

Primeros pasos para definir el protocolo de aislamiento de células de granulosa a partir de fluido folicular humano

Marta Gargallo¹, Ángel Luis García-Otín², Javier Godino³, Clara Malo^{1,4}

¹ Tissue Microenvironment (TME) Lab, Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) Aragón, 50009 Zaragoza, Spain.
e-mail: mgargallo@iisaragon.es

² Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) e Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) Aragón, Zaragoza, Spain
e-mail: algarcia.iacs@aragon.es

³ Departamento de Citometría y Separación Celular, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS), Zaragoza, Spain.
e-mail: jgodino.iacs@aragon.es

⁴ Tissue Microenvironment (TME) Lab, Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A) Universidad de Zaragoza, Mariano Esquillor s/n, 50018, Zaragoza, Spain. e-mail: claramalo@unizar.es

Resumen

El protocolo actual para aislar células de la granulosa de fluido folicular humano no está optimizado. Este estudio detalla los pasos optimizados para reducir glóbulos rojos, identificar células de la granulosa con marcaje FSH positivo y evaluar cómo el método de transporte afecta la viabilidad inicial de las muestras.

Introducción

La infertilidad es un problema de salud global que afecta según la OMS a alrededor de 48,5 millones de parejas afectadas en todo el mundo [1]. La baja tasa de fertilidad en algunas mujeres se debe a la presencia de un gran número de óvulos inmaduros en los folículos ováricos, es decir óvulos que no alcanzan la madurez necesaria para ser fertilizados. Una solución prometedora para este problema es la maduración in vitro (MIV) de los óvulos. Para mejorar este proceso, es crucial estudiar las células presentes en el folículo, entre ellas se encuentran las células de la granulosa, del cúmulus y las endoteliales. Las células de la granulosa juegan un papel esencial al proporcionar soporte, señales de crecimiento y señales hormonales al óvulo durante su desarrollo, especialmente a través de los receptores de la hormona folículo estimulante, que son vitales para el desarrollo y la maduración adecuada de los óvulos, cuando la FSH se une a su receptor en la célula de la granulosa desencadena una cascada de eventos bioquímicos que conducen al desarrollo del folículo y la producción de estrógenos [2-4].

Objetivos

Establecer un sistema eficiente para aislar células de la granulosa en fluido folicular.

Objetivos específicos:

-Disminuir la cantidad de glóbulos rojos presentes en el fluido folicular.

-Determinar el porcentaje de presuntas células de la granulosa (células positivas de FSH) en el fluido folicular

-Valorar el efecto del método de transporte (4 h a 37°C vs 1 h a 5°C) sobre la viabilidad celular

Metodología

- Se recogió fluido folicular obtenido de mujeres que se han sometido a tratamientos de estimulación ovárica con FSH y LH en la Clínica Quirón Zaragoza. Este fluido se obtuvo tras puncionar los folículos de los ovarios y una vez identificado y seleccionado el ovocito se guardaron los fluidos foliculares.
- Las muestras se guardan a temperatura ambiente 4 horas o 1 hora a 5°C aproximadamente.
- El fluido folicular se centrifugó a 250g durante 5 minutos para conseguir un pellet, en el que estarán las células de la granulosa.
- Ese pellet se resuspendió en una solución de lisis comercial (ThermoFisher), para conseguir la rotura de los glóbulos rojos que abundan en el fluido. Una vez transcurridos 5 minutos se centrifugó la muestra de nuevo. Tras ello se observó un pellet menos rojo y un sobrenadante más rojo, debido a la hemólisis.
- El pellet obtenido tras la lisis se lavó 3 veces con PBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} .
- El pellet obtenido tras el último lavado se resuspendió en 800µl de PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} y se dividió en 4 tubos. Se usaron los anticuerpos para receptor de FSH conjugado con APC (Biotechne) y el anticuerpo CD45 conjugado con CF BLUE (Immunostep).
- Cada muestra se dividió en 4 tubos para realizar diferentes marcajes: 1) control de isotipo para FSH, 2) control de isotipo para C45, 3) doble marcaje con el anticuerpo de FSH y CD45, 4) un control sin ningún marcaje. Las muestras se incubaron con anticuerpos e isotipos durante 15 minutos a 5°C. A continuación, se añadió el

colorante vital fluorescente Zombie NIR (Biolegend) para valorar viabilidad celular.

- El análisis de citometría se realizó con el equipo Gallios (Beckman Coulter) del Servicio Científico Técnico de Citometría del IACS en el CIBA. Se utilizó el software Kaluza 2.1 (beckman Coulter).

