



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN



PEDECIBA

Maestría en Ciencias Biológicas

Sub área Biología Celular y Molecular

***Variaciones genéticas en moléculas
vinculadas a la inflamación y su relación
con el Síndrome de ovario poliquístico***

Estudiante: Lic. Ma. Jimena Mas de Ayala

Orientadora: Dra. Rebeca Chávez-Genaro

Co-orientadora: Dra. Rossana Sapiro

Tribunal

Presidente: Dra. Adriana Mimbacas

Vocales: Dr. Bernardo Bertoni y Dra. Ana Hernández

Índice

1. Resumen	5
Palabras clave	6
2. Introducción	6
2.1 Generalidades del ovario y su fisiología	6
2.2 Familia de receptores tipo Toll (TLRs)	12
3.2.1 Expresión y función de los TLRs en células del sistema reproductivo	15
3.2.2 Ligandos no-patógenos que activan los TLRs	17
2.3 Receptor Tipo Toll 4 (TLR4)	18
2.4 Polimorfismos genéticos del <i>TLR4</i>	20
2.5 Polimorfismos genéticos de la <i>IL6</i>	23
2.6 Polimorfismos genéticos de la <i>IL1β</i>	24
2.7 Polimorfismos genéticos del <i>TNFα</i>	24
2.8 Síndrome de ovario poliquístico (SOP)	26
2.8.1 Diagnóstico	26
2.8.2 El SOP en nuestro país	29
2.8.3 Patogénesis	30
2.8.3.1 Factores ambientales asociados al SOP..	30
2.8.3.2 Factores genéticos asociados al SOP	31
3. Justificación e hipótesis	34
4. Objetivo general	34
4.1 Objetivos específicos	
4.1.1 Objetivo específico 1	34
4.1.2 Objetivo específico 2	34
4.1.3 Objetivo específico 3	34
5. Material y métodos (de acuerdo a los objetivos)	35
5.1 Población de estudio	35
5.2 Objetivo específico 1	
5.2.1 Formulario	35

5.2.2	Análisis estadístico	36
5.3	Objetivo específico 2	
5.3.1	Obtención de muestras	36
5.3.2	Análisis del ADN	37
5.3.2.1	Ensayo cuádruplex	37
5.3.2.2	Ensayo dúplex	38
5.3.3	Análisis estadístico	39
5.4	Objetivo específico 3	
5.4.1	Obtención de muestras	40
5.4.2	Preparación y estimulación de células de la granulosa	40
5.4.3	ELISA	41
5.4.4	Inmunofluorescencia	41
5.4.5	Microscopía electrónica de transmisión	42
5.4.6	Aislamiento del ARN mensajero (ARNm)	43
5.4.7	Retrotranscripción del ARNm	43
5.4.8	Real time PCR	44
5.4.8.1	Expresión de ARNm de <i>TLR4</i> en células de la granulosa humanas	44
5.4.8.2	Cuantificación relativa de la expresión génica	44
5.4.8.2.1	Curvas estándar para <i>IL1β</i> , <i>IL6</i> y <i>GAPDH</i>	45
5.4.8.2.2	Eficiencia de reacción	46
5.4.9	Cálculo de la expresión relativa de <i>IL1β</i> e <i>IL6</i>	46
5.4.10	Análisis estadístico	46
6.	Resultados	48
6.1	Objetivo específico 1:	
6.1.1	Diagnóstico de SOP	48
6.1.2	Rango etario	49
6.1.3	Alteraciones metabólicas asociadas al SOP	50
6.1.4	Valoraciones hormonales	50
6.2	Objetivo específico 2:	
6.2.1	Ensayo	52
6.2.2	Frecuencias genotípicas	54
6.2.3	Análisis de asociación genética	57

6.3	Objetivo específico 3:	
6.3.1	Cultivo de células de la granulosa	59
6.3.2	Expresión del <i>TLR4</i> en células de la granulosa	60
6.3.2.1	Amplificación por PCR real time	60
6.3.2.2	Inmunofluorescencia	62
6.3.3	Análisis de la ultraestructura de las células de la granulosa	62
6.3.4	Análisis de la expresión génica por PCR real time cuantitativa	64
6.3.4.1	Cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés	66
6.3.4.2	Cuantificación relativa de la expresión de IL6 en células de la granulosa de mujeres control y mujeres con SOP	66
6.3.4.3	Cuantificación relativa de la expresión de IL1 β en células de la granulosa de mujeres control y mujeres con SOP	67
7.	Discusión	68
8.	Conclusiones	79
9.	Referencias bibliográficas	80
10.	Anexos	88
11.	Agradecimientos	99
12.	Foros	100

Resumen

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una patología reproductiva con alteraciones endócrino-metabólicas cuyo origen es desconocido. Afecta aproximadamente al 10% de las mujeres en edad fértil y se ha vinculado a un estado proinflamatorio.

La presencia de receptores de la inmunidad innata, receptores de la familia Toll (TLR), se han identificado en las células de la granulosa del ovario de diversas especies. Su activación lleva a la producción de diversas citoquinas que han sido implicadas en la fisiología reproductiva.

Diversos estudios han asociado la presencia de variantes genéticas del *TLR4* (Asp299Gly y Thr399Ile) con la ocurrencia de enfermedades de tipo inflamatorio.

En este trabajo nos propusimos caracterizar fenotípicamente una población de mujeres uruguayas con SOP y la asociación de este síndrome con variaciones genéticas de mediadores inflamatorios relacionados a la vía de activación del *TLR4*. Por otra parte estudiamos *in vitro* el fenotipo de las células de la granulosa del ovario y analizamos su respuesta frente a la exposición a un ligando del *TLR4* en mujeres con SOP y mujeres control.

Nuestros resultados mostraron que las mujeres con SOP analizadas en este estudio exhibieron características fenotípicas similares a las descritas en estudios de otras poblaciones. No hubo asociación entre ninguno de los dos polimorfismos del gen de *TLR4* (Asp299Gly y Thr399Ile) y el SOP en nuestra población. Sin embargo, polimorfismos en la región promotora de dos genes de citoquinas proinflamatorias (*IL1 β* y *TNF α*) relacionadas con la cascada del *TLR4*, sí mostraron asociación con la presencia de SOP en esta misma población.

Los estudios *in vitro* mostraron que las células de la granulosa expresan *TLR4*. Además, las células granulosas de mujeres con SOP mostraron un aumento del ARNm de *IL1 β* .

Todos estos datos permiten sugerir que las variaciones genéticas encontradas podrían estar implicadas en el desarrollo del síndrome, y muestran a las células de la granulosa como posibles mediadoras de una respuesta inflamatoria.

Palabras clave: *TLR4*, polimorfismos genéticos, síndrome de ovario poliquístico, citoquinas inflamatorias

Introducción

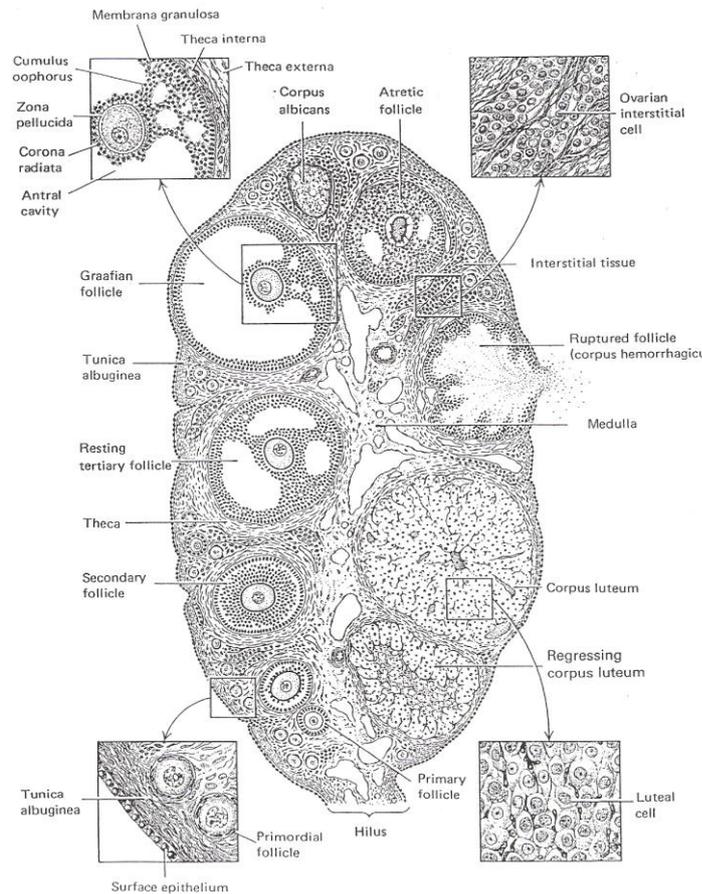
Mientras que la principal función del sistema reproductivo permite asegurar la continuidad de las especies, el sistema inmune se caracteriza por proveer protección a los organismos. Sin embargo, el funcionamiento de los diferentes sistemas dentro de cada individuo ocurre de modo integrado, por lo que considerar las interacciones entre estos dos sistemas resulta particularmente interesante. Las hormonas sexuales actúan como factores que regulan las respuestas inmunes (Roberts et al 2001; Tanriverdi et al 2003), y las células inmunes a través de los factores que producen (citoquinas por ejemplo) están implicadas en la regulación de la función ovárica y del tracto reproductivo de las hembras (Bukulmez et al 2000; Wira et al 2004). Una desregulación de las interacciones fisiológicas entre los sistemas reproductivo e inmune pueden llevar a desórdenes y enfermedades que afecten cualquiera de estos sistemas.

Generalidades del ovario y su fisiología

El ovario es un órgano altamente organizado, formado por células germinales y por células somáticas (células de la granulosa, células de la teca, células del estroma) que interaccionan entre sí, propiciando la formación, desarrollo y liberación de la gameta femenina, el ovocito; así como la producción de hormonas sexuales femeninas. La unidad funcional del ovario es el folículo ovárico que está formada por el ovocito y las células foliculares que lo rodean (Jones, 1991). La foliculogénesis es el proceso de desarrollo de los folículos del ovario e implica una rápida proliferación y diferenciación celular, que en el caso de los mamíferos, es regulada por mediadores endocrinos y paracrinos, entre ellos algunos factores vinculados a la inflamación. En este proceso el ovocito crece en tamaño y adquiere maduración nuclear y citoplasmática para cumplir su función como gameta, mientras que las células foliculares acompañan estos cambios modificando su morfología, número y disposición en el folículo (Eppig, 1985). Los folículos en el ovario adulto existen simultáneamente en un amplio rango de tamaños y estadios de desarrollo, entre los que se observan folículos

primordiales y en crecimiento (primarios, secundarios o antrales), así como folículos atrésicos (Figura 1). Los mecanismos involucrados en el crecimiento de los folículos actúan simultáneamente sobre una pequeña cohorte de varios folículos (Richards et al., 1987). El reclutamiento y diferenciación a partir de esta cohorte de un único folículo dominante está mediado por la acción de factores hormonales como la hormona folículo estimulante (FSH), y por factores intraováricos. En cada ciclo, que en la mujer ocurre de forma recurrente a intervalos aproximados de 28 días, el estímulo de la hormona luteinizante (LH) permitirá seleccionar un folículo dominante el cual liberará el ovocito rodeado de células del cumulus, hacia el oviducto donde será eventualmente fecundado. Los otros folículos que iniciaron el crecimiento se perderán por mecanismos de atresia (Kaipia et al, 1997). Las células de la granulosa y de la teca del folículo cuyo ovocito fue liberado exhiben una transformación en un proceso denominado luteinización que depende directamente del pico preovulatorio de LH y lleva a la formación de una estructura endócrina denominada cuerpo lúteo. Sus células exhiben un aumento de tamaño junto con modificaciones de los organelos que llevan a cambios en la maquinaria enzimática de la célula (Hsueh et al., 1984).

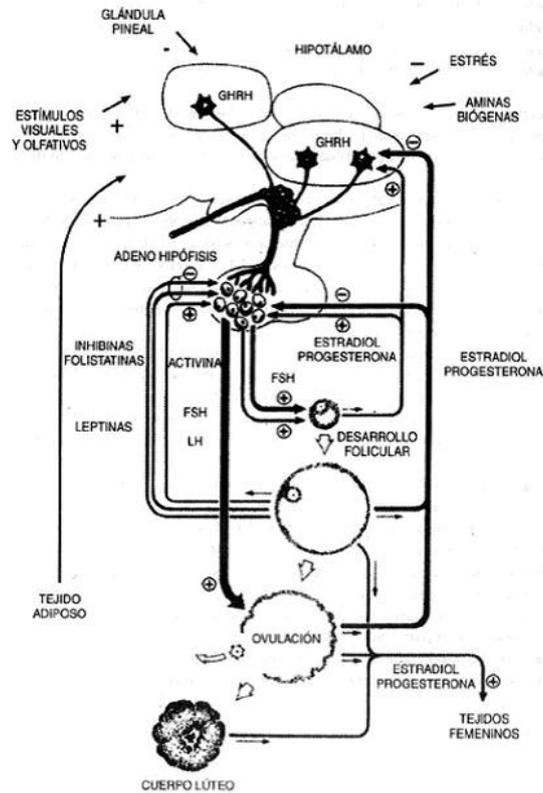
Figura 1. Imagen ilustrativa de una sección transversal del ovario (Tomado de Jones 1991)



El control de la funcionalidad ovárica requiere una regulación precisa, que es orquestada desde el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Desde el hipotálamo, se secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) con un patrón de liberación pulsátil. La GnRH actúa sobre la población de células gonadotropas de la adenohipófisis, las cuales liberan FSH y LH. Ambas hormonas actúan en forma coordinada para estimular la foliculogénesis y la producción cíclica de diversos esteroides sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos), péptidos gonadales (activina, inhibina y folistatina) y factores del crecimiento. Estos factores derivados del ovario retroalimentan al hipotálamo y la hipófisis para inhibir o aumentar la secreción de GnRH y gonadotropinas; así como las

propias gonadotropinas ejercen una retroalimentación sobre el hipotálamo controlando los pulsos de GnRH (Richards et al., 1988) (Figura 2).

Figura 2. Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Tomado de Lopez Mato, 2004)

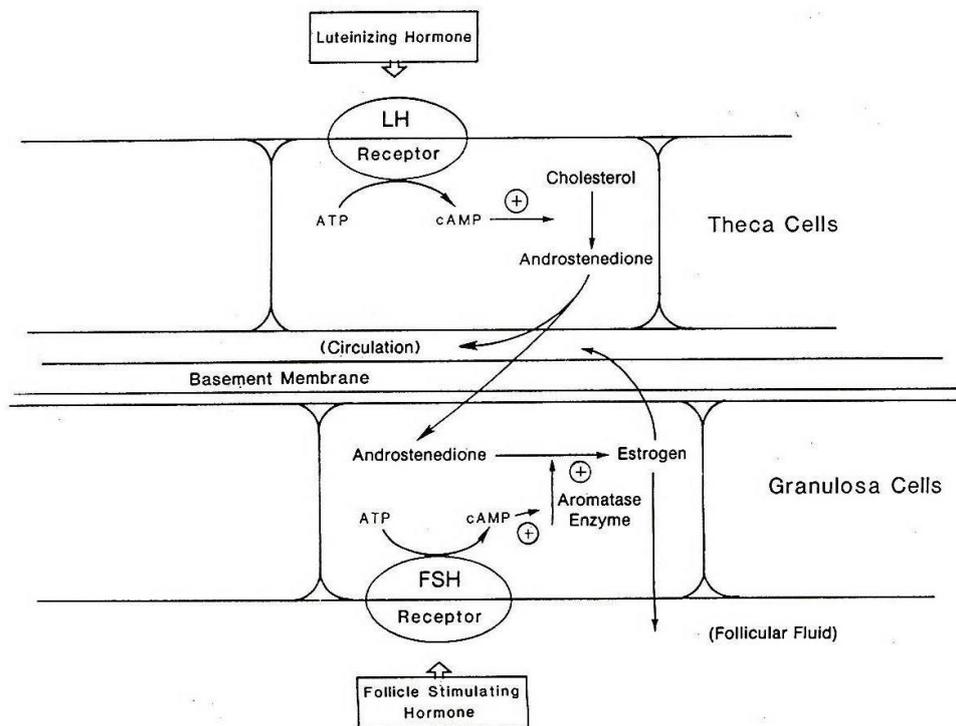


En el ovario la síntesis de esteroides depende de la colaboración entre las células de la granulosa y de la teca e involucra mecanismos mediados por AMP cíclico. Las células de la teca interna presentan receptores de membrana en la superficie celular que permiten la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que son escindidas para dar colesterol, el cual es esterificado y almacenado en gotas lipídicas en el citoplasma de la célula. Por estímulo de la LH el colesterol es transformado enzimáticamente en pregnenolona y posteriormente en androstenediona que es liberada al medio extracelular. En las células de la granulosa la FSH induce la síntesis la enzima P450-aromatasa que permite que la androsteneidona captada por las células de la granulosa, sea procesada a estradiol (Teoría de las dos células, Figura 3) (Ryan et al., 1968). El estradiol producido por las células de la granulosa se libera a la circulación periférica y al antro folicular. El estradiol y la FSH actúan en forma sinérgica aumentando la actividad de la enzima aromatasa y la producción de

estradiol. Previo a la ovulación, el pico de LH induce modificaciones que llevan a la luteinización de las células de la granulosa permitiendo que estas células sean capaces de sintetizar progesterona, incluso antes de la ovulación (Hsueh et al., 1984).

En el ovario la síntesis de esteroides depende de la colaboración entre las células de la granulosa y de la teca e involucra mecanismos mediados por AMP cíclico. Las células de la teca interna presentan receptores de membrana en la superficie celular que permiten la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que son escindidas para dar colesterol, el cual es esterificado y almacenado en gotas lipídicas en el citoplasma de la célula. Por estímulo de la LH el colesterol es transformado enzimáticamente en pregnenolona y posteriormente en androstenediona que es liberada al medio extracelular. En las células de la granulosa la FSH induce la síntesis la enzima P450-aromatasa que permite que la androstenediona captada por las células de la granulosa, sea procesada a estradiol (Teoría de las dos células, Figura 3) (Ryan et al., 1968). El estradiol producido por las células de la granulosa se libera a la circulación periférica y al antro folicular. El estradiol y la FSH actúan en forma sinérgica aumentando la actividad de la enzima aromatasa y la producción de estradiol. Previo a la ovulación, el pico de LH induce modificaciones que llevan a la luteinización de las células de la granulosa permitiendo que estas células sean capaces de sintetizar progesterona, incluso antes de la ovulación (Hsueh et al., 1984).

Figura 3. Teoría de la esteroidogénesis folicular: “dos células – dos hormonas”. (Adaptado de Yen et al., 1986)



Además de una regulación endocrina, en el ovario también median vías de regulación autócrinas y parácrinas, a través de diversas citoquinas que participan en el diálogo entre el ovocito y las células de la granulosa que lo rodean. Las citoquinas a nivel del ovario son sintetizadas *de novo* a partir de cualquiera de los elementos que conforman el folículo ovárico (células de la teca, granulosa, cúmulo y/u ovocito) (Vanderstichele et al., 1994; Assou et al., 2006) y por ciertas subpoblaciones de leucocitos (principalmente macrófagos y los neutrófilos) que se localizan en el estroma ovárico (Bukulmez et al., 2000). Estas citoquinas cumplen funciones específicas sobre el desarrollo folicular en las distintas fases del ciclo ovulatorio (foliculogénesis, esteroidogénesis, ruptura folicular y ovulación, formación y posterior regresión del cuerpo lúteo) (Gilchrist et al., 2000; Antezak et al., 2000). Algunos ejemplos se detallan a continuación.

En el año 1994 se publicó una revisión que menciona los aspectos del proceso ovulatorio que resultan semejantes a un evento inflamatorio (Espey, 1994). Por

acción de la LH pre-ovulatoria, se inducen cambios en la pared folicular que culminan con la ruptura del folículo ovárico, mediante eventos similares a los que ocurren en sitios de inflamación de tejidos o reparación de heridas (vasodilatación, hiperemia, exudación, edema, proliferación celular, remodelación tisular entre otros cambios) (Richards, 2007). Recientemente, se ha sugerido que otras vías relacionadas al sistema de reconocimiento de patógenos del sistema inmune innato también estarían involucradas en este evento, proponiendo la participación de los receptores tipo-Toll (TLRs) (Richards et al., 2008).

Por tanto, el folículo ovárico coordina una red endocrino-inmunológica que involucra la activación de moléculas del sistema de reconocimiento de patógenos, la expresión de genes relacionados con funciones inmunes y la acción de moléculas inflamatorias para el funcionamiento normal del ovario. Una desregulación de cualquiera de los procesos neuro-inmuno-endócrinos que participan del control de la fisiología del ovario podría derivar en una alteración de la foliculogénesis y de la ovulación.

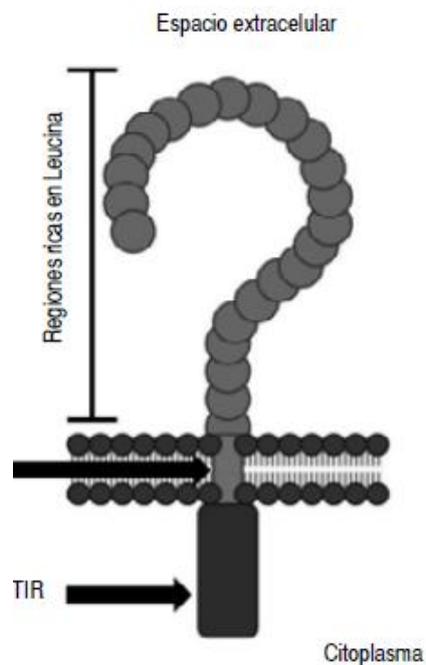
Familia de receptores tipo Toll

Los mamíferos presentan dos tipos de respuesta inmune, la adquirida y la innata. Mientras que las respuestas adquiridas operan tardíamente ante una infección y son altamente específicas para el patógeno que las induce, la respuesta inmune innata reacciona inmediatamente luego de la exposición a patógenos y sirve como la primera línea de defensa en el organismo. El sistema inmune innato depende de receptores de reconocimiento de patrones (pattern recognizing receptors-PRRs), tales como la familia de receptores tipo Toll, que se expresan en células del sistema inmune: monocitos, neutrófilos, células dendríticas, células “natural killers” entre otras. Los PRRs detectan los patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) y ejecutan a continuación una respuesta inmune (Akira et al., 2004, Kawai et al., 2007).

Los miembros de la familia TLR son receptores transmembrana que se caracterizan estructuralmente por la presencia de un dominio rico en leucina

(LRR) en la porción extracelular y un dominio citoplasmático muy conservado con homología con el dominio citoplasmático del receptor de la interleuquina I, denominado dominio TIR (Takeda et al., 2005) (Figura 4).

Figura 4. Estructura general de los receptores tipo Toll. Los TLRs poseen una región extracelular rica en repeticiones de leucina (LRRs), a través de la cual reconoce a sus ligandos específicos; una región transmembranal, y una región intracelular en donde se localiza el dominio TIR. Dependiendo del ligando reconocido, el dominio TIR reclutará a una proteína adaptadora para la ulterior transducción de señales (Tomado de Vadillo et al., 2012).



Los receptores Toll fueron descubiertos en *Drosophila melanogaster* como un grupo de moléculas involucradas en la regulación del desarrollo embrionario y la morfogénesis, actuando como responsables de la polaridad dorso-ventral de la mosca (Anderson et al., 1985). Posteriormente se observó que algunos de estos receptores protegían a la mosca adulta de las infecciones por hongos estimulando la secreción de péptidos anti-fúngicos (Lemaitre et al., 1996). La clonación de genes relacionados en plantas, gusanos, aves y mamíferos, demostró su importancia en la escala evolutiva como parte del sistema inmune

innato y como un mecanismo para reconocer patrones moleculares de organismos patógenos (Akira et al., 2001; Beutler et al., 2003; Janeway et al., 2002).

