotherapy **18**(2): 229-241.

Nagashima, T., J. Kim, Q. Li, J. P. Lydon, F. J. DeMayo, K. M. Lyons and M. M. Matzuk (2011). "Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and ovulation." Mol Endocrinol **25**(10): 1740-1759.

Nahum, R., K. J. Thong and S. G. Hillier (1995). "Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells in vitro." Hum Reprod **10**(1): 75-81.

Negrean, M., A. Stirban, B. Stratmann, T. Gawlowski, T. Horstmann, C. Gotting, K. Kleesiek, M. Mueller-Roesel, T. Koschinsky, J. Uribarri, H. Vlassara and D. Tschoepe (2007). "Effects of low- and high-advanced

**Bibliografía**

glycation endproduct meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus." Am J Clin Nutr **85**(5): 1236-1243.

Neulen, J., S. Raczek, M. Pogorzelski, K. Grunwald, T. K. Yeo, H. F. Dvorak, H. A. Weich and M. Breckwoldt (1998). "Secretion of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor from human luteinized granulosa cells is human chorionic gonadotrophin dependent." Mol Hum Reprod **4**(3): 203-206.

Nielsen, M. S., L. N. Axelsen, P. L. Sorgen, V. Verma, M. Delmar and N. H. Holstein-Rathlou (2012). "GAP junctions." Compr Physiol **2**(3): 1981-2035.

Niswender, G. D., J. L. Juengel, W. J. McGuire, C. J. Belfiore and M. C. Wiltbank (1994). "Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy." Biol Reprod **50**(2): 239-247.

Niswender, G. D., J. L. Juengel, P. J. Silva, M. K. Rollyson and E. W. McIntush (2000). "Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum." Physiol Rev **80**(1): 1-29.

O'Shaughnessy, P. J., K. Dudley and W. R. Rajapaksha (1996). "Expression of follicle stimulating hormone-receptor mRNA during gonadal development." Mol Cell Endocrinol **125**(1-2): 169-175.

Oki, Y., H. Ono, T. Motohashi, N. Sugiura, H. Nobusue and K. Kano (2012). "Dedifferentiated follicular granulosa cells derived from pig ovary can transdifferentiate into osteoblasts." Biochem J **447**(2): 239-248.

Oonk, R. B., K. L. Parker, J. L. Gibson and J. S. Richards (1990). "Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450scc) gene. Structure and regulation by cAMP in vitro." J Biol Chem **265**(36): 22392-22401.

Ophir, L., Y. Yung, E. Maman, N. Rubinstein, G. M. Yerushalmi, J. Haas, E. Barzilay and A. Hourvitz (2014). "Establishment and validation of a

## Bibliografía

model for non-luteinized human mural granulosa cell culture." Mol Cell Endocrinol **384**(1-2): 165-174.

Osteen, K. G., M. R. Loeken and C. P. Channing (1982). "Intraovarian control of granulosa cell luteinization." Endocrinol Exp **16**(3-4): 301-309.

Osuga, Y., O. Tsutsumi, M. Momoeda, R. Okagaki, H. Matsumi, H. Hiroi, A. Suenaga, T. Yano and Y. Taketani (1999). "Evidence for the presence of hepatocyte growth factor expression in human ovarian follicles." Mol Hum Reprod **5**(8): 703-707.

Otani, N., S. Minami, M. Yamoto, T. Shikone, H. Otani, R. Nishiyama, T. Otani and R. Nakano (1999). "The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy." J Clin Endocrinol Metab **84**(10): 3845-3851.

Oyawoye, O., A. Abdel Gadir, A. Garner, N. Constantinovici, C. Perrett and P. Hardiman (2003). "Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome." Hum Reprod **18**(11): 2270-2274.

Parrott, J. A. and M. K. Skinner (1998). "Developmental and hormonal regulation of hepatocyte growth factor expression and action in the bovine ovarian follicle." Biol Reprod **59**(3): 553-560.