Resultados

Los resultados de citometría demuestran que el método de transporte de 1h a 5°C mantiene mejor la viabilidad que el método de 4h a 37°C (Figura 1). La viabilidad celular alcanzó el 48,9% en el método a 5°C mientras la viabilidad era tan solo del 35% en el método a 37°C.

En el estudio de poblaciones celulares en ambos tratamientos en función del marcaje con receptor de FSH y CD45 se muestran similares poblaciones celulares. En las muestras hay una alta presencia de glóbulos rojos, que no son incluidos para estudiar dichas poblaciones, ya que se hizo una acotación de población celular en el *dot plot* tamaño/complejidad (FS/SS). En la Figura 2 se muestran las poblaciones obtenidas. Se observa que un 77% de las muestras no corresponden con células de la serie blanca (CD45 negativas) ni muestran receptor de FSH (propio de las células de la granulosa). Solamente un 6,38% son positivas a CD45 y un 11,24% son positivas al receptor de FSH sin mostrarse positivos a CD45.

Conclusiones

-No se ha encontrado una población celular abundante para el receptor de FSH, propio de las células de la granulosa, solo un 11,24% de la población total es positiva.

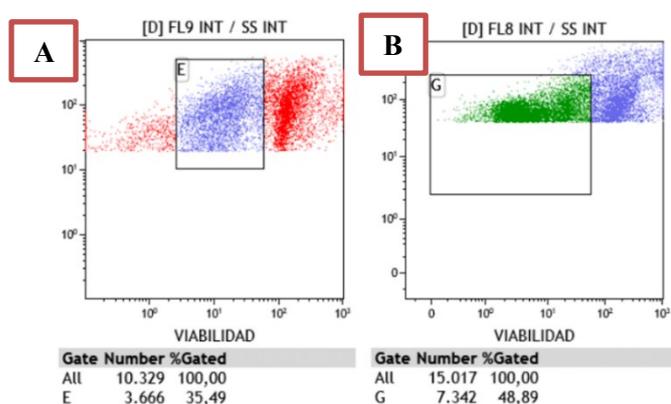


Fig. 1. A: Diagrama tamaño/complejidad para el análisis de la viabilidad de la población celular de interés en muestra de 4 horas y almacenamiento a 37°C. B: Diagrama tamaño/complejidad para el análisis de la viabilidad de la población celular de interés en muestra de 1 hora v almacenamiento en frío tras colecta.

- La viabilidad obtenida con el método de procesamiento de 1 hora a 5°C tras la recolección de muestras es mayor que la viabilidad de las muestras transcurridas 4 horas y a 37°C desde la recolección.

Futuros Pasos

El porcentaje de células marcadas para el receptor de FSH fue muy bajo, cuestionando la idoneidad del anticuerpo usado. Se estudiarán otros anticuerpos (receptor LH, CD29, CD166, CD49f y HLA-ABC) para mejorar la identificación de células de la granulosa. Tras establecer un método eficiente, se realizará el *sorting* de células positivas para poder iniciar cultivos con una población celular altamente purificada. **FUNDING:** Fundación Merck Salud. Ayuda Merck de Investigación 2023 en el área de Investigación Clínica en Fertilidad.

Referencias

- [1]. Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2021. Disponible en línea: <https://www.who.int/es> (consultado el 2 de Junio de 2024).
- [2]. DHAR, A., et al. The human ovarian granulosa cell: a stereological approach. *Journal of anatomy*, 1996, 188, (Pt 3), 671.
- [3]. QUINN, M. C. J., et al. Purification of granulosa cells from human ovarian follicular fluid using granulosa cell aggregates. *Reproduction, fertility and development*, 2006, 18(5), pp. 501-508.
- [4]. BRAZERT, M., et al. Perfil transcriptómico de genes de progresión del ciclo celular en células de la granulosa de ovario humano. *Revista de reguladores biológicos y agentes homeostáticos*, 2019, 33(1), pp. 39-51.

FIGURAS

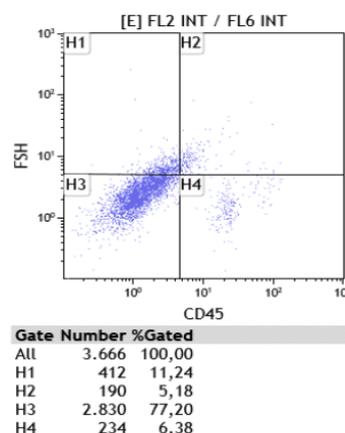


Fig. 2.: Representación gráfica de las distintas poblaciones celulares encontradas para los anticuerpos CD45 y receptor de FSH.