Al la fecha, se han descrito diez TLRs en humanos con un patrón de expresión variable en los diversos tejidos del organismo, y se dividen en dos grandes grupos: los TLRs de membrana citoplasmática (TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 10) y los TLRs de membranas endosomales (TLRs 3, 7, 8 y 9) (Figura 5). En forma de monómeros o de heterodímeros, cada TLR reconoce un patrón molecular distinto (Figura 6), y activa diferentes caminos de transducción de señales mediante la utilización selectiva de moléculas adaptadoras, que culminan en la producción de citoquinas proinflamatorias e interferones (Villanueva et al., 2006).

Figura 5. Esquema representativo de los diferentes TLRs. Los TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 10 se localizan en la membrana celular, en tanto los TLR 3, 7, 8 y 9 están mayormente expresados en endosomas (Tomado y adaptado de Vadillo et al., 2012)

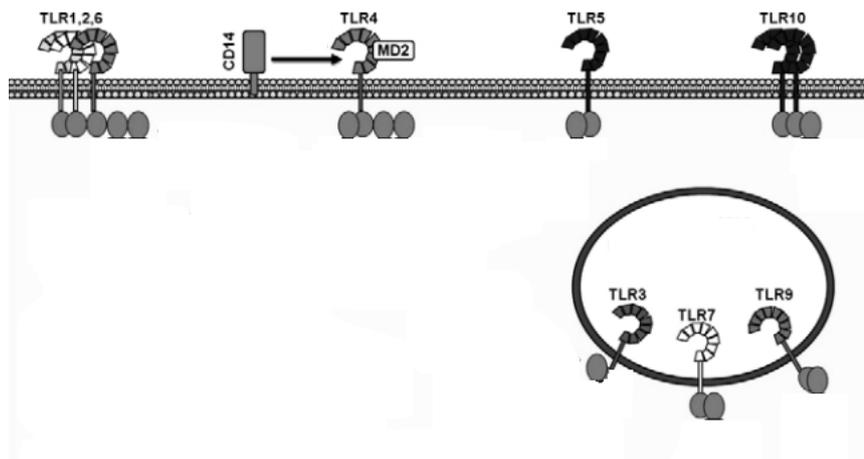
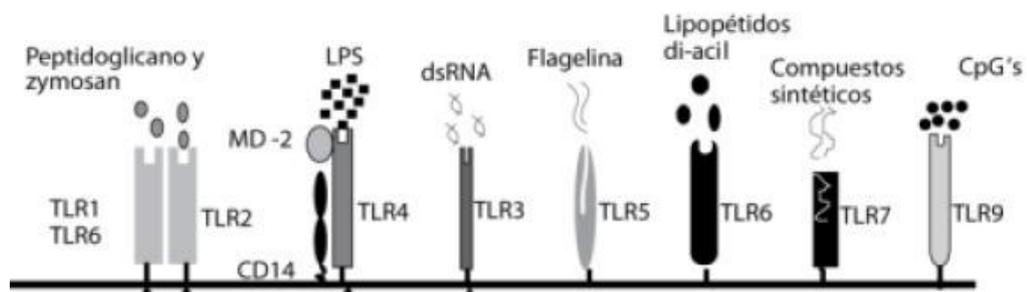


Figura 6. Los diferentes TLRs son activados mediante ligandos específicos (tomada de Rivas et al., 2005)



Expresión y función de los TLRs en células del sistema reproductivo

Existe evidencia creciente de que los TLRs se expresan en células somáticas que no pertenecen al sistema inmune (adipocitos, fibroblastos, células epiteliales del sistema respiratorio y el sistema intestinal, células del sistema nervioso central, entre otras) (Bes-Houtmann, et al., 2007; Pevsner-Fischer, et al., 2008; Olson et al., 2004), lo que sugiere un grupo de funciones más amplias que las descritas originalmente para estos receptores. En el sistema reproductivo, se ha reportado la expresión de TLRs en células del tracto reproductivo (vagina, útero, trompas de Falopio) (Aflatoonian et al., 2008) y en células del ovario. En el ovario de gallina, las células de la granulosa expresan TLR4 y TLR5 mientras que las células de la teca expresan TLR2, TLR4, TLR5 y TLR7 (Subedi et al., 2008); en tejido ovárico porcino se ha detectado expresión de TLR4 (Alvarez et al., 2006); y en el ovario de tres cepas diferentes de ratonas (NIH, Balb/c y C57BL/6) (Rodríguez-Martínez et al., 2005) se han detectado al menos 9 TLRs. En humanos, se ha demostrado por inmunohistoquímica la expresión de TLRs en células del epitelio de la superficie del ovario, células de la granulosa y células endoteliales, pero no se detectó a nivel del estroma (Zhou et al., 2009).

Si bien los patógenos no alcanzan con facilidad la porción del tracto reproductivo próxima a los ovarios, es necesaria la presencia de un sistema de protección inmunológico también a ese nivel. La funcionalidad de estos

receptores se ha evidenciado en experimentos realizados *in vitro* estimulando cultivos aislados de células del complejo-cumulus-ovocito con ligandos específicos de TLR2 y TLR4 (Pam3Cys y LPS respectivamente) detectando la expresión genes blanco tras activación de estos receptores (*Ptgs2, Il6 and Tnf*) (Shimada et al. 2006). Se sugiere que los procesos inflamatorios e inmunes asociados a la ovulación se vinculan a la expresión de TLRs en el ovario (Liu et al., 2008).

De la evidencia presentada se desprende que los receptores tipo-Toll cumplen funciones en la fisiología reproductiva. Así, por ejemplo el tratamiento *in vitro* de ovarios bovinos con lipopolisacaridos (LPS) bacterianos suprime la secreción de estradiol por parte de las células de la granulosa, pero no afecta la secreción de androstenediona por las células de la teca. Los autores proponen una disminución en la expresión del gen de la aromatasa, con la consecuente alteración de la función de las células de la granulosa. Por tanto los TLRs participarían en el control de la esteroidogénesis y este mecanismo podría explicar la alteración observada en el crecimiento y función de los folículos ováricos durante infecciones bacterianas (Herath et al., 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que las células del complejo cumulus-ovocito producen citoquinas tras la activación de los TLR2/4, que ejercen funciones específicas sobre diversas células. Varios ejemplos se detallan a continuación.

La IL6 una citoquina proinflamatoria se expresa en células de la granulosa y de la teca tras el pico ovulatorio de LH. Se ha observado que la FSH incrementa su síntesis (Gorospe et al., 1993). Esta IL ha sido propuesta como reguladora del crecimiento folicular y la atresia en humanos (Kawasaki et al., 2003). Además, esta citoquina tiene mecanismos de regulación autócrinos sobre las células del cumulus siendo capaz por sí misma de estimular la expansión del COC necesaria para la ovulación induciendo cambios en los perfiles de expresión de genes relacionados con la formación de la matriz extracelular (Liu et al., 2009).

Datos experimentales obtenidos de pruebas *in vitro* han mostrados que los cambios cronológicos en la producción de IL1 β en el ovario están gobernados

principalmente por las gonadotrofinas (Levitas et al., 2000; Martoriati et al., 2003a). La IL1 β regula ciertas funciones de las células de la granulosa y de la teca, tales como la esteroidogénesis, síntesis de proteasas, y prostaglandinas (Dinarello, 1989). Además, se ha observado que la IL1 β promueve la ovulación en diversas especies (Kokia et al., 1992; Takehara et al., 1994; Hurwitz et al., 1991). En humanos, las células de la granulosa *in vitro* muestran niveles aumentados de ARN mensajero de IL1 β cuando el folículo se encuentra próximo a romperse (Machelon et al., 1995; Wang et al., 2002), señalando una participación de esta interleuquina en la ovulación. Estos datos se han corroborado en estudios *in vivo* en los que se ha registrado la liberación de IL β al líquido folicular por acción de las gonadotropinas (Martoriati et al., 2003b; Caillaud et al., 2005).

A nivel del ovario el factor de necrosis tumoral α (TNF α) es producido por las células de la teca y de la granulosa. Investigaciones *in vitro* muestran que el TNF α participa en la remodelación de la matriz extracelular que ocurre previo a la ovulación (Johnson et al., 1999; Yang et al., 2004). Se ha descrito su influencia en la atresia folicular y esteroideogénesis en humanos (Carlberg et al., 2000). Además, el TNF α podría facilitar el proceso ovulatorio favoreciendo la apoptosis celular en el sitio donde será liberado el ovocito, es decir, en la interfase entre el folículo y la superficie del ovario (Murdoch et al., 1999).

Ligandos no-patógenos que activan los TLRs

Hasta ahora, hemos mencionado la activación de los TLRs en respuesta a ligandos patógenos. Sin embargo, la expresión de estos receptores en células no inmunes permite cuestionar cuáles podrían ser los ligandos fisiológicos que activan estos TLRs. Se han descrito 4 grupos de ligandos endógenos de los TLRs. Un primer grupo incluiría varias proteínas y péptidos inflamatorios. Por ejemplo, la familia de proteínas de choque térmico (Hsp) 60 se sugirió como ligando de TLR2 y/o TLR4 en macrófagos y células B (Ohashi et al., 2000; Cohen-Sfady M et al., 2005; Vabulas RM et al., 2001). En un segundo grupo se incluye un grupo de moléculas proteicas, las colectinas. Como ejemplo podemos citar la proteína surfactante A (SP-A) que se ha involucrado en la

defensa innata y procesos inflamatorios del pulmón (Guillot et al., 2002). En el tercer grupo se incluyen a los ácidos nucleicos de origen mamífero que han sido descritos como ligandos endógenos de TLRs que podrían promover el lupus eritematoso sistémico (Barrat et al., 2005). El último grupo lo integran las fracciones de glicosaminoglicanos. Se ha propuesto que el ácido hialurónico (AH), componente de la matriz extracelular, es un ligando clave en la activación de los TLRs). Se conoce que los fragmentos de AH generados por hialuronidasas endógenas en sitios donde ocurre daño tisular, ejercen efectos sumamente diversos dependiendo del tamaño del fragmento (Stern et al., 2006). En las células del cumulus, que están embebidas en una matriz rica en ácido hialurónico, se ha postulado un efecto autócrino de los fragmentos de AH en la activación de TLRs del ovario. En este órgano se ha demostrado que fragmentos de aproximadamente 150kDA son funcionales y activan los TLR2/4, lo que conlleva la expresión de genes relacionados a la inmunidad innata en células del cumulus (Jiang et al., 2005)

En suma, las células del cumulus que rodean al ovocito expresan receptores de la familia Toll que pueden responder a ligandos específicos, ya sean derivados de patógenos o derivados de la matriz extracelular, induciendo la expresión de genes vinculados a la inflamación así como a la inmunidad innata, entre los que se incluyen genes codificantes de citoquinas y quemoquinas. Finalmente estas moléculas tales como IL6, TNF α , prostaglandinas entre otras, son liberadas desde las células del cumulus para ejercer su función. La degradación del ácido hialurónico polimérico por parte de hialuronidasas genera fragmentos de ácido hialurónico que activan el TLR4.

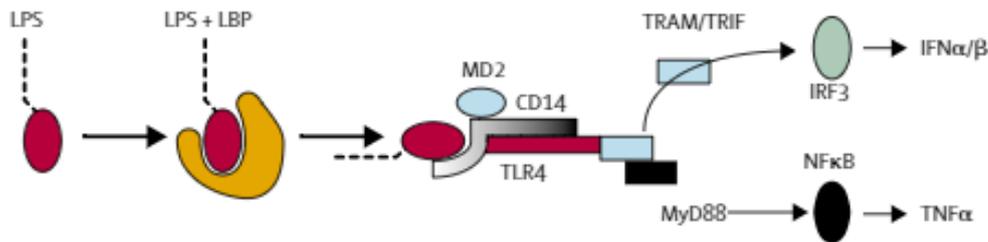
Receptor Tipo Toll 4 (TLR4)

El TLR4 es el miembro de la familia Toll que primero se identificó en mamíferos y el que ha sido mejor caracterizado. Su estructura se corresponde con la descrita previamente para esta familia de receptores: un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (LRR), un dominio transmembrana y un dominio intracelular del tipo receptor Toll-interleucina-1(TIR). El TLR4 a través de la porción LRR extracelular es responsable del reconocimiento de un número de

estructuras, que incluyen principalmente polisacáridos como el LPS (lipopolisacárido), aunque también estructuras provenientes de patógenos fúngicos o micobacterias, y ligandos endógenos (como el biglicano, las proteínas de choque térmico de 60 y 70 kDa, fibrinógeno, fibronectina, ácido hialurónico, entre otras (Akira et al., 2006; Arancibia et al., 2007; Kawai et al., 2010)).

El LPS es un componente de la superficie externa de las bacterias gram negativas, y constituye un potente activador de células del sistema inmune. El reconocimiento del LPS y el inicio de la señalización por parte del TLR4 es un proceso complejo, que involucra varias proteínas accesorias. En el evento de reconocimiento, el LPS liberado por bacterias Gram-negativas forma un complejo con la proteína de unión a LPS (LBP) presente en el torrente sanguíneo y es inmediatamente reconocido por CD14, un glicosilfosfatidilinositol anclado a membrana celular. Cuando el CD14 se une al LPS, lo libera hacia el complejo formado por el TLR4 y la proteína MD2 (TLR4/MD2). Esta proteína está asociada al dominio extracelular del TLR4 y aumenta la afinidad de este complejo por el LPS. Cuando el LPS se une a la porción externa del receptor TLR4, el dominio TIR (dominio citoplasmático), pueden activarse dos vías. En la primer vía, el dominio TIR se une a una proteína adaptadora conocida como MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88) y la activa, lo que conduce a la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y a la transcripción de genes pro-inflamatorios con la consecuente producción de citoquinas (IL6 e IL1 β y el TNF α entre otros). La iniciación de la segunda vía, que es independiente de MyD88 y es empleada únicamente por TLR3 y TLR4, esta mediada por una molécula adaptadora conocida como TRIF y conduce a la activación del factor regulador de interferón 3 (IRF3), y la posterior expresión de interferón β (IFN- β) y los genes de IFN-inducibles (Brightbill et al., 2000)(Figura 7).

Figura 7. Esquema representativo de la vía de señalización de TLR4. Al reconocer sus ligandos específicos, TLR4 inicia una cascada de señalización intracelular que puede ser dependiente o independiente de MyD88. En la vía dependiente de MyD88, la traslocación al núcleo de NF- κ B promueve la producción de citoquinas proinflamatorias. La vía independiente de MyD88 provoca la fosforilación de factores que se traslocan al núcleo, donde impulsarán la producción de IFN (Tomado y adaptado de Schröder et al., 2005).



Debido a que el gen del *TLR4* es polimórfico en la porción que codifica el dominio LRR de la porción extracelular del receptor, la conformación del receptor *TLR4* puede verse alterada entre individuos de la misma especie.

Polimorfismos genéticos del *TRL4*

Un polimorfismo genético es una región del genoma que varía entre los individuos de una población y que confiere variación alélica entre individuos y diversidad intra-especie. Un polimorfismo es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%. Si bien hay varios tipos de polimorfismos, los más frecuentes ocurren mediante la sustitución de una base por otra en un lugar específico del genoma, y se denominan polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). En el humano se ha descrito una distribución aproximada de un SNP cada 100-300 nucleótidos (Feero et al., 2010). La gran mayoría de los SNPs tienen dos alelos que se clasifican a nivel poblacional en alelo principal o “silvestre” y alelo raro o mutante. Esta clasificación se basa en la frecuencia en que estos alelos se observen en la población.

Los SNPs se localizan en las distintas regiones del genoma: regiones intrónicas, regiones reguladoras, regiones intergenómicas y regiones codificantes (exones). Los SNP de las regiones codificantes pueden ser SNPs sinónimos (si el cambio de nucleótido no provoca el cambio de un aminoácido en la proteína) o no sinónimos (si el cambio de nucleótido cambia un aminoácido dentro de la proteína) (Cargill et al., 1999)

En el humano, el gen del *TLR4* está localizado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q33.1). La secuenciación del gen del *TLR4* reveló que existen varios polimorfismos no sinónimos en el tercer exón del gen, que es el exón que codifica para el dominio LRR de la porción extracelular del receptor (Smirnova et al., 2001). Si bien la mayoría de estos polimorfismos no sinónimos tiene una baja frecuencia en poblaciones humanas (menor al 1%), la excepción está dada por dos polimorfismos que tienen una frecuencia poblacional mayor del 5%. Se trata de los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile. El primero, causa una sustitución A/G que provoca el cambio del aminoácido ácido aspartico por glicina en la posición 299: Asp299Gly (rs4986790); mientras que en el segundo se sustituye C/T lo que provoca el cambio del aminoácido treonina por isoleucina en la posición 399: Thr399Ile (rs4986791). Para ambos se ha demostrado que la forma derivada (G y T, o Gly e Ile, respectivamente) cambia el sitio de unión del ligando del receptor (Rallabhandi P et al., 2006) disminuyendo la afinidad del mismo al LPS lo que puede causar cambios en su cascada de señalización.

Se ha estudiado la posible asociación entre los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile del *TLR4* y diversas enfermedades infecciosas o de base inflamatoria tales como shock séptico, aterosclerosis, asma, periodontitis crónica, enfermedad de Chron, entre otras con poblaciones provenientes de Europa, Asia o África. (Dahmer et al., 2005; Pasterkamp et al., 2004; Yang et al., 2006; Brett et al., 2005; de Ridder et al., 2007), encontrándose resultados que ciertamente asocian estos polimorfismos con algunas de las enfermedades estudiadas (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los trabajos de investigación que analizan una posible asociación de los SNPs del *TLR4* con enfermedades infecciosas (Tomado de Schröder et al, 2005)

Reference	Association studied	SNP studied	Number of patients	Number of controls	Results: patients vs controls (%)	p value
Arbour et al ⁽¹⁾	Hyporesponsiveness to inhaled lipopolysaccharide	Asp299Gly Thr399Ile	31	57	22.6 vs 5.8 Cosegregating	0.029
Read et al ⁽²⁾	Meningococcal disease	Asp299Gly	1047	879	5.9 vs 6.5 Not significant	Not significant
Allen et al ⁽³⁾	Meningococcal disease	Asp299Gly Thr399Ile	252	251	20.2 vs 20.3 Not significant	0.9
Tal et al ⁽⁴⁾	Respiratory syncytial virus infection	Asp299Gly Thr399Ile	99	82	20.2 vs 4.9 Not significant	0.003
Feterowski et al ⁽⁵⁾	Sepsis after surgery	Asp299Gly Thr399Ile	153	154	6.5 vs 12.3 Not significant	0.12
Lorenz et al ⁽⁶⁾	Septic shock	Asp299Gly Thr399Ile	91	73	5.5 vs 0 Asp299Gly only	0.05
Child et al ⁽⁷⁾	Severe inflammatory response syndrome	Asp299Gly Thr399Ile	94	-	Non-significant trend towards higher mortality	0.08
Agnese et al ⁽⁸⁾	Bacterial infection (Gram-negative)	Asp299Gly Thr399Ile	77	39	18.0 vs 12.8	0.004
Genç et al ⁽⁹⁾	Bacterial vaginosis	Asp299Gly	238	-	Significant when stratified for SNP or no SNP	0.0001
Lorenz et al ⁽¹⁰⁾	Premature birth	Asp299Gly Thr399Ile	440	351	pH increase, 10-fold more Gardnerella spp 23.8 vs 15.9	0.028
Kiechl et al ⁽¹¹⁾	Carotid stenosis	Asp299Gly Thr399Ile	810	ND	Participants with SNPs have lower incidence of carotid stenosis	0.05
Yang et al ⁽¹²⁾	Coronary artery stenosis	Asp299Gly	1400	ND	Participants with SNP have no lower risk of stenosis	0.9
Ameziane et al ⁽¹³⁾	Acute coronary events	Asp299Gly	183	216	Participants with SNP have lower incidence of acute coronary events	0.037
Balistreri et al ⁽¹⁴⁾	Acute myocardial infarction	Asp299Gly	105	55	Participants with SNPs have lower incidence of myocardial infarction	0.002
Edfeldt et al ⁽¹⁵⁾	Myocardial infarction	Asp299Gly Thr399Ile	1213	1561	10.7 vs 7.9 Men with SNPs have increased incidence of myocardial infarction	0.004
Reismann et al ⁽¹⁶⁾	Cerebral ischaemia	Asp299Gly Thr399Ile	1068	344	Not significant	Not significant
Zee et al ⁽¹⁷⁾	Myocardial infarction and stroke	Asp299Gly	695	695	Not significant	0.25
Rudofsky et al ⁽¹⁸⁾	Diabetic neuropathy	Asp299Gly Thr399Ile	530	246	Participants with SNPs have lower incidence of diabetic neuropathy	0.0002
Palmer et al ⁽¹⁹⁾	Allograft rejection	Asp299Gly Thr399Ile	174	ND	Participants with SNPs lower incidence of allograft rejection	0.05

Table 1: Summary of studies investigating the potential association of TLR4 SNPs with infectious disease

La modificación en la conformación del TLR4 a consecuencia de estos polimorfismos, podría modificar la cascada biológico-inflamatoria que ocurre tras la activación de este receptor. Polimorfismos en la región promotora de genes de varias citoquinas proinflamatorias vinculadas a la cascada de activación del TLR4 han sido asociados con diversas enfermedades de base inflamatoria. El camino de señalización del TLR4 descrito en la “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”, muestra como la activación del TLR4 culmina con la síntesis de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL1 β , IL6 e IL12 (Figura 8). A continuación se describen polimorfismos de estas citoquinas y su vinculación a enfermedades inflamatorias.

Polimorfismos de *IL6*

En humanos, el gen de la *IL6* está mapeado en el brazo corto del cromosoma 7 (7p21-24). El gen tiene una región promotora de 303 pares de bases en la que se han descrito diversos polimorfismos, siendo el -174G>C el de mayor prevalencia e importancia biológica (Wernstedt et al., 2004).

Para este polimorfismo existen tres posibles genotipos: G/G, G/C y C/C. El genotipo G/C ha sido el más prevalente en la mayoría de estudios poblacionales realizados hasta el momento mientras que el genotipo CC ha sido el menos frecuente. Como se ha reportado en diversos estudios, (Fishman et al., 1998; Licastro et al., 2003) cada genotipo afecta de modo diferente la transcripción del gen habiéndose relacionado el alelo G con una mayor transcripción del gen y con una mayor producción de IL-6. El polimorfismo -174G>C se ha relacionado con una prevalencia elevada de algunas enfermedades, entre las que se encuentran algunas de origen inmunológico, como la artritis crónica juvenil (Fishman et al., 1998) y el linfoma de Hodgkin, y enfermedades degenerativas como el Alzheimer (Licastro et al., 2003). Además, las variantes de este polimorfismo se han asociado de manera diferente con la obesidad y con sus comorbilidades, tanto las de origen metabólico, como la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus, y con patologías relacionadas directamente con el sistema cardiovascular, como la arterosclerosis (Chapman et al, 2003), el infarto agudo de miocardio y la hipertensión arterial (Vozarova et al., 2003).

Polimorfismos de *IL1β*

El gen de la *IL1β* en humanos está localizado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q14) (Nicklin et al., 1994). Se han reportado varios polimorfismos bialélicos en la región promotora de este gen. Una de las mutaciones más estudiadas de esta región corresponde al cambio de una adenina por una guanina en la posición -511 del promotor del gen, dando lugar a dos alelos denominados A y G. Estudios *in vivo* indican que células con al menos un alelo A presentan sobre-expresión (mayor actividad transcripcional), y niveles séricos elevados de *IL1β* con respecto a las que tienen el alelo G, y con ello una respuesta inflamatoria diferencial en diferentes enfermedades (Hwang et al., 2002; Hulkkonen et al., 2000). Sin embargo las investigaciones que han intentado establecer una asociación entre la respuesta inflamatoria en enfermedades y la presencia del polimorfismo -511 A/G de la *IL1β*, han tenido resultados variables en diferentes grupos poblacionales del mundo, lo que implica que la etnicidad de la población estudiada es un aspecto a considerar en este tipo de estudio (Wen et al., 2010; Chen et al 2006).