Parrott, J. A. and M. K. Skinner (1998). "Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and Kit ligand during ovarian follicular development." Endocrinology **139**(5): 2240-2245.

Parrott, J. A., J. L. Vigne, B. Z. Chu and M. K. Skinner (1994). "Mesenchymal-epithelial interactions in the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor production by thecal cells and their action on granulosa cells." Endocrinology **135**(2): 569-575.

Pasqualotto, E. B., A. Agarwal, R. K. Sharma, V. M. Izzo, J. A. Pinotti, N. J. Joshi and B. I. Rose (2004). "Effect of oxidative stress in follicular fluid

## Bibliografía

on the outcome of assisted reproductive procedures." Fertil Steril **81**(4): 973-976.

Pepper, M. S., N. Ferrara, L. Orci and R. Montesano (1992). "Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro." Biochem Biophys Res Commun **189**(2): 824-831.

Piperi, C., C. Adamopoulos, G. Dalagiorgou, E. Diamanti-Kandarakis and A. G. Papavassiliou (2012). "Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases." J Clin Endocrinol Metab **97**(7): 2231-2242.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.

Pointis, G., C. Fiorini, N. Defamie and D. Segretain (2005). "GAP junctional communication in the male reproductive system." Biochim Biophys Acta **1719**(1-2): 102-116.

Poulsen, M. W., R. V. Hedegaard, J. M. Andersen, B. de Courten, S. Bugel, J. Nielsen, L. H. Skibsted and L. O. Dragsted (2013). "Advanced glycation endproducts in food and their effects on health." Food Chem Toxicol **60**: 10-37.

Quesnel, H. (1999). "Localization of binding sites for IGF-I, insulin and GH in the sow ovary." J Endocrinol **163**(2): 363-372.

Raynaud, C. M., M. Maleki, R. Lis, B. Ahmed, I. Al-Azwani, J. Malek, F. F. Safadi and A. Rafii (2012). "Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation." Stem Cells Int **2012**: 658356.

Redmer, D. A., V. Doraiswamy, B. J. Bortnem, K. Fisher, A. Jablonka-Shariff, A. T. Grazul-Bilska and L. P. Reynolds (2001). "Evidence for a role

## Bibliografía

of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum." Biol Reprod **65**(3): 879-889.

Regan, S. L. P., P. G. Knight, J. L. Yovich, Y. Leung, F. Arfuso and A. Dharmarajan (2018). "Involvement of Bone Morphogenetic Proteins (BMP) in the Regulation of Ovarian Function." Vitam Horm **107**: 227-261.

Reynolds, L. P. and D. A. Redmer (1999). "Growth and development of the corpus luteum." J Reprod Fertil Suppl **54**: 181-191.

Richards, J. S., Y. A. Ren, N. Candelaria, J. E. Adams and A. Rajkovic (2018). "Ovarian Follicular Theca Cell Recruitment, Differentiation, and Impact on Fertility: 2017 Update." Endocr Rev **39**(1): 1-20.

Richards, R. G., S. M. Hartman and S. Handwerger (1994). "Human cytotrophoblast cells cultured in maternal serum progress to a differentiated syncytial phenotype expressing both human chorionic gonadotropin and human placental lactogen." Endocrinology **135**(1): 321-329.

Rimon-Dahari, N., L. Yerushalmi-Heinemann, L. Alyagor and N. Dekel (2016). "Ovarian Folliculogenesis." Results Probl Cell Differ **58**: 167-190.

Riva, F., C. Omes, R. Bassani, R. E. Nappi, G. Mazzini, A. Icaro Cornaglia and A. Casasco (2014). "In-vitro culture system for mesenchymal progenitor cells derived from waste human ovarian follicular fluid." Reprod Biomed Online **29**(4): 457-469.

Rizzino, A. (1988). "Transforming growth factor-beta: multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices." Dev Biol **130**(2): 411-422.