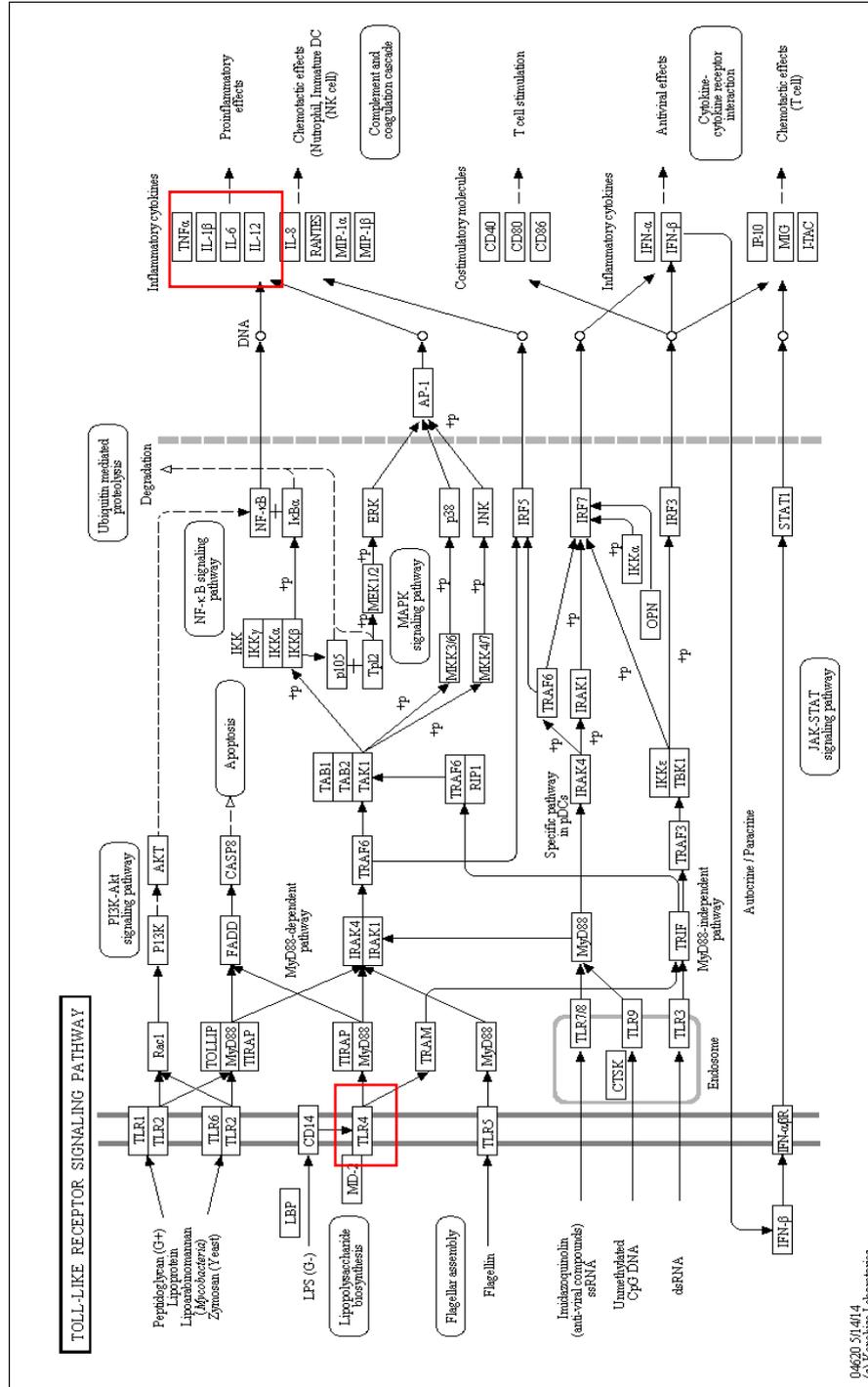
Polimorfismos del *TNFα*

En humanos, el gen de *TNFα* se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31). La transcripción de este gen se regula por una región promotora de 1100 pares de bases en la que existen varios SNPs. En particular, existe un polimorfismo bialélico que involucra el cambio de una guanina por una adenina en la posición -308 de la región promotora (Wilson et al., 1992), dando lugar a dos alelos denominados G y A. Se ha sugerido un mayor nivel de transcripción de *TNFα* en portadores del alelo A asociado a niveles elevados de esta citoquina (Abraham et al., 1999).

Se ha propuesto que este polimorfismo podría desempeñar un papel en la patogénesis de ciertas condiciones autoinmunes, tales como lupus sistémico eritematoso y artritis reumatoidea (Wilson et al., 1994; Winchester et al., 1992), así como con el desarrollo de diversas enfermedades metabólicas tal como resistencia a la insulina, diabetes *mellitus* tipo 2 y obesidad entre otras (Fernandez-Real et al., 1997; Herrmann et al., 1998) y en un grupo importante

de enfermedades o estados patológicos infecciosos, como shock séptico e insuficiencia respiratoria, infección ocular, infecciones gástricas entre muchas otras (Stuber et al., 1996; Wilson et al., 1995).

Figura 8. Cascada de señalización de los TLRs (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)



Hasta ahora hemos descrito el papel de la inmunidad innata mediada por TLR4 en el ovario, mostrando que este receptor participa en mecanismos y procesos fisiológicos de este órgano. Todos estos eventos están mediados por una red endocrino-inmunológica que funciona bajo un control regulado. Cuando este control se altera, los diversos procesos que ocurren en el ovario se modifican, pudiendo originar diferentes síndromes clínicos entre los que podría incluirse el síndrome de ovario poliquístico.

Síndrome de ovario poliquístico (SOP)

Diagnóstico

El síndrome de ovario poliquístico constituye un desorden reproductivo, endocrino y metabólico, que se presenta con gran heterogeneidad entre las mujeres que lo padecen, y cuya etiología permanece aún desconocida.

Irving Freiler Stein y Michael Leo Leventhal publicaron hacia 1935 un trabajo que mencionaba los hallazgos observados en cirugías exploratorias realizadas a mujeres obesas y/o hirsutas. Estos dos ginecólogos reportaron que los ovarios de estas mujeres tenían un tamaño mayor que el habitual, y contenían pequeños quistes llenos de fluido. Los autores correlacionaron estos hallazgos con características de masculinización observadas en estas mujeres (Stein et al., 1935).

El síndrome de ovario poliquístico, que por mucho tiempo llevo el nombre de síndrome de Stein y Leventhal, se presenta con gran heterogeneidad entre las pacientes. En la actualidad, se han utilizado diferentes aproximaciones en el intento de determinar los criterios para su diagnóstico.

En 1990 luego de un congreso internacional del "National Institute of Health" (NIH), se recomendó que en los criterios diagnósticos para el SOP debían de incluirse trastornos de la ovulación y evidencia de hiperandrogenismo (bioquímico, clínico (hirsutismo / acné) o ambos). En este consenso no se hizo referencia respecto de la morfología del ovario (Zawadski et al., 1992).

En 2003 se evaluaron nuevamente los criterios diagnósticos en un congreso conjunto de la “European Society of Human Reproduction and Embryology” (ESHRE) y la “American Society of Reproductive Medicine” (ASRM) y se incorporó la morfología ovárica como criterio diagnóstico. Por tanto, el consenso de Rotterdam definió como pacientes con SOP a aquellas mujeres que cumplan dos de las siguientes características: a) oligo-anovulación, b) hiperandrogenismo clínico o bioquímico, y c) morfología de ovarios poliquísticos (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004) (Anexo 1).

En 2006, la “Androgen Excess PCOS Society” (AEPCOS) concluyó que el SOP constituye un trastorno basado principalmente en el hiperandrogenismo, y por tanto determinó que la presencia de hirsutismo/acné y/o hiperandrogenismo bioquímico constituye una condición *sine qua non* para el diagnóstico del SOP. El segundo criterio para el diagnóstico según la AEPCOS podría ser tanto la anovulación crónica ó la morfología de ovario poliquístico, sin distinguir un orden de relevancia entre ninguno de estos dos criterios (Azziz et al., 2009).

En el anexo 2 se resumen los criterios de inclusión y exclusión para el diagnóstico del SOP según cada consenso.

Las tres clasificaciones coinciden en la necesidad de descartar patologías asociadas al hiperandrogenismo tales como el síndrome de Cushing y la hiperplasia suprarrenal congénita, así como patologías que causan anovulación, como la hiperprolactinemia, y que pudieran confundir el síndrome.

La presencia de tan numerosos criterios ha llevado a definir diversos fenotipos asociados al SOP. En 2011, en un Taller de la ESHRE/ASRM sobre el SOP se identificaron cuatro fenotipos diferentes:

Fenotipo A: Mujeres con hiperandrogenismo, oligoanovulación y ovarios de morfología poliquística tras ecografía transvaginal.

Fenotipo B: Mujeres con hiperandrogenismo y oligoanovulación pero sin imagen de ovarios de morfología poliquística tras ecografía transvaginal.

Fenotipo C: Mujeres con hiperandrogenismo, con ciclos ovulatorios y ovarios de morfología poliquística tras ecografía transvaginal.

Fenotipo D: Mujeres normoandrogénicas con oligoanovulación y ovarios de morfología poliquística tras ecografía transvaginal.

La diversidad en cuanto a los fenotipos existentes de SOP vuelve arduo su diagnóstico certero. Esta dificultad se vuelve aun más compleja, ya que los especialistas difieren en cuanto a la relevancia de cada uno de los criterios diagnóstico. Mientras que los ginecólogos consideran que la imagen ecográfica de ovarios poliquísticos es una herramienta esencial para el diagnóstico del síndrome, la opinión de los endocrinólogos está más centrada en el hirsutismo y la anovulación (The Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group, 2011).

Las pacientes con SOP presentan, asociados al síndrome, una serie de factores que aumentan el riesgo cardiovascular y que favorecen la aparición de hipertensión como son la obesidad, la dislipemia, la resistencia a la insulina (Ciaraldi et al., 2009; Hoeger 2001) y un estado proinflamatorio, que se caracteriza por la elevación de reactantes de fase aguda, como la proteína C reactiva (PCR), los leucocitos, y citoquinas (Orio et al., 2005; Oh et al., 2009).

La mayoría de las mujeres portadoras de SOP, principalmente aquellas que presentan sobrepeso, tienen resistencia a la insulina e hiperinsulinemia compensatoria. El exceso de insulina actúa en el ovario, estimulando la producción de testosterona en las células de la teca interna de los folículos del ovario, lo que origina el hirsutismo, la oligomenorrea, el acné, la anovulación crónica e infertilidad secundaria (Barbieri et al., 1984).

La obesidad de tipo visceral tan característica de las mujeres con SOP es favorecida por la resistencia a la insulina ya que promueve la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos especialmente en el área abdominal (Barbosa-Desongles et al., 2013).

Por todas estas anomalías metabólicas, las mujeres con SOP están expuestas a un alto riesgo de complicaciones como diabetes *mellitus* tipo 2, aterosclerosis

prematura, infarto y enfermedad coronaria (Legro et al., 1999; Orio et al., 2004). Las pacientes con fenotipo de hiperandrogenismo clínico o bioquímico son quienes presentan un mayor riesgo metabólico y cardiovascular a largo plazo.

El SOP en nuestro país

En Uruguay se ha realizado un único estudio sobre mujeres con SOP escrito en 2010 en el marco de una tesis de posgrado por la Dra. Ma. Laura Close (Close 2010). Se trata de un estudio descriptivo, retrospectivo, realizado con pacientes de la Policlínica de Endocrinología y Metabolismo del Hospital de Clínicas, en el que se analizaron diversos parámetros clínicos y bioquímicos asociados al SOP, y se los comparó con datos de la literatura mundial. Según Close, los datos recolectados acerca de las mujeres uruguayas con SOP no muestran diferencias con los datos de la bibliografía mundial respecto a edad, casos de insulino-resistencia, hiperandrogenismo clínico, dislipemia, oligo/amenorrea e imagen ecográfica de ovarios poliquísticos. Sin embargo, Close encontró en su trabajo un porcentaje de obesidad entre las mujeres con SOP que resultó ser significativamente elevado en comparación con datos de la literatura mundial.

En el desarrollo de su trabajo, Close encontró varias limitantes. Entre ellas destaca la falta de ciertos estudios hormonales para la valoración del diagnóstico de SOP, así como una sobre-evaluación de las ecografías ya que se diagnostican como ovarios poliquísticos imágenes que no siguen los parámetros de diagnóstico. Como conclusiones de su trabajo, Close determinó que el SOP en las mujeres uruguayas representa un importante factor de riesgo cardiovascular, y que por tanto estas alteraciones metabólicas deben ser estudiadas y detectadas precozmente. Sugiere realizar pruebas de “screening” para diabetes mellitus a todas las pacientes con SOP debido al riesgo de intolerancia a la glucosa y diabetes observada en la población estudiada. Por último plantea como desafío para futuros estudios analizar si las alteraciones metabólicas del SOP varían de acuerdo a la expresión fenotípica del síndrome para poder determinar el riesgo específico sobre el pronóstico reproductivo, cardiovascular y neoplásico de cada uno de los fenotipos del SOP.

Patogénesis

Si bien la causa del SOP es desconocida, la evidencia indica que se trata de una enfermedad multifactorial, y que la susceptibilidad individual a desarrollar el síndrome está determinada por factores de riesgo tanto ambientales como genéticos.

Factores ambientales asociados al SOP

Los factores ambientales asociados al SOP pueden ser clasificados como prenatales (programación durante el desarrollo fetal) o post-natales (dieta, obesidad, estilo de vida sedentario, toxinas ambientales) (Diamanti-Kandarakis et al., 2006).

En la etapa prenatal, un exceso en los niveles de hormonas esteroideas (glucocorticoides o andrógenos) puede tener modificaciones epigenéticas que expliquen la base molecular del SOP (Wells 2011, Longo et al., 2013).

El exceso de glucocorticoides y andrógenos en la circulación fetal resulta en restricción del crecimiento intra-uterino, y resulta en el nacimiento de un niño de bajo peso. Generalmente, estos niños muestran un crecimiento compensatorio postnatal durante los primeros dos años de vida, que se asocia con diversas patologías tales como pubertad precoz, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, dislipidemia, obesidad, síndrome metabólico y SOP (Ibañez et al. 1998; Bonamy et al., 2008; Martínez-Aguayo et al., 2007).

Sin embargo, el hiperandrogenismo adrenal puede ocurrir a nivel de la circulación materna en mujeres obesas, con resistencia a la insulina, diabetes mellitus, el SOP y/o cualquier otra condición asociada a un exceso de andrógenos. Se postula que el hiperandrogenismo durante la vida intrauterina tiene efecto sobre la programación de la unidad hipotálamo-hipofisaria, favoreciendo el exceso de secreción de LH y conduciendo al desarrollo de la obesidad abdominal y la consecuente resistencia a la insulina que pueden alterar la función ovulatoria, causando anovulación (Escobar-Morreale et al., 2014; Sir-Petermann et al., 2009).

Respecto a los factores post natales, se ha observado que los hábitos de dieta, el ejercicio físico y los factores culturales, sociales y económicos pueden modificar la prevalencia de las condiciones metabólicas asociadas al SOP. La importancia de los factores ambientales en el desarrollo del SOP queda en evidencia cuando se produce un cambio en el estilo de vida que modifica por ejemplo, la obesidad. La pérdida de entre el 2 y el 5% del peso corporal reduce la hiperinsulinemia, los niveles circulantes de andrógenos, restaura la ciclicidad del ovario y mejora los desordenes clínicos tales como la dislipemia (Escobar-Morreale 2006)

Factores genéticos asociados al SOP

Existe evidencia que sugiere que el síndrome de ovario poliquístico es heredable. Mientras que algunos estudios genéticos sugieren un modo de herencia autosómico dominante, otros han demostrado que es más probable que tenga una base oligogénica (Cooper et al., 1968).

A la fecha, se han realizado esfuerzos para identificar genes que influyan en la susceptibilidad del SOP. Entre los genes candidatos se han propuesto genes vinculados a los eventos o procesos alterados en el SOP. Entre ellos se encuentran genes vinculados a la esteroidogénesis, relacionados con las gonadotropinas, vinculados con la secreción y acción de la insulina, y genes relacionados con la inflamación crónica (Goodarzi et al., 2006)

Genes candidatos involucrados en la esteroidogénesis

Entre los genes que se postulan para esclarecer la etiología genética del síndrome, se encuentran aquellos que codifican para enzimas que participan en la síntesis de andrógenos, 2 de estos genes son los que codifican para la enzima 17 α hidroxilasa o citocromo P45017, y para el citocromo P450 (Urbanek et al., 1999). Existen publicaciones que avalan una expresión aumentada de P45017 y P450 en las células de la teca de ovarios de mujeres con SOP (Qin et al., 1998; Gharani et al., 1997). Los genes que codifican dichas enzimas presentan polimorfismos que se han asociado con niveles diferenciales de transcripción, considerándolos como potenciales marcadores

de riesgo genético para el desarrollo del fenotipo hiperandrogénico en pacientes con SOP.

Genes candidatos relacionados con las gonadotropinas y su receptor

En un trabajo multicéntrico realizado con mujeres finlandesas, holandesas, británicas y estadounidenses (n= 1 466) con diagnóstico de SOP y mujeres sanas, se investigó la presencia de 2 mutaciones puntuales en el gen que codifica para la LH y da una forma variada de la hormona, sin encontrar una asociación con el SOP (Tapanainen et al., 1999). Existe en la literatura otro estudio realizado en adolescentes con SOP, en el cual se analizaron 2 polimorfismos en el gen que codifica para el receptor de la FSH, que afectaría la señal de transducción. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre casos y controles (Unsal et al., 2009). Los estudios al respecto a este grupo de genes candidato aún no ofrecen resultados concluyentes.

Genes candidatos involucrados con la secreción y la acción de la insulina

La insulinorresistencia se ha involucrado con el SOP, y en la actualidad se han estudiado múltiples genes implicados en esta condición y su asociación al SOP como ser el gen del receptor de insulina (Siegel et al., 2002), de la enzima calpaina-10 (relacionada con secreción y acción de la insulina) (Ehrmann et al., 2002), entre otros. Si bien muchos de los resultados son contradictorios y no concluyentes, las alteraciones en el gen del receptor para la insulina son los que hasta el momento tienen mayor peso.

Genes relacionados con la inflamación crónica

Diversos genes involucrados en la inflamación crónica tales como *TNF α* , *IL6* e *IL1 β* se han estudiado en relación al SOP obteniendo resultados controversiales.

Respecto al polimorfismo -511 de la *IL1 β* , resultados reportados en estudios realizados con mujeres caucásicas y asiáticas no asocian el polimorfismo (-511 C/T) de la IL-1beta y el SOP (Kolbus et al., 2007 y Mu et al., 2010). Sin

embargo, un trabajo realizado con una población de mujeres chinas con SOP si encuentra que el alelo A de este polimorfismo es más frecuente en mujeres con SOP que control. (Xia et al., 2013). La IL6 es otra citoquina que ha mostrado resultados controversiales respecto a los análisis de asociación del polimorfismo del promotor (-174) y el SOP. En un estudio realizado con una población de mujeres turcas concluyeron que este polimorfismo se asocia con el SOP (Erdogan et al., 2008) mientras que en otro trabajo realizado con mujeres caucásicas con SOP no se encontró asociación con este polimorfismo de la IL6 (Walch et al., 2004). Finalmente, en cuanto a las publicaciones respecto del polimorfismo en la región promotora del gen de TNF alfa (-308), los resultados no han mostrado asociación del polimorfismo y el SOP en estudios realizados con pacientes con SOP provenientes de poblaciones australianas, caucásicas e indias (Bhagat et al., 2010; Pujhari et al., 2012; Yun et al., 2011).

Sin embargo, hasta el momento, no existe ningún gen ni polimorfismo genético universalmente aceptado como único candidato en la etiología del síndrome. Se han realizado estudios de asociación de genoma completo (GWAS: genome-wide association studies) en mujeres con SOP provenientes de poblaciones chinas, estadounidenses y europeas (Chen et al., 2011a; Chen et al., 2011b; Shi et al., 2012). Sin embargo, los resultados encontrados no se confirmaron en un estudio realizado con un grupo de mujeres coreanas (Hwang et al., 2012). Los autores plantean que dichas discrepancias pueden deberse a diferencias en el background genético de las poblaciones estudiadas así como la inclusión de mujeres con diferentes manifestaciones clínicas y metabólicas del SOP.

En suma, existe evidencia que demuestra que el funcionamiento del ovario presenta mecanismos de regulación neuro-inmuno-endocrina, que al alterarse provocan cambios funcionales en el órgano, pudiendo incluso derivar en eventos patológicos.

Justificación

Las alteraciones del crecimiento folicular características del SOP podrían estar mediadas por los receptores tipo Toll 4 así como por moléculas vinculadas a su cascada inflamatoria. En base a los antecedentes presentados sobre la asociación de polimorfismos genéticos del *TLR4* y citoquinas tales como *IL1 β* , *IL6* y *TNF α* , y su implicancia en la susceptibilidad de desarrollar diversas enfermedades de base inflamatoria, planteamos la siguiente hipótesis.

Hipótesis

El TLR4 está implicado en los procesos vinculados al SOP y los polimorfismos genéticos de este gen, así como polimorfismos en los genes de moléculas inflamatorias relacionadas a su cascada de señalización están asociados al SOP en mujeres uruguayas.

Objetivo general

Evaluar si el Síndrome de Ovario Poliquístico se relaciona con procesos inflamatorios en los que esté implicada la vía de señalización del TLR4.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar fenotípicamente la población uruguaya de mujeres con SOP
- 2) Estudiar la presencia de los polimorfismos rs4986790 y rs4986791 (gen *TLR4*), rs16944 (gen *IL1 β*), rs1800795 (gen *IL6*) y rs1800629 (gen *TNF α*) en una cohorte de mujeres con SOP y otra de mujeres controles
- 3) Analizar el fenotipo de células de la granulosa de mujeres con SOP o control, y su capacidad de sintetizar moléculas inflamatorias

Material y métodos (de acuerdo a los objetivos)

Población de estudio

Las mujeres que ingresaron a protocolo para el estudio fueron aquellas mujeres que cumplieron con los criterios diagnósticos para SOP (n=92) según el criterio de Rotterdam (2003) quedando excluidas otras causas de hiperandrogenismo y anovulación como la hiperplasia suprarrenal congénita u otras. Además se incluyó una cohorte de mujeres sin SOP como grupo control (n=125). Éstas presentaban una historia de ciclos menstruales regulares sin evidencia de hiperandrogenismo clínico, ni historia de diabetes tipo 2 en sus familiares en primer grado. Todas las mujeres que participaron de este estudio (tanto SOP como controles) fueron reclutadas de una Clínica de reproducción asistida privada (Centro de Esterilidad Montevideo) ó en la Policlínica de Endocrinología del Hospital de Clínicas.. Las participantes fueron informadas acerca del estudio y firmaron ficha de consentimiento aprobada por el comité de ética de la Facultad de Medicina (Exp. No. 071140-000980-08, Anexo 3).

Para cumplir con el objetivo de **caracterizar fenotípicamente las mujeres uruguayas con SOP**, se diseñó un formulario (Anexo 4) que incluyó:

- Datos personales: nombre, CI, edad
- Antecedentes personales: diabetes, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, tabaquismo
- Antecedentes familiares: diabetes, SOP, esterilidad
- Datos clínicos: ciclos menstruales e historia reproductiva
- Examen físico: hirsutismo, acné, peso, talla, perímetro abdominal
- Exámenes paraclínicos:
 - i) Datos de ecografía de ovarios
 - ii) Datos hormonales (hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), estradiol (E2), hormona anti-mulleriana (AMH), prolactina (PL), testosterona total (T), testosterona libre, hormona estimulante de la tiroides (TSH), 17-OH progesterona, DHEA

Para cada paciente se calculó el índice de masa corporal (IMC), como el cociente entre el peso en kilogramos y el cuadrado de la talla en metros (kg/m²). El IMC es un índice utilizado frecuentemente para clasificar el sobrepeso y la obesidad en adultos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el sobrepeso como un IMC igual o superior a 25, y la obesidad como un IMC igual o superior a 30.

Los datos de las pacientes fueron manejados de modo confidencial y anónimo, empleando un sistema de códigos.

Análisis estadístico

Las siguientes variables fueron comparadas entre grupos (mujeres control vs con SOP): edad, valores hormonales eIMC.

En aquellas variables que cumplieron con la normalidad, los datos provenientes de los dos grupos (fueron comparados mediante el test de t Student para determinar diferencias significativas entre éstos. En el caso de que los datos no cumplieran con alguno de los supuestos de la estadística paramétrica, se procedió a comparar los datos utilizando el test de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis no paramétrico. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativos valores de $P \leq 0.05$ (Sigmaplot 11.0).

Para cumplir con el **objetivo de estudiar la presencia de los polimorfismos rs4986790 y rs4986791 (gen del *TLR4*), rs16944 (gen de *IL1 β*), rs1800795 (gen de *IL6*) y rs1800629 (gen de *TNF α*) en una cohorte de mujeres con SOP y otra de mujeres controles**, se realizó:

Obtención de muestras

Las muestras biológicas de 92 mujeres con SOP y 125 mujeres control se tomaron por raspado de la mucosa yugal usando cepillos citológicos estériles e individuales (Sunway medical instruments co.). Una vez obtenida, la muestra se guardó a 4°C en un tubo eppendorff conteniendo 1 ml de PBS hasta su procesamiento. La extracción de ADN se realizó siguiendo un protocolo

modificado de extracción de ADN a partir de sangre total (Anexo 5). La cantidad y calidad del ADN extraído se analizó por espectrofotometría (Biophotometra, Eppendorf, Hamburg, Germany).

Análisis del ADN

El análisis de los polimorfismos del ADN se realizó mediante la técnica de HRM-Real time (PCR en tiempo real y curvas de disociación de alta resolución) empleando el Rotor-Gene 6000™ (Corbett Life Science, Sydney, Australia) y Eva Green (Type-it HRM PCR Kit, Qiagen, Hilden, Germany) como agente intercalante del ADN. En las curvas de HRM, las dos variantes homocigotas de un SNP se presentan con una curva de igual forma, pero se distinguen una de otra por un desplazamiento en el eje de temperatura. Por otro lado, la variante heterocigota exhibe un cambio en cuanto a la forma de la curva. Cualquiera de estos tres cambios resulta distinguible, y ocurren a consecuencia del cambio de un único nucleótido en la secuencia del gen, lo que genera una variación en la temperatura de desnaturalización (melting) del amplicón.

Se utilizó un sistema cuádruplex que permite analizar varios genes y sus polimorfismos en el mismo ensayo (rs4986790 de *TLR4*, rs16944 de *IL-1 β* , rs1800795 de *IL6*, rs375947 de *IL12R*) (Pereyra S et al., 2012). La mezcla para PCR, los cebadores empleados y el perfil de la reacción de PCR se detallan a continuación.

Ensayo cuádruplex

Mezcla para PCR:

1X Type-it HRM PCR Kit, (Qiagen, Hilden, Germany)

2.46 μ M de cada cebador del gen de *TLR4*

0.46 μ M de cada cebador del gen de *IL6*

0.26 μ M de cada cebador del gen de *IL1 β*

0.9 μ M de cada cebador del gen de *IL12R*

25 ng del templado de ADN

Volumen final de reacción de 10 μ l (agua cantidad necesaria)

Cebadores:

Número de referencia del SNP	Gen	Secuencia del cebador (directo 5'-3')	Secuencia del cebador (indirecto 5'-3')	Tamaño del producto de PCR (pb)	Tm del producto de PCR (°C)
rs4986790	<i>TLR4</i>	ATT TGA CCA TTG AAG AAT TCC G	TGT TGC CAT CCG AAA TTA TAA G	157	75.5°C
rs1800795	<i>IL6</i>	GCC TCA ATG ACG ACC TAA GC	GGG GCT GAT TGG AAA CCT TA	105	78°C
rs16944	<i>IL1β</i>	CTT GGG TGC TGT TCT CTG CCT C	CAA CTC CGT CAG GAG CCT GAA C	126	83°C
rs375947	<i>IL12R</i>	CTG CCA TTC AAT GCA ATA CG	CCC TGT AGG GTC AGG GGT AT	241	85°C

Perfil de la reacción de PCR

95°C por 5 minutos

95°C por 15 segundos
60°C por 1 minuto

} 35 ciclos

Rampa de HRM desde 72 a 88°C.

Por otro lado, para completar el análisis de los polimorfismos de interés, se diseñó un sistema dúplex (trabajo final de pasantía de grado de la Lic. Mariana Ford) que permitió el estudio de los polimorfismos *rs4986791* de *TLR4* y *rs1800629* de *TNF α* en simultáneo. La mezcla de la PCR, los cebadores empleados y el perfil de la reacción de PCR se detallan a continuación.

Ensayo dúplex

Mezcla para PCR:

1X Type-it HRM PCR kit (Quiagen Hilden, Germany)

1 μ M de cada cebador del gen de *TNF- α*

1 μ M de cada cebador del gen de *TLR4* Thr399Ile

25ng de ADN

Volumen final de reacción de 10 μ L (agua cantidad necesaria)

Cebadores:

Numero de referencia del SNP	Gen	Secuencia del cebador (directo) 5'-3'	Secuencia del cebador (indirecto) 5'-3'	Tamaño del producto de PCR (pb)	Tm del producto de PCR (°C)
rs1800629	<i>TNFα</i>	GGC AAT AGG TTT TGA GGG GC	GTC TTC TGG GCC ACT GAC TG	80	77
rs4986791	<i>TLR4</i>	TCA AGG TTG CTG TTC TCA AAG T	TGT TCT AGT TGT TCT AAG CCC A	118	82

Perfil de la reacción de PCR

95°C por 5 minutos

95°C por 15 segundos
60°C por 60 segundos } 35 ciclos

Rampa de HRM desde 74°C a 85°C.

Para ambos ensayos (cuádruplex y dúplex) se incluyeron individuos con genotipos homo y heterocigotos como controles en todos los experimentos. Las curvas de HRM fueron normalizadas y el genotipo fue asignado según la forma de la curva de HRM por el software del Rotor Gene y análisis visual. Los resultados de los genotipos obtenidos por HRM fueron validados realizando ensayos de RFLP (restriction fragment length polymorphism) para los cuales se usaron muestras de nuestro trabajo escogidas al azar.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software PLINK v1.07 (Purcell S et al., 2003). Para los SNPs considerados en este trabajo se realizó el análisis del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) utilizando un test exacto descrito por Wigginton JE et al., 2005. Los test de asociación caso-control fueron realizados mediante test de Chi cuadrado.

Para cumplir con el objetivo de **analizar el fenotipo de células de la granulosa de mujeres con SOP o control, y su capacidad de sintetizar moléculas inflamatorias**, se siguió la siguiente estrategia experimental:

Obtención de muestras

Para este estudio se utilizaron células de la granulosa (CG) del ovario de mujeres con SOP (n=6) y mujeres control (donantes de ovocitos, n=6) sometidas a tratamiento reproductivo de alta complejidad. Para la estimulación ovárica las pacientes fueron tratadas con análogos de GnRH, hormona folículo estimulante y gonadotrofina coriónica humana (hCG) para lograr el crecimiento de múltiples folículos. Luego de 36 horas de la administración de hCG se realizó el procedimiento mediante el cual se puncionaron los folículos maduros (> de 14 mm de diámetro) para aspirar el líquido folicular para obtener ovocitos para la técnica de fecundación *in vitro*. Normalmente, cuando se aspira el líquido folicular se aíslan los ovocitos y se descarta el remanente que contiene las células de la granulosa. El líquido folicular de descarte de las mujeres seleccionadas para este estudio, fue trasladado a nuestro laboratorio dentro de las dos primeras horas de obtenido. Las pacientes fueron informadas acerca del estudio y firmaron ficha de consentimiento (Anexo 3).

Preparación y estimulación de las células de la granulosa

Las células de la granulosa que se emplearon para este estudio ya habían comenzado el proceso de luteinización al haber sido estimuladas con hCG durante el tratamiento de la paciente. Las células granulosas fueron aisladas mediante centrifugación con gradientes de distinta densidad (AllGrad®, LifeGlobal) separándolas de las células sanguíneas y del líquido folicular según el protocolo descrito por Das M et al., 2008. Una vez aisladas las células fueron sembradas a una concentración de 7×10^4 células por pozo en una placa estéril de 24 pozos (Cellstar, greiner bio-one). Se agregaron 300 μ l de medio de cultivo DMEM (Life Technologies) suplementado con suero fetal bovino (10%) y antibiótico, y luego las células permanecieron sin cambios por 48 horas para permitir su adhesión a la placa de cultivo (Pellatt et al., 2007). Pasado este

tiempo el medio fue removido y reemplazado por medio fresco igualmente suplementado para iniciar los protocolos de estimulación.

Las células de la granulosa fueron cultivadas con o sin LPS (20 ng LPS Sigma: E. coli serotipo 055:B5). Luego de 24 horas de tratamiento, el medio fue removido y almacenado a -20 °C para el ensayo de ELISA. En cuanto a las células, se siguió un protocolo diferente según el experimento a realizar: inmunofluorescencia, microscopía electrónica de transmisión ó aislamiento de ARN mensajero.

ELISA

El medio del cultivo de células de la granulosa humanas provenientes de mujeres control o con SOP fue utilizado para detección de IL1 β por técnica de ELISA (Human IL-1 β ELISA Set II, BD OptEIA, BD Biosciences).

Para la preparación de las diluciones para la construcción de la curva estándar se siguieron las instrucciones del fabricante. Las diluciones que se incluyeron abarcaron un rango de concentraciones desde 3.9 pg/ml hasta 250pg/ml.

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos (ELISA plate, greiner bio-one) y se siguió el protocolo que se detalla en el anexo 6 según recomendaciones del fabricante. Para la lectura de las placas se utilizó el Multiskan EX (Thermo Scientific).

Inmunofluorescencia

Luego de remover el medio de cultivo, las células de la granulosa adheridas a la placa de cultivo se lavaron tres veces con PBS y fueron fijadas en solución de paraformaldehído en PBS al 4% por 15 minutos. Posteriormente el fijador fue removido, se lavó nuevamente con PBS cada pozo, y se agregaron 200 μ l de solución de bloqueo (1x PBS-Tritón (0.25%)-BSA (2%)) y se incubó durante 1 hora. Posteriormente a cada pozo se añadió 200 μ l de anticuerpo policlonal de conejo anti-TLR4 (TLR4 H-80: sc-10741, Santa Cruz Biotechnology, Inc) en una dilución 1:100 en solución de bloqueo y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Cada pozo se lavó con 300 μ l de PBS tres veces durante 5 minutos cada vez, y se agregó 150 μ l por pozo de anticuerpo secundario de cabra anti-conejo biotinilado (Molecular Probes) en una dilución 1:500 y se dejó incubando

durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, luego de 3 lavados con PBS, se incubó con estreptavidina Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch laboratories) diluida en solución de bloqueo (1:300) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizaron tres lavados con PBS y se agregó ioduro de propidio (1:5000) diluido en PBS y se dejó la placa 10 minutos en un agitador a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente los pozos fueron lavados con PBS y se observaron y fotografiaron las células en un microscopio invertido de epifluorescencia (NIKON eclipse TS100).

Microscopía electrónica de transmisión

En los pozos de la placa de cultivo destinados a microscopía electrónica, se siguió el siguiente protocolo: se descartó el DMEM de cada pozo de la placa de cultivo y se lavó tres veces con 300 µl de PBS estéril. Las células se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato durante 1 hora, se despegaron con un scraper y se almacenaron en un tubo eppendorff de 1.5 ml a 4°C hasta su posterior procesamiento en el laboratorio de la Unidad de Microscopía electrónica de Transmisión de la Facultad de Ciencias. Allí, las células fueron posfijadas con tetróxido de osmio al 1% en agua y ferrocianuro de potasio al 1,5%, durante 1 a 2 horas, deshidratadas en alcoholes de concentración creciente, y embebidas en araldita. Los bloques conteniendo las muestras se polimerizaron en estufa a 58-60°C durante 48hs. Las secciones semi y ultra finas se realizaron en un ultramicrótomo RMC M-TX. Las secciones semifinas (300-400nm) fueron teñidas con azul de metileno borácico al 1%. Las secciones ultrafinas (50 a 70 nm) se contrastaron con una solución acuosa de acetato de uranilo a saturación, seguido de citrato de plomo. La observación se realizó en un microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL JEM -1010. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital Hamamatsu C-4742-95 y las mediciones del área de 100 gránulos intracelulares en cada grupo se realizaron con herramientas del programa Image J.

Aislamiento del ARN mensajero

Las células fueron despegadas de la placa de cultivo agregando 200 μ L de TRIzol® (Qiagen) en cada pozo, y almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento.

Para aislar el ARN total se siguió el protocolo de TRIzol® (Qiagen) (Anexo 7), ajustando los volúmenes según correspondiera. Se agregaron 40 μ l de cloroformo en cada pozo. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 12000g y la fase superior acuosa se transfirió a un tubo limpio, en el que se agregó 100 μ l de isopropanol por pozo y se agitó en vortex para mezclar. Se dejó a temperatura ambiente 10 minutos y se volvió a centrifugar a 12000g durante otros 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado obtenido (ARN) se trató con 200 μ l de etanol 75% por pozo. Se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos, se removió el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ARN que fue re-suspendido en 20 μ L de agua libre de RNAsas. La concentración de los ARN obtenidos se midió por espectrofotometría a 260nm (NanoDrop 1000 Thermo Scientific). Posteriormente se verificó la integridad de los ARNs en gel de agarosa 1% en buffer TBE 0.5X con Bromuro de Etidio para su visualización. Finalmente el ARN de cada muestra se almacenó a -80 °C hasta el momento de la retrotranscripción.

Retrotranscripción del ARNm

Para la retrotranscripción se utilizaron “random hexamer primers” (#SO142, Fermentas) y la enzima RevertAid Reverse Transcriptase, (Thermo Scientific). La reacción se realizó de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante (Anexo 8). Para ello se agregó en frío a un tubo eppendorf, un volumen equivalente a 0,2 μ g de “random hexamer primers”, 1 μ g de ARN total y agua tratada con DEPC hasta alcanzar un volumen final de 12,5 μ L. La mezcla fue incubada a 65°C durante 5 minutos y posteriormente colocada en frío. Se agregaron 4 μ L del buffer de reacción 5X de Thermo Scientific, una mezcla de dNTPs (cantidad suficiente para alcanzar una concentración final 1 mM de

cada nucleótido en el volumen final de reacción), 2µl del inhibidor de Ribonucleasas (Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor (#EO0381) y 1 µL (200 unidades) de la enzima transcriptasa reversa. La reacción fue llevada a un volumen final de 20µL con agua tratada con DEPC. La misma fue incubada durante 10 minutos a 25°C y luego 60 minutos a 42°C. Finalmente, se detuvo la reacción aumentando la temperatura a 70°C durante 10 minutos. El ADNc obtenido se guardó a -20°C.

Real time PCR

Expresión de ARN mensajero de *TLR4* en células de la granulosa humanas

Se realizó PCR real time para confirmar la expresión génica de este receptor en células de la granulosa humanas de mujeres control y mujeres con SOP. Tanto la mezcla para la PCR así como el perfil de la reacción fueron iguales a las descritas en el anexo 9. Los cebadores específicos utilizados fueron: 5´- AAG GCA TGC CTG TGC TGA GTT TGA AT- 3´ (directo); 5´ - TAT GCA GCC AGC AAG AAG CAT CAG GT -3´ (indirecto). Luego de finalizada la corrida de PCR los productos de amplificación se corrieron en gel de agarosa 2% en buffer TBE 0.5% durante 60 minutos a 90mV.

Cuantificación de la expresión génica

La cuantificación de la expresión génica se hizo con la técnica real time PCR cuantitativa (qPCR), usando Syber-Green como fluoróforo intercalante, y monitoreando la fluorescencia con el equipo "Rotor Gene 6000" de Corbett. Los genes de interés eran el *IL1β* y el *IL6*, y como gen de referencia se utilizó el *GAPDH*. En cada reacción, cada muestra se amplificó por duplicado y se corrió un control negativo (sin ADN).

Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. Para el análisis cuantitativo del producto, se analiza la curva de amplificación, la cual está constituida por tres fases: 1) fase de latencia donde la acumulación de producto

no se puede detectar, 2) fase exponencial y 3) fase de saturación, donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia. En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral (threshold) que representa el punto a partir del cual se produce un aumento significativo de la fluorescencia por encima de la fluorescencia de fondo. El Ct del inglés “cycle threshold”, cuya traducción es ciclo umbral, se determina por el punto de corte entre la línea umbral y la curva de amplificación, y es considerada una medida indirecta de la concentración del producto de PCR. El “threshold” puede determinarse manualmente por el investigador o automáticamente por el software. En este estudio, en todos los casos fue determinado manualmente.

Las reacciones de qPCR fueron llevadas a cabo utilizando el kit “Biotools QuantiMix EASY SYG KIT” (Biotools). Para ello se colocó para cada muestra en tubo eppendorf: 1µl ADNc, 7µl H₂O, 1µl cebador directo (20µM), 1µl cebador inverso (20µM), 10 µl de Biotools QuantiMix EASY SYG KIT. Cada par de cebadores para el estudio de cada gen fue optimizado para calcular la T_m y el número de ciclos que aseguraran que pudieran detectarse diferencias semi-cuantitativas de la expresión. Las combinaciones de cebadores fueron diseñadas usando el programa Primer 3 o fueron obtenidas de la literatura. Para PCR cuantitativa los cebadores se deben de diseñar de modo que la secuencia de al menos uno de ellos esté contenida en diferentes exones, o que el cebador directo y el indirecto se encuentren en diferentes exones. Además, se debe de tener en cuenta que el producto sea lo suficientemente corto para asegurar una óptima amplificación. Los parámetros utilizados en el termociclador así como la secuencia de los cebadores específicos utilizados para cada gen se muestran en el Anexo 9.

Curvas estándar para IL1B, IL6 y GAPDH

Se realizaron curvas estándar para los genes de interés como para el gen de referencia. Las curvas se realizaron a partir de diluciones seriadas de ADNc de células de la granulosa en cultivo. El rango de diluciones utilizado para la construcción de las curvas fue de 1, 1/10, 1/100. Los puntos de la curva se hicieron por duplicado.

Eficiencia de reacción

La eficiencia de la reacción se establece a partir de las curvas estándar, y se determina a partir de la pendiente de la curva del logaritmo de la concentración inicial del estándar (variable dependiente) y el Ct (variable independiente). La eficiencia (E) se calcula a partir de la siguiente reacción: $E=10^{-1/\text{pendiente}}$. Cuando la pendiente de la recta obtenida es cercana o igual a -3.32, la eficiencia de la amplificación es igual a 100%. Teóricamente el 100% corresponde la eficiencia máxima, donde la cantidad del producto de PCR se duplica en cada ciclo durante la fase exponencial.

Cálculo de la expresión génica relativa de IL1 β e IL6

El método empleado para el cálculo de la expresión relativa de los genes de interés fue el propuesto por Pfaffl MW, 2001. Este método toma en cuenta los cambios en las eficiencias de la amplificación y permite calcular de una manera más precisa la expresión relativa del gen de interés con respecto al gen de referencia (Gapdh). El modelo que proponen estos autores es el siguiente:

$$\text{expR} = \frac{(E_{GOI})^{(C_{T,GOI}^{Ctl} - C_{T,GOI}^{Exp})}}{(E_{Ref})^{(C_{T,Ref}^{Ctl} - C_{T,Ref}^{Exp})}}$$

Donde *expR*, expresión relativa; *EGOI*, eficiencia del gen de interés; *ERef*, eficiencia del gen de referencia; ΔC_{tGOI} , diferencia del Ct del gen de interés del grupo control menos el Ct del gen de interés del grupo experimental ($C_{tGOI}^{Ctl} - C_{tGOI}^{Exp}$); ΔC_{tRef} , diferencia del Ct del gen de referencia del grupo control menos el Ct del gen de referencia del grupo experimental ($C_{tRef}^{Ctl} - C_{tRef}^{Exp}$). Para nuestro trabajo los genes de interés/problema fueron IL1 β ó IL6, el gen de referencia fue el Gapdh. El grupo experimental fueron las mujeres con SOP mientras que el grupo control eran las mujeres control.

Análisis estadístico

Los datos de las variables que cumplieron con una distribución normal, provenientes de los dos grupos (mujeres control y con SOP) fueron comparados mediante el test de t Student para determinar diferencias

significativas entre éstos. En el caso de que los datos no cumplieran con alguno de los supuestos de la estadística paramétrica, se procedió a comparar los datos utilizando el test de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis no paramétrico. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativos valores de $P \leq 0.05$ (Sigmaplot 11.0).

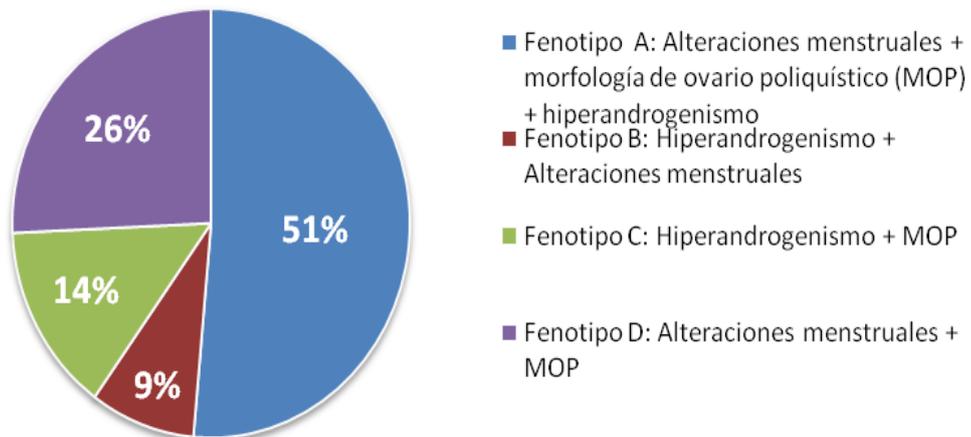
Resultados

❖ Caracterización fenotípica de las mujeres uruguayas con SOP

Diagnóstico de SOP

El diagnóstico de SOP de las mujeres consideradas en este estudio fue realizado por ginecólogos o endocrinólogos de cada servicio. En la Figura 9 se observa cómo se agruparon las mujeres con SOP según los 4 fenotipos descritos.

Figura 9. Distribución de las características de las mujeres uruguayas con SOP de acuerdo a los criterios diagnósticos de Rotterdam 2003.