Robinson, R. S., K. J. Woad, A. J. Hammond, M. Laird, M. G. Hunter and G. E. Mann (2009). "Angiogenesis and vascular function in the ovary." Reproduction **138**(6): 869-881.

Rodgers, R. J., I. L. van Wezel, H. F. Irving-Rodgers, T. C. Lavranos, C. M. Irvine and M. Krupa (1999). "Roles of extracellular matrix in follicular development." J Reprod Fertil Suppl **54**: 343-352.

Rotter, N., J. Oder, P. Schlenke, U. Lindner, F. Bohrnsen, J. Kramer, J. Rohwedel, R. Huss, S. Brandau, B. Wollenberg and S. Lang (2008).

## Bibliografía

"Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands." Stem Cells Dev **17**(3): 509-518.

Roy, S. K. and A. R. Kole (1998). "Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: in-vitro effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF-beta on receptor expression in human preantral follicles." Mol Hum Reprod **4**(3): 207-214.

Roy, S. K. and B. J. Treacy (1993). "Isolation and long-term culture of human preantral follicles." Fertil Steril **59**(4): 783-790.

Sasson, R., E. Rimon, A. Dantes, T. Cohen, V. Shinder, A. Land-Bracha and A. Amsterdam (2004). "Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signalling and protein kinases." Mol Hum Reprod **10**(5): 299-311.

Schams, D., B. Berisha, M. Kosmann and W. M. Amselgruber (2002). "Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy." Domest Anim Endocrinol **22**(1): 51-72.

Schneyer, A. L., T. Fujiwara, J. Fox, C. K. Welt, J. Adams, G. M. Messerlian and A. E. Taylor (2000). "Dynamic changes in the intrafollicular inhibin/activin/follistatin axis during human follicular development: relationship to circulating hormone concentrations." J Clin Endocrinol Metab **85**(9): 3319-3330.

Schuring, A. N., N. Schulte, R. Kelsch, A. Ropke, L. Kiesel and M. Gotte (2011). "Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics." Fertil Steril **95**(1): 423-426.

Schwartz, R. E., M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W. S. Hu and C. M. Verfaillie (2002). "Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells." J Clin Invest **109**(10): 1291-1302.

## Bibliografía

- Sela-Abramovich, S., E. Chorev, D. Galiani and N. Dekel (2005). "Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles." Endocrinology **146**(3): 1236-1244.
- Selesniemi, K., H. J. Lee, A. Muhlhauser and J. L. Tilly (2011). "Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(30): 12319-12324.
- Shimizu, T., K. Iijima, H. Sasada and E. Sato (2003). "Messenger ribonucleic acid expressions of hepatocyte growth factor, angiopoietins and their receptors during follicular development in gilts." J Reprod Dev **49**(3): 203-211.
- Shweiki, D., A. Itin, G. Neufeld, H. Gitay-Goren and E. Keshet (1993). "Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis." J Clin Invest **91**(5): 2235-2243.
- Silva, J. R., J. R. Figueiredo and R. van den Hurk (2009). "Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis." Theriogenology **71**(8): 1193-1208.
- Simon, A. M., D. A. Goodenough, E. Li and D. L. Paul (1997). "Female infertility in mice lacking connexin 37." Nature **385**(6616): 525-529.
- Smyth, C. D., F. Miro, P. F. Whitelaw, C. M. Howles and S. G. Hillier (1993). "Ovarian thecal/interstitial androgen synthesis is enhanced by a follicle-stimulating hormone-stimulated paracrine mechanism." Endocrinology **133**(4): 1532-1538.
- Sohl, G. and K. Willecke (2003). "An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man." Cell Commun Adhes **10**(4-6): 173-180.
- Sonigo, C., G. Dray, C. Roche, I. Cedrin-Durnerin and J. N. Hugues (2014). "Impact of high serum progesterone during the late follicular phase on IVF outcome." Reprod Biomed Online **29**(2): 177-186.