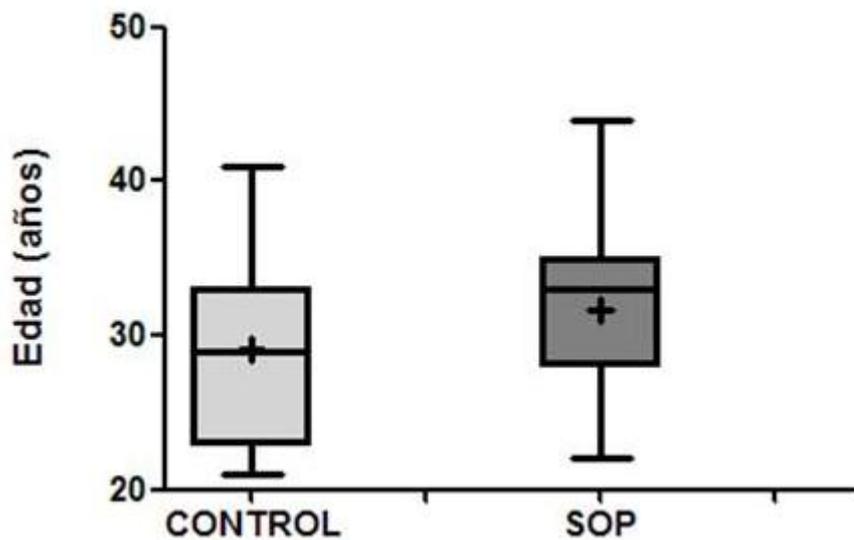


Rango etario

Respecto a la edad de las mujeres en cada grupo, la distribución de frecuencias mostró que el grupo de mujeres control presentaba una distribución homogénea de los individuos desde los 20 a los 35 años, mientras que en el grupo de mujeres con SOP la mayoría de las mujeres se encontraron entre los 30 y 35 años de edad.

La dispersión en las edades del grupo control fue mayor que en el grupo con SOP como queda evidenciado por la longitud de la caja. La edad mínima (21 vs 22) y máxima (41 vs 42) fue semejante entre los grupos. La media de las edades resultó diferente entre grupos, siendo 29.11 ± 0.87 años en las mujeres control y 31.87 ± 0.76 años en las mujeres con SOP (media \pm SEM, $p < 0.05$, Figura 10

Figura 10. Distribución de las edades en ambos grupos (control y SOP), la línea horizontal indica la mediana, el signo + indica la media.



Alteraciones metabólicas asociadas al SOP

Entre las mujeres con SOP de este estudio, la media del perímetro abdominal fue de 100.7 ± 20.13 (media \pm EE, cm). El 75% de las mujeres con SOP presentó un $IMC \geq 25$ Kg/cm^2 , que fue significativamente superior al 24% encontrado en el grupo de mujeres control ($p < 0.05$). Dentro del grupo de SOP con $IMC \geq 25$ Kg/cm^2 se encontró un 49% de mujeres con obesidad ($IMC \geq 30$ Kg/cm^2) y un 26% de mujeres con sobrepeso (con un IMC entre 25 y 29.9 Kg/cm^2). Del total de las mujeres con SOP, el 46% presentó hiperinsulinemia y el 15% presentó diabetes mellitus tipo 2.

Valoraciones hormonales

Las concentraciones plasmáticas de AMH, estradiol y LH fueron mayores en mujeres con SOP que en mujeres control (media \pm SEM, $p < 0.05$).

Las concentraciones plasmáticas de FSH y prolactina fueron semejantes entre grupos (Tabla 2). Los datos de testosterona total no pudieron ser comparados entre grupos por no contar con la dosificación de esta hormona en el grupo control.

En ambos grupos el rango de valores encontrados para todas de estas hormonas fue amplio, aunque solo el grupo de mujeres con SOP se constataron casos que mostraron niveles que superaban el valor máximo del nivel de referencia para la AMH, estradiol, LH, prolactina y testosterona total.

Tabla 2. Parámetros hormonales de las mujeres control y mujeres con SOP uruguayas. FSH: hormona folículo estimulante; LH: hormona luteinizante, E2: estradiol; AMH: hormona anti-mülleriana. (* $p < 0.05$) (Día 3 corresponde al tercer día luego del comienzo de la menstruación).

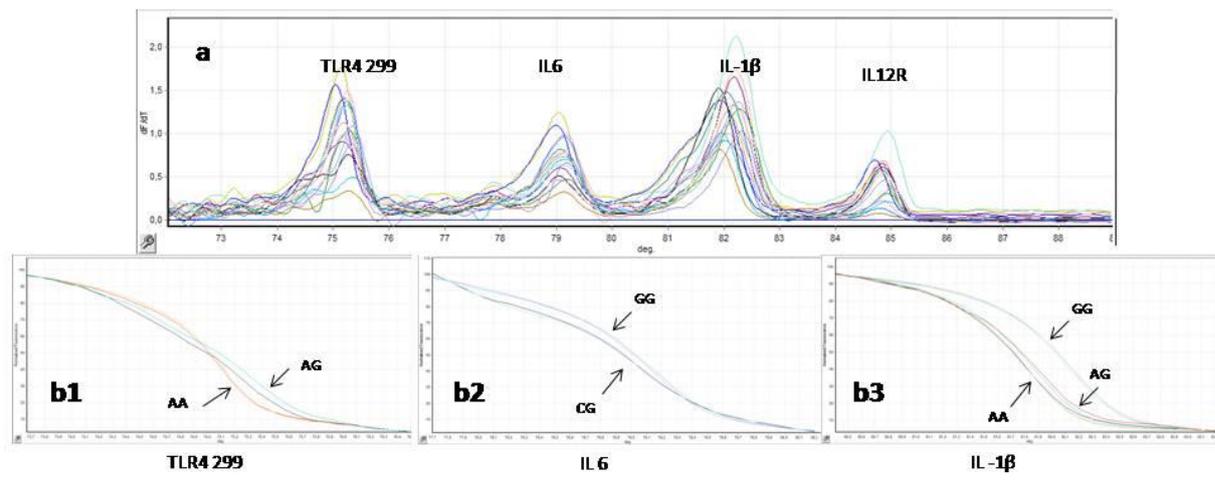
Concentraciones plasmáticas	Grupo (n)	Media (Mínimo – Máximo)	Error estándar	Valores de referencia
AMH (ng/ml)	Control (13)	1,74 (1,2 – 3,3)	0,18	< 3,75
	SOP (16)	4,87 * (0,8 – 8,0)	0,50	
E2 (pg/ml)	Control (13)	31,25 (16,2 – 46,9)	3,45	10 - 50
	SOP (10)	40,9* (10,0-63,0)	2,63	(día 3)
LH (IU/L)	Control (30)	4,98 (2,7 – 10,2)	0,37	2-12,6
	SOP (36)	7,26 * (2,3 - 17,7)	0,58	(día 3)
FSH (IU/L)	Control(30)	6,04 (3,5 -10,8)	0,28	3 - 14,4 (día 3)
	SOP (38)	6,24 (3,7 - 9,8)	0,36	
Prolactina (ng/dl)	Control (32)	10,89 (2,6 – 22,5)	0,97	1,9 - 25
	SOP (34)	14,50 (3,2 – 40,6)	1,60	
Testosterona total (ng/dl)	Control	--	--	0-119
	SOP (10)	77,2 (13,8 – 127)	16,85	

- ❖ **Estudio de la presencia de los polimorfismos rs4986790 y rs4986791 (gen del *TLR4*), rs16944 (gen de *IL-1β*), rs1800795 (gen de *IL6*) y rs1800629 (gen de *TNF α*) en una cohorte de mujeres con SOP y otra de mujeres controles**

Ensayo

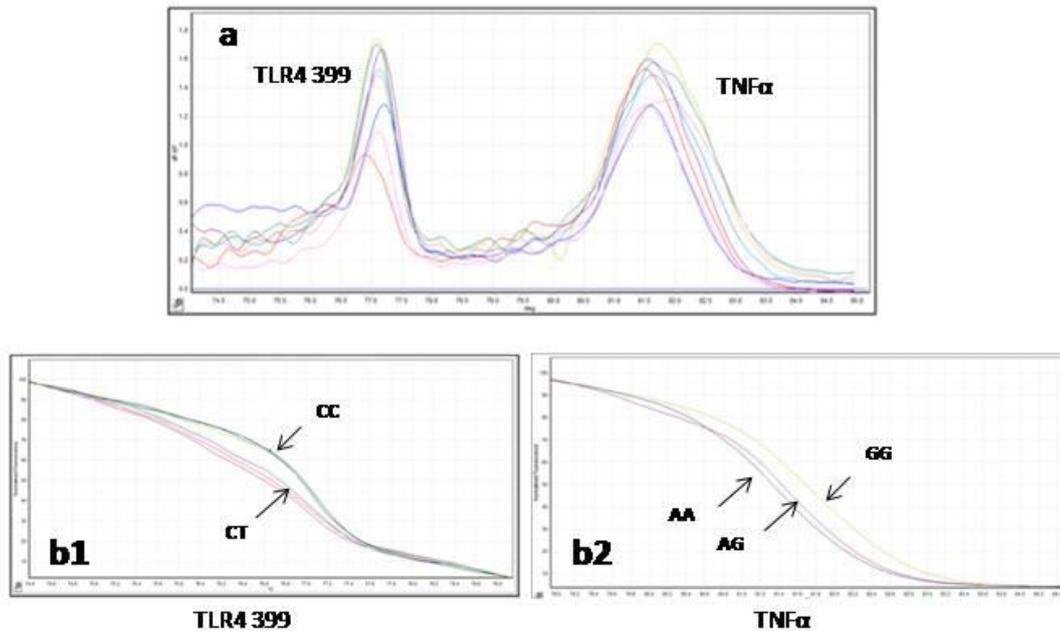
En el ensayo cuádruplex se observaron los cuatro amplicones correspondientes a *TLR4* ($T_m = 75.5^\circ\text{C}$), *IL6* ($T_m = 78^\circ\text{C}$), *IL1β* ($T_m = 83^\circ\text{C}$) e *IL12R* ($T_m=85^\circ\text{C}$) (Figura 9 a). Asignar los genotipos correspondientes para los SNPs rs4986790 (*TLR4* 299 A/G), rs1800795 (*IL6* -174 G/C) y rs16944 (*IL1β* -511 A/G) no presentó dificultad ya que las curvas de melting de cada genotipo de cada SNP resultaban distinguibles entre sí. Sin embargo no fue posible la asignación de genotipos para el SNP de *IL12R* ya que las curvas de melting no se distinguían entre los tres genotipos de este SNP, y por tanto el análisis de éste fue excluido del estudio. Del rs4986790 (*TLR4* 299 A/G) se encontraron individuos con el genotipo AA o AG (Figura 11b1), del rs1800795 (*IL6* -174 G/C) se encontraron individuos con el genotipo GG o CG (Figura 11b2), y para el SNPs rs16944 (*IL1β* -511 A/G) se encontraron los tres posibles genotipos de cada SNP entre la población estudiada (AA, AG, GG) (Figura 11b3).

Figura 11. a) Ensayo cuádruplex donde se distinguen los picos de HRM para cada amplicón (*TLR4*, *IL6*, *IL1 β* , *IL12R*) con temperaturas de melting diferenciadas, b) Perfil de HRM desnaturalizado para cada SNP (b1: rs4986790, b2: rs1800795, b3: rs16944) indicando como se distingue cada genótipo según la forma de la curva



En el ensayo dúplex, el primer amplicón corresponde a rs4986791 (*TLR 4 399*) con una T_m de 77°C y el segundo amplicón es rs1800629 (*TNF α*) con una $T_m=81.5^\circ\text{C}$ (Figura 12a). Para ambos SNPs las curvas de desnaturalización fueron distinguibles entre los genotipos encontrados. Para el SNP rs4986791 del *TLR4* se encontraron individuos con el genotipo CC o CT (Figura 12b1), y para el SNP rs1800629 del *TNF α* se encontraron los tres posibles genotipos (AA, AG, GG) (Figura 12b2).

Figura 12. a) Ensayo dúplex donde se distinguen los picos de HRM para cada amplicón (*TLR4*, *TNF α*) con temperaturas de melting diferenciadas, b) Perfil de HRM desnaturalizado para cada SNP (b1: rs4986791, b2: rs1800629) indicando como se distingue cada genotipo según la forma de la curva



Frecuencias genotípicas

Entre las mujeres control de este estudio se calcularon las frecuencias genotípicas de casa SNP. En la Tabla 3 puede observarse que la frecuencia de los homocigotas de rs4986791, rs4986790 y rs1800795 (89%, 88%, 60% respectivamente) fue mayor que la del heterocigota en cada caso (11%,12%, 40% respectivamente).

Para el SNPs rs16944 (*IL 1 β* -511 A/G) el genotipo con mayor frecuencia fue el heterocigota AG (46%) y para el rs1800629 (*TNF α* -308 G/A), el genotipo más frecuente fue el homocigota GG (78%).

Tabla 3. Frecuencias genotípicas del las mujeres uruguayas control

SNP	Gen	Genotipo	Genotipo	Genotipo
rs4986791	<i>TLR4</i>	CC 0.892	CT 0.108	TT 0
rs4986790	<i>TLR4</i>	AA 0.877	AG 0.123	GG 0
rs1800795	<i>IL6</i>	GG 0.598	GC 0.402	CC 0
rs16944	<i>IL1β</i>	AA 0.165	AG 0.463	GG 0.372
rs1800629	<i>TNFα</i>	AA 0.016	AG 0.207	GG 0.776

En la tabla 4 se presentan las frecuencias encontradas en nuestra población tanto en este trabajo como en el de Pereyra S et al., 2012, así como las reportadas en HapMap para poblaciones del mundo (europeos, hispánicos, mexicanos, caucásicos y chinos). Las frecuencias genotípicas encontradas en nuestro estudio para los SNPs rs4986790 (*TLR4* 299 A/G), rs16944 (*IL1 β* -511 A/G) y rs1800795 (*IL6* -174 G/C) concuerdan con las reportadas previamente por Pereyra et al., 2012 para la población uruguaya. Las frecuencias genotípicas de *TNF α* G/A y *TLR4* 399 C/T no habían sido reportadas previamente para la población de nuestro país.

Las frecuencias genotípicas encontradas en la población uruguaya no se asemejan a un único grupo poblacional, sino que se combinan entre varias y es variable según el SNP. Las frecuencias de los genotipos de los SNPs de *TLR4* Thr399Ile y de *IL6* -175 se asemejan principalmente a la población de mexicanos. Los datos encontrados de *TNF α* -380 e *IL1 β* -511 se asemejan principalmente a las frecuencias encontradas en europeos, mientras que los datos de *TLR4* Asp299Gly muestran que las frecuencias de los genotipos encontrados no son particularmente similares a ninguna población

Tabla 4. Frecuencias genotípicas de los SNPs de *TLR4* (rs4986791 y rs4986790), *IL6* (rs 1800795), *IL1 β* (rs16944) y *TNF α* (rs1800629) en la población de mujeres uruguayas control, y las reportadas para otras poblaciones (International HapMap Project).

Población	Gen	Genotipo	Genotipo	Genotipo
	<i>TLR4</i> C/T Thr399Ile	CC	CT	TT
HapMap-Europeos		0,920	0,071	0,009
HapMap-Mexicanos		0,878	0,122	
HapMap-Chinos		1		
HapMap-Yoruas		1		
Mujeres uruguayas		0,892	0,108	
	<i>TLR4</i> A/G Asp299Gly	AA	AG	GG
HapMap-Europeos		0,938	0,053	0,009
HapMap-Mexicanos		0,939	0,061	
HapMap-Chinos		1		
HapMap-Yoruas		0,92	0,080	
Pereyra et al 2012		0,936	0,064	
Mujeres uruguayas		0,877	0,123	
	<i>IL6</i> -174 G/C	GG	CG	CC
HapMap-Europeos		0,237	0,458	0,305
HapMap-Mexicanos		0,680	0,320	
HapMap-Chinos		1		
HapMap-Yoruas		1		
Pereyra et al 2012		0,688	0,312	
Mujeres uruguayas		0,598	0,402	
	<i>IL1β</i> -511 A/G	AA	AG	GG
HapMap-Europeos		0,145	0,400	0,455
HapMap-Mexicanos		0,240	0,520	0,240
HapMap-Chinos		0,233	0,488	0,279
HapMap-Yoruas		0,321	0,491	0,189
Pereyra et al 2012		0,138	0,523	0,339
Mujeres uruguayas		0,165	0,463	0,372
	<i>TNFα</i> -308 G/A	GG	AG	AA
HapMap-Europeos		0,673	0,310	0,018
HapMap-Mexicanos		0,880	0,120	
HapMap-Chinos		0,933	0,067	
HapMap-Yoruas		0,832	0,159	0,009
Mujeres uruguayas		0,776	0,207	0,016

Análisis de asociación genética

Se consideraron los genotipos de 92 casos (mujeres con SOP) y 125 controles. Al realizar el análisis se encontró asociación entre la presencia del SOP y los SNPs de *IL1 β* (-511 A/G) y *TNF α* (-308 G/A) ($p < 0.05$). La frecuencia del alelo menor (FAM) en las mujeres con SOP (*IL1 β* : 0.549, *TNF α* : 0.196) estuvo incrementada respecto a la FAM en las mujeres control (*IL1 β* : 0.396, *TNF α* : 0.119) (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de asociación alélica SOP-control para los SNP estudiados.
FAM: frecuencia del alelo menor

SNP	Gen	Alelo menor	FAM en SOP	FAM en controles	P-valor	OR	IC 95% OR
rs4986791	<i>TLR4</i>	T	0.056 (n=80)	0.054 (n=120)	0.928	1.04	0.43 - 2.49
rs4986790	<i>TLR4</i>	G	0.039 (n=76)	0.061 (n=114)	0.879	0.63	0.24 - 1.67
rs1800795	<i>IL 6</i>	C	0.158 (n= 82)	0.200 (n=122)	0.279	0.75	0.44 - 1.26
rs16944	<i>IL 1β</i>	A	0.549 (n=80)	0.396 (n=120)	<0.005	1.85	1.24 - 2.77
rs1800629	<i>TNF-α</i>	A	0.196 (n=79)	0.119 (n=121)	<0.05	1.79	1.03 - 3.11

En cuanto al equilibrio de Hardy Weinberg (HW) en la población estudiada, los SNPs rs4986790, rs4986791, rs16944 están en equilibrio de HW ($p > 0.05$) mientras que el rs1800629 (*TNF α*) y el rs1800795 (*IL6*) no lo están. Al considerar los grupos de casos y controles por separado, el test de equilibrio de HW del SNP de *IL6*, arrojó que el grupo con SOP se encuentra en equilibrio, mientras que el grupo control no. En el caso del SNP de *TNF α* el grupo control está en equilibrio y el grupo con SOP no lo está (Tabla 6).

Tabla 6. Test de equilibrio de Hardy-Weinberg para los SNPs de rs4986791, rs4986790, rs1800795, rs16944, rs1800629 en el total y cada uno de los grupos (SOP y control). (*p<0.05) HET: heterocigosidad (Medida de la variación genética de una población respecto a un locus particular. Se define como la frecuencia de heterocigotos para ese locus).

Gen	SNP	Grupo	Alelo menor	Alelo mayor	Observado (HET)	Esperado (HET)	P-valor
<i>TLR4</i>	rs4986791	Control	T	C	0.108	0.102	1
<i>TLR4</i>	rs4986790	Control	G	A	0.123	0.115	1
<i>IL 6</i>	rs1800795	Control	C	G	0.401	0.321	0.0035*
<i>IL1β</i>	rs16944	Control	A	G	0.462	0.478	0.707
<i>TNF-α</i>	rs1800629	Control	A	G	0.207	0.211	0.676

Para los polimorfismos que mostraron una asociación con el SOP (*IL1β* -511 A/G) y *TNFα* (-308 G/A) se realizó un análisis de asociación alélica comparando el grupo de mujeres con SOP normopeso (IMC <25 Kg/cm²) y las mujeres con SOP obesas (IMC≥25 Kg/cm²) sin encontrar diferencias estadísticas entre los grupos. El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg mostró que rs16944 y rs1800629 se encuentran en equilibrio (p>0.05) (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de asociación comparando las frecuencias alélicas de los SNPs rs16944 y rs1800629 en mujeres con SOP obesas vs mujeres con SOP normopeso.

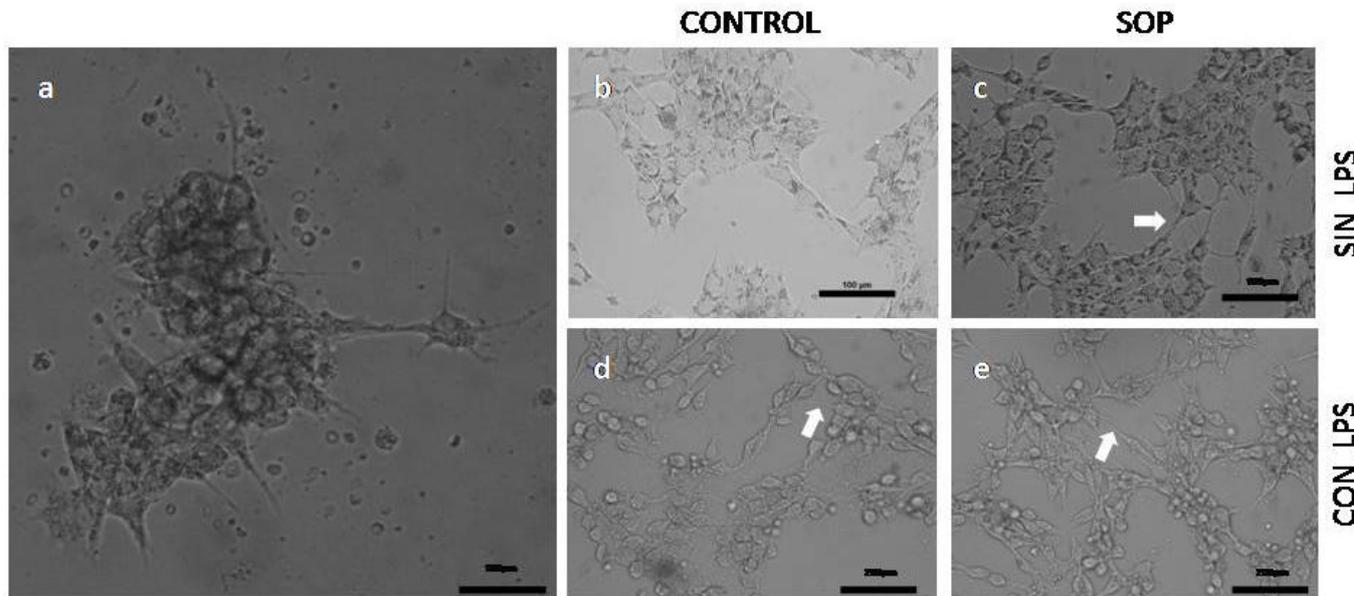
SNP	Gen	Alelo menor	FAM en SOP (IMC≥25)	FAM en SOP (IMC<25)	P-valor HWE	P-valor	OR
rs 16944	<i>IL1β</i>	G	0.403	0.454	1	0.675	0.81
rs 1800629	<i>TNFα</i>	A	0.150	0.318	0.311	0.089	0.38

❖ **Análisis del fenotipo de células de la granulosa de mujeres con SOP o control, y su capacidad de sintetizar moléculas inflamatorias**

Cultivo de células de la granulosa

Al comienzo del cultivo, las células de la granulosa provenientes de mujeres control y con SOP se agrupaban en racimos tridimensionales (Figura 13a) adheridos al fondo de la placa de cultivo a través de una zona de este racimo, mientras que el resto del mismo flotaba verticalmente. Luego de 48 horas del cultivo, las células perdieron esta disposición en racimos y conformaron una monocapa. Las células extendidas en el fondo de la placa de cultivo presentaron una morfología de tipo epiteloide, con un núcleo oval de disposición central y nucléolo evidente, con gran cantidad de gotas intracelulares (gránulos). Las células crecieron en grupos compactos (Figura 13 b, c, d, e) con proyecciones citoplasmáticas que conectaban los grupos celulares entre sí (Figura 13, flecha). Al microscopio óptico, no se evidenciaron diferencias en la morfología de células en cultivo provenientes de mujeres control (Figura 13b) o mujeres con SOP (Figura 13c). Luego del tratamiento con LPS las células tampoco mostraron variación en su morfología (Figura 13d, e).

Figura 13. Células de la granulosa en cultivo. a) Racimos tridimensionales. Cultivos sin LPS (b: control; c: SOP). Cultivos con LPS (d: control; e: SOP). Flechas: puentes citoplasmáticos entre grupos de células. Escala: a, b, c) 100 μ m. d, e) 200 μ m

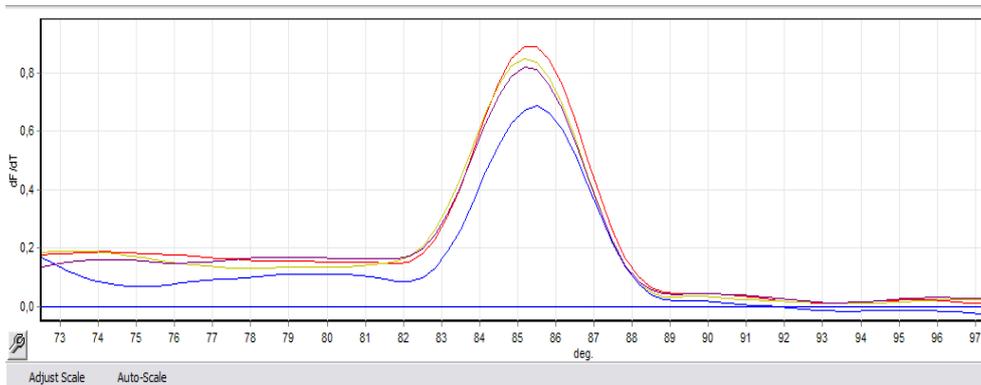


Expresión del TLR4 en células de la granulosa

Amplificación por PCR real time

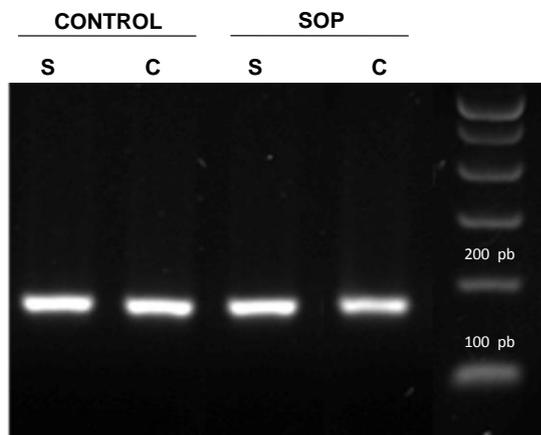
Las muestras de una mujer control y de una mujer con SOP (tratadas con o sin LPS) fueron analizadas en un ensayo de amplificación a partir de ADNc obtenido por retro-transcripción de ARN proveniente de células de la granulosa humanas en cultivo de estas mujeres. Las curvas de HRM mostraron un producto único de amplificación de Tm igual a 85.5 °C correspondiente al amplicón de *TLR4* para las cuatro muestras analizadas (Figura 14).

Figura 14. Imagen representativa de las curvas de “melt” obtenidas por HRM para el *TLR4* en células de la granulosa humanas.



Un estudio cualitativo de la expresión de *TLR4* en las células de la granulosa se hizo mediante la electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR en tiempo final obtenidos luego de culminada dicha corrida de PCR, que mostró bandas de aproximadamente 150 pb correspondientes al amplicón de *TLR4*. Se comprobó además que el *TLR4* se expresó en células de la granulosa en condiciones de cultivo basales (sin LPS) y también en células que recibieron estimulación con LPS (Figura 15).

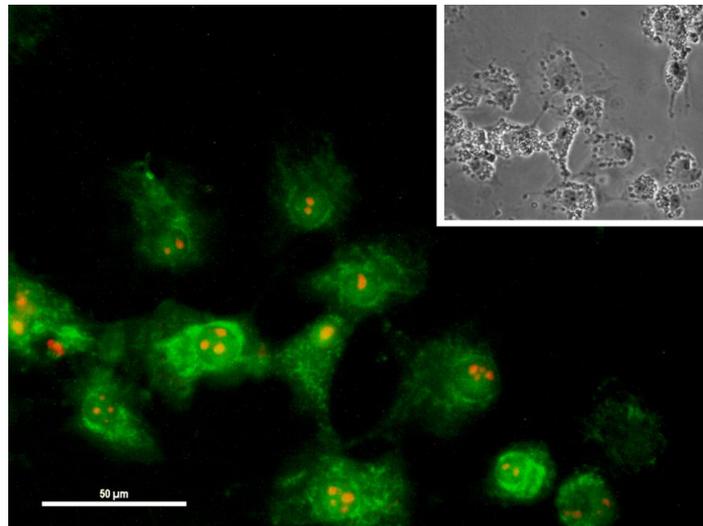
Figura 15. Fotografía del gel tras la electroforesis de los productos amplificados por PCR real time visualizados empleando bromuro de etidio. (S: sin tratamiento con LPS; C: con tratamiento con LPS)



Inmunofluorescencia del TLR4

La expresión de la proteína de TLR4 se detectó en células de la granulosa humanas empleando un anticuerpo de conejo anti-TLR4. La señal (verde) se localizó en toda la superficie celular, observándose una intensidad mayor en la región perinuclear (Figura 16). Los controles negativos no mostraron marcaje, indicando la especificidad del anticuerpo.

Figura 16. Inmunolocalización de TLR4 en células de la granulosa humana. A distintos aumentos se observa la expresión de TLR4 en toda la superficie celular (verde), y la zona nuclear marcada con ioduro de propidio (rojo). Escala: a) 100 μm , b) 50 μm .

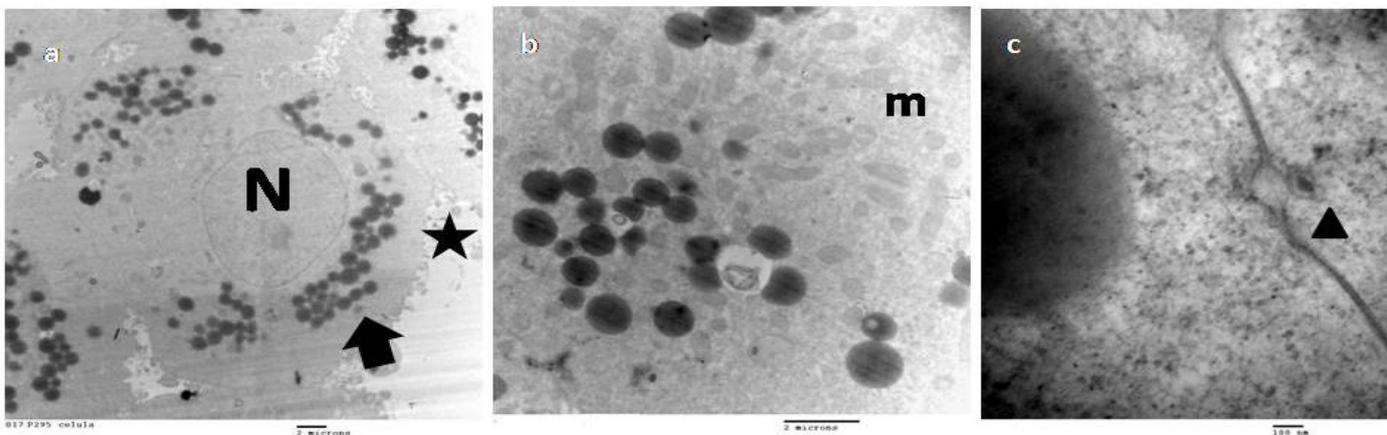


Análisis de la ultraestructura de las células de la granulosa

El análisis subcelular mediante microscopía electrónica para una caracterización más detallada de las células de la granulosa en los dos grupos de mujeres (SOP y control) mostró células con núcleo redondeado y eucromático con un citoplasma pálido que contenía cantidades variables de gránulos osmio-fílicos de diferente tamaño y electro-densidad (Figura 17a). Las mitocondrias mostraron variaciones en su forma (Figura 17b). Se observaron

microvellosidades en la superficie libre de la membrana celular (Figura 17a), mientras que entre las membranas de células adyacentes se encontraron complejos de unión intercelular (Figura 17c).

Figura 17. Ultraestructura de células de la granulosa de una mujer control. (N: núcleo), (m: mitocondrias), (flecha: gránulos), (▲ unión intercelular), (★: microvellosidades). Escala: a, b) 2 micras, c) 100 nm.

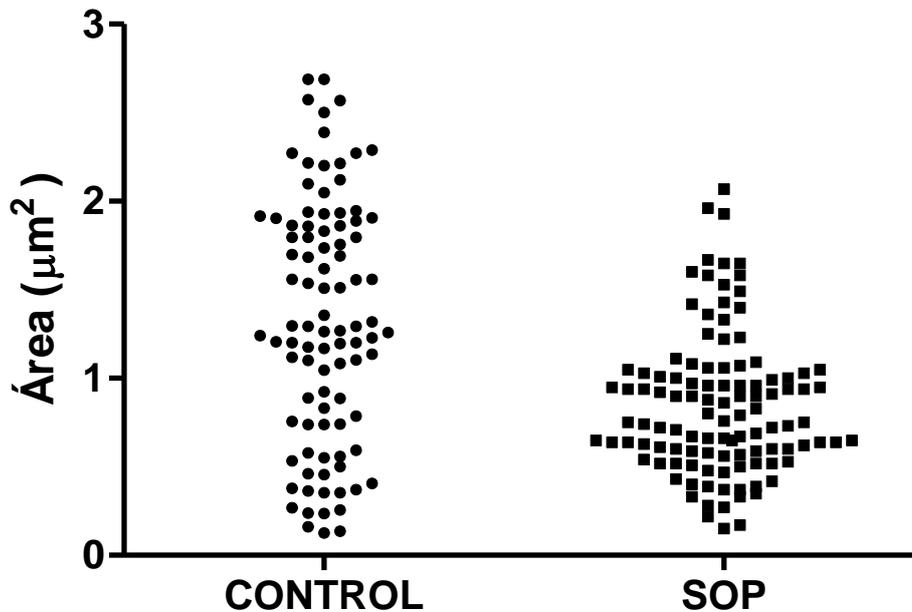


Se midió el área de 100 gránulos electrondensos de las células de la granulosa en secciones correspondientes a muestras de los grupos con SOP y control, considerando aquellos gránulos que aparecían completos y sin artefactos.

El área de los gránulos resultó muy variable dentro de cada grupo. Sin embargo, el rango de medidas (mínimo y máximo) resultó semejante en ambos casos (0.13-2.70 μm en muestra control; 0.15-2.10 μm en muestra con SOP). Los datos de las áreas de gránulos del grupo control mostraron mayor dispersión comparados con los valores de las áreas de gránulos del grupo con SOP.

El área de los gránulos resultó diferente entre las muestras, siendo los gránulos de células SOP (media \pm EE: 1.324 \pm 0.07) menores respecto a los de células control (0.8496 \pm 0.04) (Figura 18).

Figura 18. Área de los gránulos electrondensos de las células de la granulosa de mujeres control y mujeres con SOP (gráfica representativa de dos pacientes)



Análisis de la expresión génica por PCR tiempo real

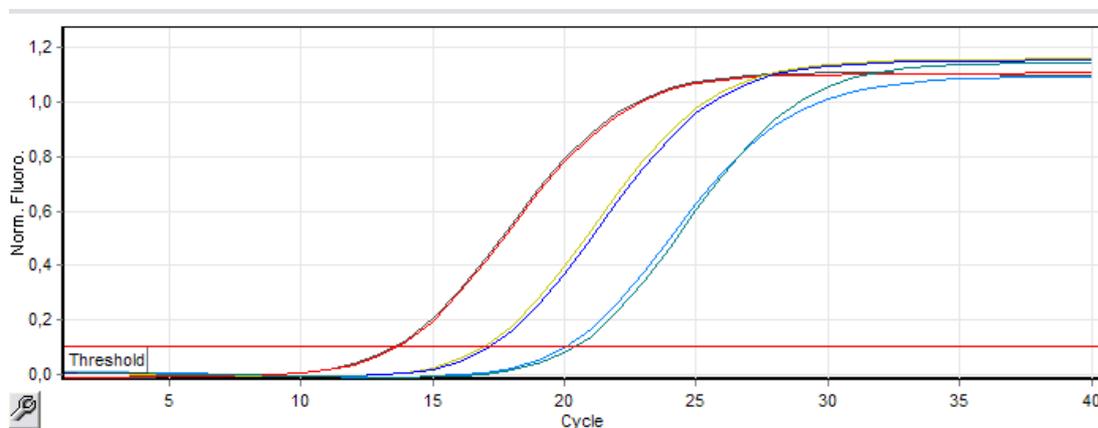
Para la cuantificación de los cambios relativos en la expresión génica utilizando PCR en tiempo real se siguieron las siguientes consideraciones:

1. La eficiencia de la reacción debe ser similar para el gen problema y el gen reportero

La eficiencia de amplificación se comprobó realizando curvas estándar para cada uno de los genes en estudio, con diluciones crecientes del ADNc extraído de células de la granulosa. Los resultados obtenidos para las diluciones seriadas mostraron una relación constante de separación entre las curvas de amplificación para todos los casos. A modo de ejemplo se muestran las curvas obtenidas para el gen reportero *GAPDH* (Figura 19).

Empleando el software del Rotor Gene se graficaron los valores de Ct en función de la concentración de los estándares utilizados, y a partir de la curva se obtuvo la eficiencia de la reacción

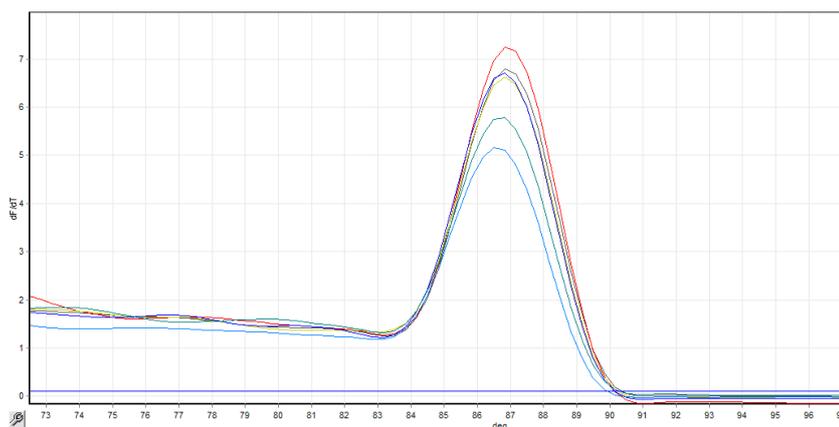
Figura 19. Curva de amplificación de los estándares para el gen reportero (*GAPDH*). Se grafica la fluorescencia en función de los ciclos de la PCR. Las curvas que se observan corresponden a los duplicados de los estándares. La línea horizontal corresponde al “threshold” fijado manualmente.



2. Cuando se utilizan intercalantes fluorescentes (en este caso Syber green) las curvas de disociación deben mostrar un único producto en el rango de T_m esperado.

Se realizó el ensayo para IL1 β , IL6 y el gen reportero GAPDH, obteniendo en cada caso una curva única. Se muestra a modo de ejemplo las curvas de melting de varias muestras amplificadas con cebadores del gen reportero GAPDH. Se observa un único amplicón con una T_m aproximada de 87°C (Figura 20).

Figura 20: Curvas de melting: amplicón único del gen reportero GAPDH ($T_m=87^\circ\text{C}$).



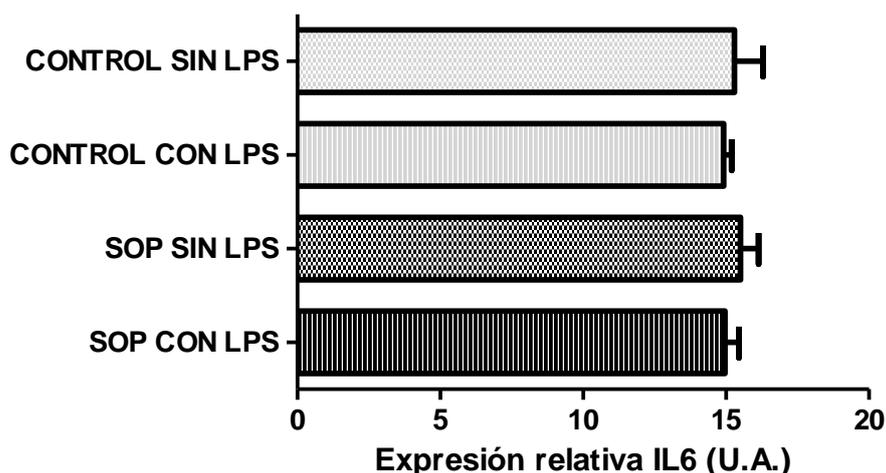
Cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés

En estos ensayos se utilizaron únicamente muestras que tuvieran una concentración y calidad de ARN que permitiera seguir los protocolos establecidos. Logramos estas características en 3 muestras de mujeres con SOP y 3 de mujeres control.

Cuantificación relativa de la expresión de *IL6* en células de la granulosa de mujeres control y mujeres con SOP

En condiciones basales (SIN LPS), la expresión de ARNm de *IL6* en células de la granulosa humanas provenientes de mujeres con SOP fue semejante a la de mujeres control. A su vez, dentro de cada grupo, mujeres control o mujeres con SOP, el tratamiento con LPS no alteró el nivel de expresión de ARNm ($p>0.05$) (Figura 21).

Figura 21 . Expresión de IL6 en células de la granulosa de mujeres control y mujeres con SOP, comparando el efecto del tratamiento con LPS. Las barras grises corresponden a las mujeres control y las barras negras a las mujeres con SOP. El patrón de relleno de la barra discrimina según el tratamiento (cuadriculado: SIN LPS o rayado: CON LPS) UA: unidades arbitrarias

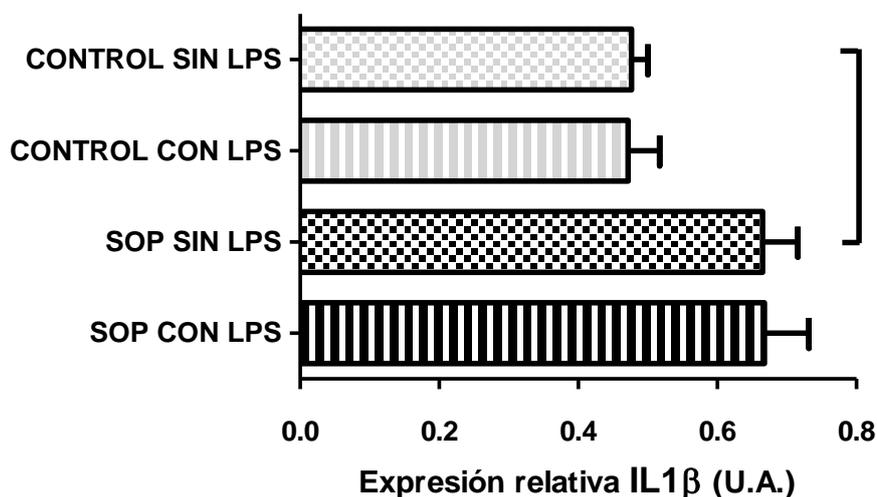


Cuantificación relativa de la expresión de IL1 β en células de la granulosa de mujeres control y con SOP

Considerando el tratamiento con LPS en cada grupo por separado, el grupo control (Gráfica 5: barras grises) y el grupo con SOP (Figura 22: barras negras), los niveles de expresión de ARNm de las células de la granulosa fueron semejantes sin tratamiento con LPS (condición basal) (Gráfica 5: patrón cuadriculado) y luego del tratamiento con LPS (Figura 22: patrón rayado) (análisis intragrupo).

En cuanto a las variaciones intergrupos, la expresión de ARNm de IL1 β en células de la granulosa humanas sin tratamiento con LPS provenientes de mujeres con SOP (Figura 22: barra negra, patrón cuadriculado) fue mayor a la expresión en mujeres control (Figura 22: barra gris, patrón cuadriculado) (* $p < 0.05$). Sin embargo esta diferencia entre los grupos se perdió luego del tratamiento de las células con LPS (SOP con LPS vs control con LPS, $p > 0.05$).

Figura 22. Comparación entre la expresión de IL1 β en células de la granulosa de mujeres control y mujeres con SOP, comparando además el efecto del tratamiento con LPS. Las barras grises corresponden a las mujeres control y las barras negras a las mujeres con SOP. El patrón de relleno de la barra discrimina según el tratamiento (cuadrículado: SIN LPS o rayado: CON LPS). (* $p < 0.05$) UA: unidades arbitrarias



Dada la baja cantidad de muestras disponibles para el ensayo, los resultados obtenidos de la cuantificación relativa de los genes de interés (IL6 e IL1 β) pueden considerarse solamente un estudio piloto, y el número de casos y controles deberá de incrementarse para poder obtener conclusiones robustas.

Discusión

Los resultados presentados en esta tesis aportan las primeras evidencias acerca de la presencia de posibles marcadores genéticos vinculados al síndrome de ovario poliquístico en mujeres uruguayas. Los datos obtenidos permiten mostrar que la presencia de SOP en mujeres uruguayas se relaciona con variaciones genéticas a nivel del promotor de los genes de IL1 β y TNF α , pero no con los polimorfismos estudiados del *TLR4*.

La búsqueda de datos bibliográficos o de trabajos previos realizados en Uruguay acerca del SOP, nos ha permitido constatar sólo un trabajo acerca de la prevalencia del síndrome y sus características clínicas (Close 2010). En

dicho trabajo la Dra. Close reúne un grupo de pacientes conformado por mujeres jóvenes, en su gran mayoría obesas, con características clínicas de SOP (alteraciones menstruales, signos de hiperandrogenismo como el hirsutismo, morfología de ovarios poliquísticos en la ecografía ginecológica). Sin embargo, en el desarrollo de su trabajo encontró varias limitantes para el correcto diagnóstico del SOP. Por tanto, de 107 historias clínicas que seleccionó inicialmente del archivo del Hospital de pacientes con posible diagnóstico de SOP *a priori*, descartó 74 historias por no cumplir con los criterios diagnósticos, o por falta de datos clínicos o paraclínicos. Por tanto nuestro trabajo ha contribuido a aumentar el número de mujeres con SOP caracterizadas fenotípicamente en el Uruguay, llegando a un total de 95 casos. Además el hecho de haber incluido mujeres provenientes de diferentes clínicas nos permite afirmar que se trata de una población de mujeres heterogénea, que incluso llegaron a la consulta médica por distintos motivos (amenorrea, desórdenes endocrinológicos, infertilidad, etc).

En nuestro estudio, las pacientes con SOP presentaron una edad media superior a la reportada por Close (31.87 vs. 24,2 años respectivamente), que puede explicarse por el hecho que la mayoría de las pacientes en nuestro trabajo fueron reclutadas de una clínica de reproducción asistida, donde la población que consulta por problemas de fertilidad tiene una media de edad de 35 años.

Las mujeres con SOP en nuestro estudio presentaron valores hormonales normales de FSH, prolactina y testosterona total, pero niveles elevados de estradiol, LH y AMH, datos que coinciden con los reportes de la literatura mundial (Laven et al., 2002, Gonzalez et al., 2012, Sir Petermann et al., 2002) y que se explican por el elevado número de folículos de diámetro de entre 2-5mm presentes en los ovarios de mujeres con SOP. Al igual que en el trabajo de Close, encontramos dificultad en la obtención de datos de dosificación hormonal de DHEAS (sulfato de deshidroepinandrosterona) y 17 Oh Progesterona, que permitieran descartar la hiperplasia suprarrenal congénita.