## Bibliografía

- Sporn, M. B., A. B. Roberts, L. M. Wakefield and R. K. Assoian (1986). "Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure." Science **233**(4763): 532-534.
- Takagi, M. (2005). "Cell processing engineering for ex-vivo expansion of hematopoietic cells." J Biosci Bioeng **99**(3): 189-196.
- Takehara, Y., A. Yabuuchi, K. Ezoe, T. Kuroda, R. Yamadera, C. Sano, N. Murata, T. Aida, K. Nakama, F. Aono, N. Aoyama, K. Kato and O. Kato (2013). "The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function." Lab Invest **93**(2): 181-193.
- Taran, R., M. K. Mamidi, G. Singh, S. Dutta, I. S. Parhar, J. P. John, R. Bhonde, R. Pal and A. K. Das (2014). "In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources." J Biosci **39**(1): 157-169.
- Tarnok, A., H. Ulrich and J. Bocsi (2010). "Phenotypes of stem cells from diverse origin." Cytometry A **77**(1): 6-10.
- Tatone, C. (2011). "Evidence that carbonyl stress by methylglyoxal exposure induces DNA damage and." Human Reproduction **26**(7): 1843-1859.
- Tatone, C., F. Amicarelli, M. C. Carbone, P. Monteleone, D. Caserta, R. Marci, P. G. Artini, P. Piomboni and R. Focarelli (2008). "Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing." Hum Reprod Update **14**(2): 131-142.
- Tatone, C., M. C. Carbone, M. Di Cola, R. Marci and F. Amicarelli (2007). "Oral Possible role of carbonyl stress in ovarian aging." Human Reproduction **22**: I75-I76.
- Tatone, C., M. C. Carbone, S. Falone, P. Aimola, A. Giardinelli, D. Caserta, R. Marci, A. Pandolfi, A. M. Ragnelli and F. Amicarelli (2006). "Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells." Mol Hum Reprod **12**(11): 655-660.

## Bibliografía

- Tirino, V., F. Paino, A. De Rosa and G. Papaccio (2012). "Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells." Methods Mol Biol **879**: 443-463.
- Tonetta, S. A. and G. S. diZerega (1989). "Intragonadal regulation of follicular maturation." Endocr Rev **10**(2): 205-229.
- Tsang, B. K., L. Ainsworth, B. R. Downey and G. J. Marcus (1985). "Differential production of steroids by dispersed granulosa and theca interna cells from developing preovulatory follicles of pigs." J Reprod Fertil **74**(2): 459-471.
- Urban, R. J. and J. D. Veldhuis (1992). "Endocrine control of steroidogenesis in granulosa cells." Oxf Rev Reprod Biol **14**: 225-262.
- Uribarri, J., W. Cai, M. Peppia, S. Goodman, L. Ferrucci, G. Striker and H. Vlassara (2007). "Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **62**(4): 427-433.
- Uribarri, J., M. Peppia, W. Cai, T. Goldberg, M. Lu, S. Baliga, J. A. Vassalotti and H. Vlassara (2003). "Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients." Am J Kidney Dis **42**(3): 532-538.
- Uzumcu, M., Z. Pan, Y. Chu, P. E. Kuhn and R. Zachow (2006). "Immunolocalization of the hepatocyte growth factor (HGF) system in the rat ovary and the anti-apoptotic effect of HGF in rat ovarian granulosa cells in vitro." Reproduction **132**(2): 291-299.
- Varras, M., T. Griva, V. Kalles, C. Akrivis and N. Papanastasiou (2012). "Markers of stem cells in human ovarian granulosa cells: is there a clinical significance in ART?" J Ovarian Res **5**(1): 36.
- Veldhuis, J. D. and R. W. Furlanetto (1985). "Trophic actions of human somatomedin C/insulin-like growth factor I on ovarian cells: in vitro studies with swine granulosa cells." Endocrinology **116**(4): 1235-1242.