El porcentaje de mujeres con SOP consideradas en nuestro estudio que presentaron obesidad (60%) resultó semejante a los datos reportados en la literatura mundial, que rondan entre el 50-60% (57% en Carvajal et al., 2010;

63,5 % en Pérez et al., 2003; 47,9 % en Marcondes et al., 2007). Sin embargo, el porcentaje de mujeres con SOP obesas de nuestro estudio fue significativamente menor al encontrado en el trabajo de Close (80%). Es probable que tal diferencia se asocie con la clínica de origen de la cual provenía la paciente. Como fue descrito en la primera encuesta nacional uruguaya sobre obesidad, existe una relación inversa entre nivel socioeconómico (NSE) y el índice de masa corporal (IMC). Los estratos de NSE alto y medio presentan principalmente normopeso, mientras que en los estratos más bajos son más frecuentes el sobrepeso y la obesidad debido a un menor acceso a alimentos sanos y al estrés psicosocial que padecen las clases más carenciadas (Pisabarro et al., 2000). Por tanto, si bien la obesidad se asocia con el SOP, el elevado porcentaje de mujeres obesas reportado por Close podría estar influido por otros factores vinculados a las condiciones socio-económicas de la población considerada en su estudio.

Podemos considerar entonces, que las características diagnósticas y fenotípicas de las mujeres uruguayas con SOP se comportan según lo reportado en la literatura mundial y que lograr un diagnóstico correcto del síndrome en nuestro país, a nivel de diversos servicios asistenciales resulta complejo por la sobrevaloración de la imagen ecográfica de ovarios poliquísticos así como por la falta de estudios hormonales completos.

Respecto a la validación de nuestra hipótesis de trabajo en la que se planteaba que en mujeres con SOP los cambios que ocurren a nivel ovárico podrían explicarse, al menos en parte, por eventos relacionados a la activación de receptores tipo Toll 4, hemos encontrado la evidencia que describiremos a continuación.

Nuestros resultados nos permiten afirmar la presencia de TLR4 en las células de la granulosa obtenidas de mujeres en tratamiento de reproducción asistida. Aunque la presencia de TLR4 en la membrana plasmática no pudo ser confirmada en nuestros hallazgos, una distribución citoplasmática similar a la encontrada ha sido descrita para la línea celular de la granulosa KGN (Woods et al., 2011). En el trabajo de Woods et al 2011 mediante experimentos *in vitro*

en los que se bloqueó a los TLR4 de superficie con anticuerpo anti TLR4 humano, no se observó traslocación de factor NFκB al núcleo. Por tanto los autores reportaron que los TLR4 intracelulares de las células KGN parecerían no ser funcionales, ya que si lo fueran, debería de haberse registrado cierta traslocación de NFκB al núcleo independientemente de que los receptores de la superficie estuvieran bloqueados por el anticuerpo anti-TLR4. Existen trabajos realizados en otros tipos celulares donde sí se demostró la expresión y funcionalidad del TLR4 intracelular. En células endoteliales aórticas (Dunzendorfer et al., 2004) y una línea celular de epitelio intestinal murino (Hornef et al., 2002) se reportó una distribución del receptor próxima al compartimento paranuclear de las células, correspondiente a la ubicación celular del aparato de Golgi. Debido a que se han detectado niveles circulantes de LPS aun en individuos sanos, los autores proponen que esta localización de los TLR4 intracelular proporciona una barrera adicional de regulación para prevenir la estimulación descontrolada ante la exposición constante de las células al LPS. Además en estos trabajos se pudo demostrar la funcionalidad de este receptor con localización intracelular, y se propuso que el LPS puede ser internalizado en la célula por mecanismos dependientes de CD14 e independientes de TLR4.

Una posible explicación a la expresión de TLR4 que encontramos en las células de la granulosa empleadas en nuestro trabajo podría vincularse con un papel protector del TLR4 contra los patógenos que pudiera encontrar el ovocito y las células de la granulosa que lo rodean durante su trayecto por el tracto reproductivo.

Finalmente, considerando la tridimensionalidad de las células y la disposición que éstas adquieren en cultivo, sería necesario realizar microscopía confocal de modo de poder determinar con mayor precisión la localización del TLR4 en células de la granulosa humanas en cultivo.

Por otra parte, en una primera aproximación al estudio de la ultraestructura de estas células, hemos realizado mediciones del área de sus gránulos encontrando una disminución del área de los mismos en muestras provenientes de mujeres con SOP respecto a los que se observan en muestras de mujeres

control. Normalmente las células de la granulosa no presentan este tipo de gránulos hasta la fase final de maduración del folículo, inducida por la LH. La presencia de gránulos en las células utilizadas en este estudio estaría de acuerdo con el hecho de que éstas fueron recolectadas luego del estímulo con hCG, y por tanto se trataría de células granuloso-luteínicas (Amsterdam et al., 1994; Crisp et al., 1970). Previamente se ha descrito que el contenido de los gránulos de estas células es de naturaleza lipídica, y que se trata de precursores para la síntesis de hormonas esteroideas (colesterol) (Crisp et al., 1970; Delforge et al., 1972; Gulyas et al., 1984).

Por otro lado, dado que las mujeres con SOP tienen una elevada síntesis de hormonas esteroideas, podría especularse que al utilizar mayores cantidades del precursor contenido en las células de la granulosa, el tamaño de los gránulos fuera menor. Sin embargo, para hacer tal afirmación debemos aumentar el número de casos analizados para asegurar que la diferencia encontrada sea consecuencia de la presencia de SOP. De este modo se podría confirmar esta primera conclusión en cuanto a la disminución del área de los gránulos y complementar el estudio analizando el número de gránulos por célula y el tamaño de las mismas; así como plantear un estudio que analizara los efectos morfológicos y funcionales de estimular estas células con LPS. Más aún, en la literatura se han reportado dos sub-tipos de células de la granulosa (claras y oscuras), sugiriendo que la proporción de cada subtipo varía según el protocolo empleado en el ciclo de estimulación ovárica (Centurione et al., 2010), observando que el sub-tipo claro predomina en las mujeres estimuladas con agonistas de la GnRH. En nuestro trabajo las células de la granulosa analizadas se asemejan principalmente al subtipo “claro” aunque el protocolo de estimulación presenta diferencias con el del artículo citado. Nuevamente, el tamaño de muestra nos impide hacer extrapolaciones y asegurar que la proporción de células analizadas sea representativa de la composición celular de cada paciente, por lo que el número de células a estudiar debe de incrementarse.

Respecto a los factores genéticos estudiados podemos decir que en la población analizada, las frecuencias genotípicas encontradas del SNP

rs4986790 (*TLR4* 299 A/G), rs16944 (*IL1 β* -511) y del rs1800795 (*IL6* -174) son semejantes a las reportadas por Pereyra et al., 2012 quien trabajó con una población de individuos uruguayos buscando una posible asociación genética entre el parto prematuro y estos mismos SNPs, lo que permite confirmar el porcentaje de estos SNPs en nuestra población. Otro dato que coincide entre el estudio de Pereyra et al., (2012) y nuestro trabajo es no encontrar individuos con genotipo homocigota GG del SNP rs4986790 del *TLR4* o individuos CC del SNP rs1800795 de *IL6*. El hecho de que en ninguno de los dos estudios se encontraran individuos con estos genotipos entre más de 300 muestras de uruguayos muestra su baja frecuencia, y se asemeja a los datos mundiales en los que se reporta una baja frecuencia de estos genotipos en varias poblaciones del mundo (datos de HAPMAP). Otra posible explicación a este hecho, podría relacionarse con la sensibilidad de la técnica de HRM para detectar las variantes raras de un polimorfismo. El estudio mediante tecnologías como la secuenciación permitirían una aproximación mas sensible al estudio de variantes poco frecuentes.

Al comparar las frecuencias genotípicas de todos los SNPs con las frecuencias de diversas poblaciones del mundo (europeos, caucásicos, chinos, hispánicos y mexicanos) encontramos que las frecuencias genotípicas de estos SNPs en la población uruguaya no se asemejan exclusivamente a las de una única población, sino que resultan ser una mezcla entre las frecuencias de varias poblaciones del mundo. Este dato está de acuerdo con el hecho de que nuestra población es mixturada y posee una estructura genética con contribuciones hispánicas, africanas y nativo-americanas (Hidalgo et al., 2005, Sans et al., 1997).

Por otra parte, los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile del *TLR4*, se han asociado previamente con la susceptibilidad de desarrollar enfermedades infecciosas causadas por bacterias Gram-negativas (Lorenz et al., 2002; Schröder et al., 2005) tales como el asma (Yang et al., 2006), la periodontitis (Brett et al. , 2005), la sepsis generalizada (Dahmer et al., 2005), entre otras. En Uruguay, existen antecedentes de estudios de la variación Asp299Gly en dos enfermedades inflamatorias: el parto prematuro (Pereyra et al., 2012) y la

ruptura temprana de membranas (Rey et al., 2008), en los que se reporta asociación entre este último evento y el polimorfismo. En este trabajo estudiamos la relación entre el SOP y variaciones genéticas de moléculas vinculadas a la inmunidad y la inflamación.

Aunque en nuestro trabajo ampliamos el estudio sobre los polimorfismos del *TLR4* al considerar también el polimorfismo Thr399Ile, no encontramos asociación entre ninguno de estos SNPs y el SOP en mujeres uruguayas. Por tanto, no pudimos confirmar la hipótesis planteada que se fundamentaba en el conocimiento que estos polimorfismos del *TLR4* generan cambios en la conformación de la región extracelular del receptor, y traen como consecuencia una modificación en la unión de los ligandos, lo que podría alterar la susceptibilidad de las mujeres a desarrollar SOP.

A pesar que nuestros resultados nos indican que estas variaciones genéticas del *TLR4* no están implicadas directamente con la presencia del SOP, analizamos otras variaciones genéticas en moléculas vinculadas a la cascada del *TLR4* que indican la participación de un componente inflamatorio en el SOP. Nuestro trabajo muestra una asociación significativa entre el SOP y los polimorfismos de *IL1 β* y *TNF α* , que indicaría que las mujeres uruguayas portadoras del alelo menor de cada uno de los polimorfismos, tienen mayor predisposición a desarrollar el síndrome. Nuestros hallazgos se suman a la amplia gama de datos provenientes de la literatura donde las asociaciones genéticas y la presencia de SOP resultan controversiales.

Por ejemplo, a comienzos de 2015 se publicó un meta-análisis en el que se incluyó el estudio de los polimorfismos -511 de la *IL1 β* , -308 del *TNF α* y -174 de la *IL6* en relación al síndrome de ovario poliquístico (Guo et al., 2015). Los resultados de dicho meta-análisis no mostraron asociación entre los polimorfismos y el SOP. Sin embargo al considerar los trabajos del meta-análisis de manera individual/independiente, encontramos que en los trabajos sobre el polimorfismo -511 de la *IL1 β* (Xia et al., 2013; Mu et al., 2010; Yang et al., 2010) encuentran una frecuencia aumentada del alelo A en mujeres con SOP. Sin embargo los resultados de los trabajos acerca del polimorfismo de *TNF α* considerados por separado no reportan una asociación entre este polimorfismo y el SOP. Por tanto podríamos considerar que en el meta-análisis,

tanto la subjetividad en la selección de estudios como la aplicación de modelos estadísticos que no consideren la existencia de heterogeneidad entre los estudios seleccionados, podría ser una desventaja de esta herramienta estadística que explicara estos hechos. Los autores del meta-análisis señalan que el test de heterogeneidad entre grupos resultó estadísticamente significativo ($p < 0.1$), aunque no encontraron la/s posible/s fuente/s de heterogeneidad entre los estudios con las variables que consideraron para intentar explicarla (análisis según etnicidad, HWE en controles, método para genotipar y tamaño de la muestra en el estudio).

De hecho, existen diversos parámetros que explican que los resultados obtenidos en estudios de asociación caso-control entre un polimorfismo genético y una determinada enfermedad compleja, raramente se repliquen. Entre los parámetros que explican la heterogeneidad de resultados se encuentran: la diversidad étnica entre las poblaciones analizadas, la heterogeneidad de la enfermedad, y el hecho de considerar un tamaño muestral adecuado.

Es bien conocido que los diferentes grupos poblacionales del mundo presentan frecuencias alélicas y genotípicas que difieren entre grupos étnicos. En los trabajos de asociación genética, los resultados varían entre diferentes grupos poblacionales del mundo ya que los alelos de un gen pueden estar asociados de manera diferente con cierta enfermedad en distintos contextos poblacionales. Este hecho, sumado al origen étnico de la población uruguaya, conformada por el aporte de diversas poblaciones, 6% de genes africanos (Hidalgo et al., 2005), 10% de genes indígenas (Hidalgo et al., 2005, Sans et al., 1997) y un alto porcentaje de genes europeos, explica que en nuestra población los resultados de asociación encontrados resulten diferentes respecto de otras poblaciones previamente estudiadas.

Respecto a la heterogeneidad de la enfermedad, como se sabe, existen diversos criterios diagnósticos del SOP, y diversos fenotipos entre las mujeres con el síndrome, lo que puede llevar a que las pacientes seleccionadas entre estudios presenten características variables. Sería interesante poder realizar estudios de asociación genética entre los SNPs y el SOP discriminando entre los diferentes fenotipos del síndrome. Esto nos permitiría comprender si dichas

variantes están asociadas particularmente con alguna característica específica del síndrome, o con la presencia del síndrome *per se*. En este trabajo la posibilidad de separar y discriminar entre los diferentes fenotipos del SOP reduciría drásticamente el número de pacientes por grupo y el análisis de asociación con estas características arrojaría datos inconsistentes, por lo que el reclutamiento de nuevas pacientes sería aconsejable. De este modo se podría hacer una clasificación en distintos grupos de acuerdo a los diferentes fenotipos del síndrome, y buscar entonces posibles asociaciones genéticas entre mujeres con determinado(s) fenotipo(s) y los polimorfismos genéticos en estudio. Además creemos que los resultados de este tipo de análisis deben de considerarse según la individualidad de las mujeres estudiadas, teniendo en cuenta que los estudios realizados en humanos deben de considerarla variabilidad de cada individuo ya que no es posible estandarizar muchas condicionantes como se logra al trabajar con animales de laboratorio.

En cuanto al tamaño de la muestra en nuestro estudio consideramos que es apropiado para la población uruguaya. En 2009 el censo nacional realizado por el INE (Instituto Nacional de Estadística) registró que en el Uruguay el 52% de la población está formada por mujeres (1.708.481), de las cuales el 41% (703.044) se encuentran en la franja etaria que corresponde a la edad reproductiva (consideramos 15 a 45 años). Si consideramos que la prevalencia del SOP es del 10% en mujeres en esa franja, hemos calculado con un nivel de confianza del 95%, un valor p de 0.05 y un error máximo de estimación del 5%, que un tamaño muestral de 73 mujeres con SOP sería apropiado para el estudio.

Buscando otras variables que pudieran explicar nuestros hallazgos, encontramos en la literatura que el polimorfismo -308 del TNF α y el polimorfismo -511 de IL1 β se han asociado con la condición de obesidad en mujeres con SOP (Ishii et al., 2000; Yang et al., 2012). Por tanto, podríamos pensar que las asociaciones encontradas en nuestro estudio estuvieran vinculadas al hecho de que un alto porcentaje de las mujeres con SOP consideradas en nuestro trabajo eran además obesas. Sin embargo, el

resultado del estudio de asociación realizado en mujeres con SOP obesas versus mujeres con SOP normopeso, no arrojó diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los dos polimorfismos, lo que nos permite descartar que nuestros resultados respecto de la asociación de los polimorfismos de la IL1 β y del TNF α con el SOP en mujeres uruguayas, estén sesgados por la condición de obesidad de estas mujeres.

En cuanto a las consecuencias funcionales de los polimorfismos de IL1 β y TNF α , sabemos que están localizados en la región promotora, y que por tanto la presencia de los SNPs que hemos estudiado puede alterar la transcripción de cada gen.

Se ha vinculado que portadores del alelo A del polimorfismo -511 de la IL1 β presentan un aumento de la actividad transcripcional del gen y de los niveles séricos de IL1 β (Hwang et al., 2002; Hulkkonen et al., 2000). Por tanto, considerando nuestros resultados de asociación entre el polimorfismo -511 y el SOP, sería razonable esperar que las mujeres con SOP en el estudio tuvieran niveles séricos elevados de IL1 β . En base a dicha hipótesis, en nuestro trabajo intentamos cuantificar la proteína de IL1 β en el sobrenadante de los cultivos de células de la granulosa provenientes de mujeres con SOP y mujeres control, buscando correlacionar los niveles encontrados con el genotipo de cada individuo. Sin embargo, no pudimos realizar esta cuantificación de proteínas en el medio de cultivo ya que el ensayo con el que contábamos no permitía predecir valores de pequeño rango (<3.9 pg/ml). Nuestros resultados se asemejan a los reportados por Price et al., 2012, quienes no detectaron niveles IL1 β en el sobrenadante luego de 24 horas de cultivo. Como posible explicación a la ausencia de proteína de IL1 β en el medio de cultivo (a pesar de detectar aumento de ARNm de IL1 β), los autores proponen una falta de activación de un complejo multiproteico intracelular llamado “inflammasoma”, necesario para el procesamiento de la pro-interleuquina 1 β . Es posible especular que en las células en cultivo exista algún mecanismo que impida el ensamblaje del inflammasoma, y por tanto no se genere la proteína madura de IL1 β .

En otro estudio realizado con cultivos de células de la granulosa provenientes de mujeres sin estimulación ovárica, se detectó IL1 β en los sobrenadantes del cultivo utilizando la técnica de radioinmunoanálisis. De todas formas, los autores mencionan que las concentraciones de IL1 β encontradas en los sobrenadantes de los cultivos son bajas (media=13 fmol/ml), y que no existen diferencias entre el grupo de mujeres con SOP y mujeres control (Jasper et al., 1995).

En otro nivel de expresión, cuantificamos el ARNm de IL1 β en células de la granulosa en cultivo. Los resultados coinciden con los reportes de la literatura que encuentran niveles elevados de ARNm de IL1 β en las células de la granulosa provenientes de mujeres con SOP sujetas a un protocolo de estimulación hormonal comparados con los niveles de mujeres control (Schmidt et al., 2014). Los autores proponen que el aumento en la expresión de IL1B podría traer como consecuencia una invasión prematura de leucocitos hacia el folículo, lo que podría alterar su maduración.

Respecto al polimorfismo -308 de *TNF α* , diversos estudios sugieren un mayor nivel de transcripción de *TNF α* en portadores del alelo A del polimorfismo, que se asocia con niveles elevados de esta citoquina (Abraham LJ et al., 1999). A partir de nuestros hallazgos de la asociación del polimorfismo -308 con nuestra población de mujeres con SOP, cabría suponer que las portadoras el alelo A de este polimorfismo podrían tener niveles elevados de TNF α . En nuestro trabajo no pudimos medir los niveles de proteína de TNF α en el medio de cultivo ya que no contamos con un número suficiente de muestras para realizar el ensayo.

A modo de conclusión y considerando la correlación que existe entre genotipos, alelos y respuesta inflamatoria en diversas enfermedades, podría ser importante establecer un lineamiento que asociara el impacto de los diferentes genotipos y alelos de la IL1 β , la IL6 y el TNF α en la población uruguaya. Esto permitiría aportar a la comprensión de mecanismos de respuesta inflamatoria en nuestra población, pudiendo incluso establecer una vinculación a factores

ambientales desencadenantes o estilos de vida que pudieran contribuir favorable o desfavorablemente al desarrollo del síndrome de ovario poliquístico.

Conclusiones

- Las características diagnósticas y fenotípicas de las mujeres uruguayas con SOP se comportan según lo reportado en la literatura mundial
- Lograr un diagnóstico correcto del síndrome en nuestro país resulta complejo
- Este trabajo contribuye a conocer mejor el perfil genético de nuestra población en cuanto a los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile del *TLR4* y los polimorfismos estudiados de *IL6*, *IL1β* y *TNFα*
- Los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile del *TLR4* no están asociados con la incidencia del SOP en mujeres uruguayas
- Variaciones genéticas a nivel del promotor de los genes de *IL1β* y *TNFα* se asocian al síndrome de ovario poliquístico en mujeres uruguayas
- Las mujeres con SOP tienen niveles elevados de ARNm de *IL1β* comparadas con mujeres control

Si bien en este estudio no encontramos resultados que confirmaran nuestra hipótesis sobre una vinculación entre las variaciones genéticas del *TLR4* y el SOP, sí encontramos polimorfismos genéticos de moléculas inflamatorias asociadas a la cascada biológica de este receptor que se asocian con la incidencia del síndrome de ovario poliquístico en mujeres uruguayas. Estas variaciones implican una modificación del nivel de transcripción de los genes de estas citoquinas, pudiendo incluso alterar la síntesis de la proteína. Dado que nuestros resultados muestran la participación de mecanismos inmuno-inflamatorios asociados con la presencia de SOP, podemos proyectar nuevos objetivos que planteen el estudio del ambiente de citoquinas inflamatorias a nivel del ovario en correlación al genotipo del individuo que pudieran aportar a comprender la fisiopatología del SOP.