## Bibliografía

- Vlassara, H., W. Cai, J. Crandall, T. Goldberg, R. Oberstein, V. Dardaine, M. Peppas and E. J. Rayfield (2002). "Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15596-15601.
- Weil, S., K. Vendola, J. Zhou and C. A. Bondy (1999). "Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development." J Clin Endocrinol Metab **84**(8): 2951-2956.
- Wiesen, J. F. and A. R. Midgley, Jr. (1993). "Changes in expression of connexin 43 GAP junction messenger ribonucleic acid and protein during ovarian follicular growth." Endocrinology **133**(2): 741-746.
- Wu, L., T. Wang, Y. Ge, X. Cai, J. Wang and Y. Lin (2012). "Secreted factors from adipose tissue increase adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells." Cell Prolif **45**(4): 311-319.
- Wu, X., K. Sallinen, S. Zhou, Y. Su, P. Pollanen and R. Erkkola (2000). "Androgen excess contributes to altered growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis in nonobese women with polycystic ovary syndrome." Fertil Steril **73**(4): 730-734.
- Wulff, C., S. E. Dickson, W. C. Duncan and H. M. Fraser (2001). "Angiogenesis in the human corpus luteum: simulated early pregnancy by HCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization." Hum Reprod **16**(12): 2515-2524.
- Wulff, C., H. Wilson, P. Lague, W. C. Duncan, D. G. Armstrong and H. M. Fraser (2000). "Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid." J Clin Endocrinol Metab **85**(11): 4302-4309.
- Yamato, M., K. Shima and R. Nakano (1992). "Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle." Horm Res **37 Suppl 1**: 5-11.

## Bibliografía

- Yong, E. L., D. T. Baird, R. Yates, L. E. Reichert, Jr. and S. G. Hillier (1992). "Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells." J Clin Endocrinol Metab **74**(4): 842-849.
- Zachow, R. J., B. E. Ramski and H. Lee (2000). "Modulation of estrogen production and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-type 1, cytochrome P450 aromatase, c-met, and protein kinase Balpha messenger ribonucleic acid content in rat ovarian granulosa cells by hepatocyte growth factor and follicle-stimulating hormone." Biol Reprod **62**(6): 1851-1857.
- Zachow, R. J., S. R. Weitsman and D. A. Magoffin (1997). "Hepatocyte growth factor regulates ovarian theca-interstitial cell differentiation and androgen production." Endocrinology **138**(2): 691-697.
- Zaher Merhi 1 , M. I., Angela D Doswell, Jennifer Ambroggio (2013). "Follicular fluid soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE): a potential indicator of ovarian reserve." J Clin Endocrinol Metab.
- Zamah, A. M., M. Hsieh, J. Chen, J. L. Vigne, M. P. Rosen, M. I. Cedars and M. Conti (2010). "Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin." Hum Reprod **25**(10): 2569-2578.
- Zelevnik, A. J., H. M. Schuler and L. E. Reichert, Jr. (1981). "Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle." Endocrinology **109**(2): 356-362.
- Zhang, H., M. Vollmer, M. De Geyter, Y. Litzistorf, A. Ladewig, M. Durrenberger, R. Guggenheim, P. Miny, W. Holzgreve and C. De Geyter (2000). "Characterization of an immortalized human granulosa cell line (COV434)." Mol Hum Reprod **6**(2): 146-153.
- Zhang, X., M. Yang, L. Lin, P. Chen, K. T. Ma, C. Y. Zhou and Y. F. Ao (2006). "Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and

## **Bibliografía**

mineralization in adipose--derived stem cells in vitro and in vivo." Calcif Tissue Int **79**(3): 169-178.

Zhao, P., J. Qiao, S. Huang, Y. Zhang, S. Liu, L. Y. Yan, A. J. Hsueh and E. K. Duan (2011). "Gonadotrophin-induced paracrine regulation of human oocyte maturation by BDNF and GDNF secreted by granulosa cells." Hum Reprod **26**(3): 695-702.