Referencias bibliográficas

- Abraham LJ (1999) Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol* 66: 562-6
- Aflatoonian R et al (2008) Toll-like receptors in female reproductive tract and their menstrual cycle dependent expression *Journal of Reproductive Immunology* 77: 7–13
- Akira S et al (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675-680
- Akira S et al (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-51
- Akira S et al (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801
- Alvarez B (2006) Molecular cloning, characterization and tissue expression of porcine Toll-like receptor 4. *Dev Comp Immunol.* 30:345– 55
- Anderson KV et al (1985) Establishment of dorsal–ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42: 779–789
- Amsterdam A et al (1994) Plasticity of cell organization during differentiation of normal and oncogene transformed granulosa cells. *Microsc Res Tech* 27:108–124
- Antezak M et al (2000) The vascular character of ovarian follicular granulosa cells: phenotypic and functional evidence for an endothelial-like cell population. *Hum Reprod* 15:2306-2318
- Arancibia SA et al (2007) Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 40:97-112
- Assou S et al (2006) The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod*; 21:1705-1719
- Azziz R et al (2009) The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril.* 91:456-88
- Barbieri RL et al (1984) Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of human ovarian stroma and theca. *Obstet Gynecol* 64:73S-80S
- Barbosa-Desongles A (2013) Testosterone induces cell proliferation and cell cycle gene overexpression in human visceral preadipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 305:355-359
- Barrat FJ et al (2005) Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 202:1131–1139
- Bes-Houtmann S et al (2007) Presence of functional TLR2 and TLR4 on human adipocytes. *Histochem Cell Biol* 127:131-137
- Beutler B et al (2003) How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 74:479-485
- Bhagat N et al (2010) Evaluation of Single Nucleotide Polymorphisms of Pro12Ala in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ and Gly308Ala in Tumor Necrosis Factor- α Genes in Obese Asian Indians: A Population-Based Study. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy* 3:349–56
- Bonamy AK et al (2008) Being born too small, too early, or both: does it matter for risk of hypertension in the elderly? *Amer Journ of Hypert* 21:1107–1110
- Brett PM et al (2005) Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J. Dent. Res.* 84:1149-5
- Brightbill HD et al (2000) Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunology* 101:1-10
- Bukulmez O et al (2000) Leukocytes in ovarian function. *Hum Reprod Update* 6:1–15

- Caillaud M et al (2005) In vivo effect of inter-leukin-1beta and interleukin-1RA on oocyte cytoplasmic maturation, ovulation, and early embryonic development in the mare. *Reprod Biol Endocrinol* 3:26-32.
- Cargill M et al (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22:231-238
- Carlberg M et al (2000) Elevated expression of tumor necrosis factor α in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 15:1250-1255
- Carvajal R et al (2010) Espectro fenotípico del síndrome de ovario poliquístico. *Rev Chil Obstet Ginecol* 75:124-132
- Centurione L et al (2010) Morphometric and ultrastructural analysis of human granulosa cells after gonadotrophin-releasing hormone agonist or antagonist. *Reprod Biomed Online*. 20:625-33
- Chapman CM et al (2003) Association of an allelic variant of interleukin-6 with subclinical carotid atherosclerosis in an Australian community population. *Eur Heart J* 24: 1494-1499
- Chen H et al (2006) Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum. Mol. Genet.* 15:519-529
- Chen ZJ et al (2011) Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nat. Genet.* 43:55–59
- Ciaraldi, TP et al (2009) Polycystic ovary syndrome is associated with tissue-specific differences in insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94:157-163.
- Close ML., 2010. Monografía final: Síndrome de ovario poliquístico. Cátedra de Endocrinología y Metabolismo, Hospital de Clínicas, Universidad de la República.
- Cohen-Sfady M et al (2005) Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *J Immunol* 175:3594–3602
- Cooper HE et al (1968) Hereditary factors in the Stein-Leventhal syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 100:371-387
- Crisp TM et al (1970) The fine structure of the human corpus luteum of early pregnancy and during the progestational phase of the menstrual cycle. *Am J Anat* 127:37–70
- Dahmer MK et al (2005) Genetic polymorphisms in sepsis. *Pediatr. Crit. Care Med.* 6:61-73
- Das M et al (2008) Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93:881-887.
- de Ridder L et al (2007) Genetic susceptibility has a more important role in pediatric-onset Crohn's disease than in adult-onset Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13:1083-1092
- Delforge JP et al (1972) Time relationships between granulosa cell growth and luteinization, and plasma luteinizing hormone discharge in humans. A morphometric analysis. *Fertil Steril* 23:1–11
- Diamanti-Kandarakis E et al (2006) The role of genes and environment in the etiology of PCOS. *Endocrine* 30:19–26.
- Dinarello CA (1989) IL-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* 44:153-205
- Dunzendorfer S et al (2004) Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *Faseb J* 18:1117-1119.
- Ehrmann DA et al (2002) Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:669-73.
- Eppig JJ. (1985) Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. *Dev Biol* 1:313 347

- Erdogan M (2008) The relationship of the interleukin-6 -174 G>C gene polymorphism with oxidative stress markers in Turkish polycystic ovary syndrome patients. *Journal of endocrinological investigation* 31:624-629
- Escobar-Morreale HF (2006) Resistencia a la insulina y síndrome del ovario poliquístico (SOP) Etiología del síndrome del ovario poliquístico. *Endocrinol Nutr* 53: 7-14
- Escobar-Morreale HF, Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JI & Luque-Ramírez M 2014 The striking similarities in the metabolic associations of female androgen excess and male androgen deficiency. *Human Reproduction* 29:2083–2091
- Espey LL (1994) Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod*; 50:233-238.
- Feero WG et al (2010) Genomic medicine – An updated primer. *N Engl J Med.* 362:2001-2011.
- Fernandez-Real JM et al (1997) The TNF- gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 46:1468–1472
- Fishman D et al (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102:1369-1376
- Gharani N, et al (1997) Association of the steroid synthesis gene CYP 11 a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Hum Mol Gen* 6:397-402.
- Gilchrist RB et al (2000) Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor deficiency on ovarian follicular cell function. *J Reprod and Fertil* 120:283-292.
- Goodarzi M et al (2006) Diagnosis, epidemiology, and genetics of the polycystic ovary syndrome. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism.* 20: 193-205.
- González F et al (2012). Hyperandrogenism exerts an anti-inflammatory effect in obese women with polycystic ovary syndrome. *Endocrine*, 42:726–735.
- Gorospe WC et al (1993) Interleukin-6 production by rat granulosa cells in vitro: effects of cytokines, follicle-stimulating hormone, and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Biol Reprod* 48:538-543
- Guillot L et al (2002) Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* 168:5989–5992
- Gulyas BJ. (1984) Fine structure of the luteal tissue. In: Motta PM, editor. *Ultrastructure of endocrine cells and tissues*. Boston, The Hague: Martinus Nijhoff. pp. 238–254.
- Guo R et al (2015) Association of TNF-alpha, IL-6 and IL-1beta gene polymorphisms with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *BMC Genetics* 16:5
- Herath S et al (2007) Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction* 134:683–693
- Herrmann SM et al (1998) Polymorphisms of the tumour necrosis factor- gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest* 28:59–66
- Hidalgo PC et al (2005) Genetic Admixture Estimate in the Uruguayan Population Based on the Loci LDLR, GYPA, HBGG, GC and D7S8. *Int J Hum Genet* 5:217-222
- Hoeger K (2001) Obesity and weight loss in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* 28:85-97,
- Hornef MW et al (2002) Toll-like Receptor 4 Resides in the Golgi Apparatus and Colocalizes with Internalized Lipopolysaccharide in Intestinal Epithelial Cells *J Exp Med.* 95:559–570.
- Hsueh, AJ et al (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5:76-127
- Hulkkonen J (2000) A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 beta plasma levels in healthy individuals. *Eur Cytokine Network* 11:251–255

- Hurwitz A et al (1991) Endocrine and autocrine mediated regulation of rat ovarian (thecal-interstitial) interleukin 1 beta gene expression: gonadotropin dependent preovulatory acquisition. *Endocrinology* 129:3427-3429
- Hwang IR et al (2002) Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 123: 1793–1803.
- Hwang J et al (2012) Genome-wide association study identifies GYS2 as a novel genetic factor for polycystic ovary syndrome through obesity-related condition. *Journal of Human Genetics* 57:660–664
- Ibañez L et al (1998) Precocious pubarche, hyperinsulinism, and ovarian hyperandrogenism in girls: relation to reduced fetal growth. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83:3558–3562.
- Ishii T et al (2000) Tumor necrosis factor alpha gene G-308A polymorphism, insulin resistance, and fasting plasma glucose in young, older, and diabetic Japanese men. *Metabolism*. 49:1616-8.
- Janeway CA et al (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216
- Jasper M et al (1995) Immunoactive interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha in thecal, stromal and granulosa cell cultures from normal and polycystic ovaries. *Hum Reprod*. 10:1352-1354
- Jiang D et al (2005) Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med*. 11:1173-1179
- Johnson ML et al (1999) Tumor necrosis factor alpha regulates collagenolytic activity in preovulatory ovine follicles: Relationship to cytokine secretion by the oocyte-cumulus cell complex. *Biol Reprod* 61:1581-1585
- Jones, RE (1991) The ovaries. *Human Reproductive Biology Academic Press, San Diego* pp 39-53
- Kaipia A et al (1997) Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 59:349-363
- Kawai T et al (2007) TLR signaling. *Semin Immunol*. 19:24-32
- Kawai T (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384
- Kawasaki F et al (2003) The clinical role of interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor in human follicular fluids. *Clin Exp Med* 3:27-31
- Kokia E et al (1992) Interleukin 1 stimulates ovarian prostaglandin biosynthesis: evidence for heterologous contact independent cell-cell interaction. *Endocrinology* 130:3095-3097
- Kolbus A et al (2007) Interleukin-1 alpha but not interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with polycystic ovary syndrome. *Journal of reproductive immunology* 73:188-93
- Laven J et al (2002) New Approach to Polycystic Ovary Syndrome and Other Forms of Anovulatory Infertility. *Obstetrical & Gynecological Survey* 57:755-767
- Legro RS et al (1999) Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 84:165-169
- Lemaitre B et al (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983
- Levitas E et al (2000) Periovulatory and interleukin-1 beta-dependent up-regulation of intraovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) in the rat: Potential role for VEGF in the promotion of peri-ovulatory angiogenesis and vascular permeability. *J Soc Gynecol Investig* 7:51-60
- Licastro F et al (2003) Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging*; 24:921-926

- Liu Z et al (2008) The involvement of the Toll-like receptor family in ovulation. *J Assist Reprod Genet* 25:223-228
- Liu Z et al (2009) Interleukin-6: An autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Endocrinology* 150:3360-3368
- Longo S et al (2013) Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR). *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 26 222–225
- Lopez Mato A (2004) Eje córtico límbico hipotálamo-hipófiso-gonadal. En: Lopez Mato A. *Psiconeuroinmunoendocrinología. Nuevos dilemas para viejos paradigmas. Viejos dilemas para neoparadigmas.* Ed Pólemos. Buenos Aires. Argentina
- Machelon V et al (1995) Macrophage and granulosa interleukin-1 beta mRNA in human ovulatory follicles. *Hum Reprod* 10:2198-2203
- Marcondes JA et al (2007) Metformin in normal-weight hirsute women with polycystic ovary syndrome with normal insulin sensitivity. *Ginecol Endocrinol.* 23:273-278
- Martínez-Aguayo A et al (2007) Comparison of leptin levels, body composition and insulin sensitivity and secretion by OGTT in healthy, early pubertal girls born at either appropriate- or small-for-gestational age. *Clinical Endocrinology* 67:526–533
- Martoriati A (2003a) Inhibition of in vitro maturation of equine oocytes by interleukin 1 beta via specific IL-1 receptors. *Reproduction* 126:509-515
- Martoriati A et al (2003b) Interleukin-1 (IL-1) system gene expression in granulosa cells: Kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. *Reprod Biol Endocrinol* 1:42-52
- Merino P et al (2009) Diagnóstico del Síndrome de Ovario Poliquístico: nuevos fenotipos, nuevas incógnitas. *Rev Méd Chile* 137:1071-1080
- Mu Y et al (2010) Interleukin 1 beta (IL-1 β) promoter C [-511] T polymorphism but not C [+3953] T polymorphism is associated with polycystic ovary syndrome. *Endocrine* 37: 71-75
- Murdoch WJ et al (1999) Plasmin cleaves tumor necrosis factor alpha exodomain from sheep follicular endothelium: Implication in the ovulatory process. *Biol Reprod* 60:1166-1171
- Nicklin MJ et al (1994) A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics* 19:382–384
- Oh J et al (2009) Serum C-reactive protein levels in normal-weight polycystic ovary syndrome. *Korean J Intern Med* 24:350-355
- Ohashi K et al (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164:558–561.
- Olson JK et al (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173:3916-3924
- Orio JR et al (2004) The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3696-3701
- Orio FJ et al (2005) The increase of leukocytes as a new putative marker of low-grade chronic inflammation and early cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2-5.
- Pasterkamp G et al (2004) Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 34:328-333
- Pellatt L et al (2007) Granulosa cell production of anti-Müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 92:240-245.
- Pereyra S et al (2012) Rapid multiplex high resolution melting method to analyze inflammatory related SNPs in preterm birth. *BMC Research Notes.* 5:69.
- Pérez-Bravo J et al (2003) Síndrome de ovario poliquístico. Presentación clínica, bioquímica y ultrasonográfica. *Rev Chil Obstet Ginecol* 68:471-476

- Pevsner-Fischer M et al (2008) Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*. 109:1422–1432
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2002-2007.
- Pisabarro R et al (2000) Primera encuesta nacional de sobrepeso y obesidad (ENSO 1). *Rev Méd Urug* 2000; 16:31-38.
- Price J et al (2012) Toll-Like Receptor Expression and Function in the COV434 Granulosa Cell Line. *Amer jour of reprod immunol* 68:205-17
- Pujhari S et al (2012) TNF-A Promoter Polymorphism: A Factor Contributing to the Different Immunological and Clinical Phenotypes in Japanese Encephalitis. *BMC Infectious Diseases* 12:23
- Purcell S et al (2003) Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*. 19:(149-150
- Qin KN et al (1998) Role of cytochrome P450c 17 in polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 145:111-121.
- Rallabhandi P (2006) Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* 177:322–332
- Rey G et al (2008) Toll receptor 4 Asp299Gly polymorphism and its association with preterm birth and premature rupture of membranes in a South American population. *Mol Hum Reprod*. 14:555–559
- Richards JS et al (1987) Ovarian follicular development: From physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res* 43:231-276
- Richards JS et al (1988) Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu Rev Physiol* 50:441-463
- Richards JS (2007) Genetics of ovulation. *Semin. Reprod. Med*. 25:235–242
- Richards JS et al (2008) Immune-like mechanisms in ovulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 19:191-196
- Rivas B et al (2005) Papel de las células epiteliales en la respuesta inmune del pulmón. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*, 18:321-326
- Roberts CW et al (2001) Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 14:476–488
- Rodríguez-Martínez S (2005) TLRs and NODs mRNA expression pattern in healthy mouse eye. *Br J Ophthalmol*. 89:904–910.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, authors. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. 2004. *Fertil Steril*. 81:19–25
- Ryan KJ et al (1968) Steroid formation by isolated and recombined granulosa and thecal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 28:355-358
- Sans M et al (1997) Historical genetics in Uruguay: estimates of biological origins and their problems. *Hum Biol*. 69:161-170
- Schröder N et al (2005) Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Ancet Infect Dis* 5:156–164
- Shi Y et al (2012) Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nat. Genet*. 44:1020–1025
- Shimada M et al (2006) Induced expression of pattern recognition receptors (PRRs) in cumulus oocyte complexes (COCs): novel evidence for innate immune-like cells functions during ovulation. *Mol Endocrinol*. 20:3228–3239
- Siegel S et al (2002) A C/T single nucleotide polymorphism at the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 78:240-243
- Sir-Petermann T et al (2002) Prevalence of Type II diabetes mellitus and insulin resistance in parents of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia* 45:959-964.

- Sir-Petermann T et al (2009) Metabolic and reproductive features before and during puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94:1923–1930
- Smirnova I et al (2001) Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics* 158:1657-1664
- Stein IF (1935) Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 29:181–191
- Stern R et al (2006) Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur. J. Cell Biol.* 85:699–715
- Stuber F et al (1996) A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 24:381–384
- Subedi K et al (2008) Changes in the expression of Toll-like receptor mRNAs during follicular growth and in response to lipopolysaccharide in ovarian follicles of laying hens. *J Reprod Dev.* 53:1227– 1235
- Takehara Y et al (1994) The effect of interleukin-1 beta on ovulation oocyte maturation, fertilization in the in vitro perfused rabbit ovary. *Endocrinology.* 13:1788-1793. Takeda K et al (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology.* 17:1–14
- Tanriverdi F et al (2003) The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol* 176:293–304
- Tapanainen JS et al (1999) A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 711-715
- The Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS). 2011. *Human Reproduction*, 0:. 1–27
- The International HapMap Project (2003) *Nature* 426:789–796
- Unsal T et al (2009) Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP11A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 26:205-216
- Urbanek M et al (1999) Thirty seven genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage in folistatin. *Proc Nati Acad Sci* 96: 573-575
- Vabulas RM et al (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 276:31332–31339
- Vadillo E et al (2012) Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético. *Revista de Investigación Clínica* 64:461-476
- Vanderstichele H et al (1994) Secretion of steroids, growth factors and cytokines by immortalized mouse granulosa cell lines. *Biol Reprod* 50:1190-1202
- Villanueva M et al (2006) Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología* 25:115-130
- Vozarova B et al (2003) The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 112:409-413
- Walch K et al (2004) A common interleukin-6 gene promoter polymorphism influences the clinical characteristics of women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 81:1638-1641
- Wang XF et al (2002) Interleukin-1beta expression on ovarian granulosa cells and its clinical implication in women undergoing in vitro fertilization. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 22:934-936
- Wells JC (2011) The thrifty phenotype: an adaptation in growth or metabolism? *American Journal of Human Biology* 23:65–75.
- Wen AQ (2010) Clinical relevance of IL-1beta promoter polymorphisms (-1470, -511, and -31) in patients with major trauma. *Shock.* 33:576-582

- Wernstedt I et al (2004) A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:1272-1279
- Wigginton JE et al (2005) A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet* 76:887-893
- Wilson AG et al (1995) Genetics of human necrosis factor-alpha in autoimmune, infectious and neoplastic diseases. *J.Inflamm.* 45:1–12
- Wilson AG et al (1992) Single base change in the human tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene detectable by NcoI restriction of PCR. *Hum Mol Genet.* 1:353
- Wilson AG et al (1994) A genetic association between systemic lupus erithematosus and tumor necrosis factor alpha. *European Journal of Immunology* 24::191–195
- Winchester R et al (1992) The genetic basis of rheumatoid arthritis. The shared epitope hypothesis. *Rheum Dis Clin North Am.* 18:761–783
- Wira CR et al (2004) Endocrine regulation of the mucosal immune system in the female reproductive tract. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, editors. Elsevier, Inc.: San Diego, CA
- Woods D et al (2011) TLR4 activates NFkB in human ovarian granulosa tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 409:675-80
- Xia YH et al (2013) Correlation between IL-1 β , IL-1Ra gene polymorphism and occurrence of polycystic ovary syndrome infertility. *Asian Pac J Trop Med.* 6:232-236
- Yang IA et al (2006) The role of Toll-like receptors and related receptors of the innate immune system in asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 6:23-28
- Yang WL (2004) Tumor necrosis factor-alpha-induced matrix proteolytic enzyme production and basement membrane remodeling by human ovarian surface epithelial cells: Molecular basis linking ovulation and cancer risk. *Cancer Res* 64:1534-1540
- Yang Y et al (2010) Genotype and haplotype determination of interleukin (IL) 1 beta (g. -511C > T and g. +3954C > T) and IL-1RN in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 94:384-386
- Yang Y et al (2012) Correlation between interleukin-1 and the obesity of polycystic ovary syndrome. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 47:9-13
- Yen, SSC et al (1986) *Reproductive Endocrinology*, 2nd ed. Saunders, Philadelphia
- Yun, JH (2011) The Promoter -1031(T/C) Polymorphism in Tumor Necrosis Factor-Alpha Associated with Polycystic Ovary Syndrome. *Reproductive biology and endocrinology* 9:131-136
- Zawadski JK et al (1992) Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. En: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, editors. *Polycystic Ovary Syndrome*. Boston: Blackwell Scientific Publications;. pp. 377–384.
- Zhou M et al (2009) Toll-like receptor expression in normal ovary and ovarian tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 58:1375-1385

Anexo 1. Características del SOP

Oligoanovulación

La frecuencia normal del ciclo menstrual en una mujer adulta es de 24-38 días en promedio. Se define como oligomenorrea a la presencia de menos de 9 menstruaciones al año o 3 ciclos de más de 38 días durante el último año, como polimenorrea ciclos menores de 24 días y como amenorrea ciclos mayores a 90 días. La gran mayoría de las mujeres con SOP presentan algún grado de trastorno menstrual y en la mayoría de los casos corresponde a oligomenorrea o amenorrea. La presencia de ciclos regulares en mujeres sin hiperandrogenismo puede ser usado como evidencia de ovulación normal. Sin embargo, la presencia de ciclos menstruales regulares en mujeres con hiperandrogenismo no asegura la presencia de ovulación, ya que 40% de ellas tienen oligoanovulación cuando son estudiadas con exámenes de laboratorio⁵.

Hiperandrogenismo clínico (HA)

El HA se define como las manifestaciones clínicas derivadas de un exceso o una hipersensibilidad a los andrógenos. Dentro de estas manifestaciones se incluyen el hirsutismo, la seborrea, el acné y la alopecia androgénica. Un grado extremo de hiperandrogenismo lo constituye la virilización, cuadro que es infrecuente en las mujeres con SOP y que es causado principalmente por tumores productores de andrógenos (ováricos o adrenales).

El hirsutismo se define como un aumento de los pelos en zonas dependientes de andrógenos. Se han diseñado escalas para evaluar su magnitud, que evalúan la densidad de pelos en diferentes zonas del cuerpo: labio superior, mentón, espalda alta y baja, tórax, abdomen superior e inferior, brazo, y muslos. El hirsutismo varía entre las poblaciones según la composición étnica de las mismas. Las mujeres europeas son más hirsutas mientras que se describe menor pilosidad en las mujeres de ascendencia amerindia.

Otros signos clínicos considerados como una manifestación del exceso de andrógenos son el acné y la alopecia androgenica. Sin embargo estos no son considerados como criterio diagnóstico de HA por la clasificación de la AES.

Hiperandrogenismo bioquímico

La presencia de hiperandrogenismo bioquímico es aceptada por las tres clasificaciones como un elemento central en el SOP. Las tres clasificaciones concuerdan en la evaluación de la testosterona total, dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) y la evaluación de los andrógenos libres, ya sea por medición de testosterona libre o por cálculo del índice de andrógenos libres para hacer el diagnóstico de SOP. Los elementos divergentes en los consensos radican en la medición de testosterona libre, que tiene importantes problemas metodológicos, y la inclusión de la androstenediona.

Ultrasonografía con ovarios con morfología ovario poliquístico

La morfología de ovario poliquístico (MOP) considera la presencia de 12 o más folículos entre 2 y 9 mm al menos en uno de los dos ovarios ó un volumen ovárico de 10 ml en estudios realizados con ecografía transvaginal. El aspecto de MOP no es exclusivo de estas pacientes, ya que puede estar presente entre 10% y 20% de las mujeres sanas con reglas regulares y sin hiperandrogenismo clínico. Por tanto una ecografía alterada aislada, sin otros elementos clínicos, no debe ser empleada como diagnóstico de SOP.

Los ovarios "multiquísticos" definidos por la presencia de más de 5 folículos y estroma normal, pueden corresponder a un hallazgo frecuente durante la pubertad y en mujeres que se recuperan de una amenorrea hipotalámica, motivo por el que este término no debe ser confundido con MOP.

Anexo 2. Resumen de los criterios de inclusión y exclusión para el diagnóstico del SOP según cada consenso (Tomado de Merino P et al., 2009)

Definición/ año	Criterios diagnósticos	Fenótipos posibles	Criterios de exclusión	Hiperandrogenismo clínico	Hiperandrogenismo bioquímico	Morfología de ovario poliquístico
NICHD/1990 ³	Requiere la presencia simultánea de: 1) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico 2) Trastorno menstrual	1) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico + trastorno menstrual	Hiperplasia suprarrenal congénita, tumores secretores de andrógenos, síndrome de Cushing, e hiperprolactinemia	Hirsutismo, alopecia, acné	1) Testosterona total 2) Testosterona libre 3) Androstenediona 4) DHEAS	No incluida
Rotterdam/2003 ⁴	Requiere la presencia de al menos dos de los siguientes criterios: 1) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico 2) Anovulación 3) Morfología de ovario poliquístico	1) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico + anovulación 2) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico + anovulación 3) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico + MOP 4) Anovulación más MOP	Hiperplasia suprarrenal congénita, tumores secretores de andrógenos, síndrome de Cushing	Hirsutismo, acné y alopecia androgénica?	1) Índice de andrógenos libres 2) Testosterona total 3) DHEAS	Por lo menos un ovario que tenga: 1) 12 o más folículos (2-9 mm de diámetro) o 2) volumen ovárico mayor de 10 ml
AES/2006 ⁵	Requiere la presencia de hiperandrogenismo, clínico o bioquímico, y alguno de los siguientes criterios: oligo-anovulación o morfología de ovario poliquístico	1) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico + oligo-anovulación 2) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico + oligo-anovulación + MOP 3) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico más MOP	Hiperplasia suprarrenal congénita, neoplasias secretores de andrógenos, uso o abuso de drogas androgénicas/anabólicas, síndrome de resistencia insulínica severa, disfunción tiroidea, síndrome de Cushing, e hiperprolactinemia	Hirsutismo	1) Índice de andrógenos libres o testosterona libre 2) Testosterona total 3) DHEAS, y 4) Androstenediona	Por lo menos un ovario que tenga: 1) 12 o más folículos (2-9 mm de diámetro) o 2) volumen ovárico mayor de 10 ml

Anexo 3. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INSTITUCIONES y PERSONAL CIVILMENTE RESPONSABLE

Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Medicina Montevideo

Uruguay 29243414/3551

Profs. Agregada. Dra. Rossana Sapiro y Dra. Rebeca Chavez, Lic Jimena Mas de Ayala

PROYECTO: Procesos inflamatorios vinculados a variaciones genéticas en el Síndrome de Ovario Poliquístico

INVITACION A PARTICIPAR. Ud. está siendo invitada a participar en un trabajo de investigación que examinará las posibles causas de una enfermedad muy común que afecta a mujeres jóvenes en donde aparecen quistes en el ovario y que muchas veces dificulta que la persona tenga hijos (infertilidad).

PROPÓSITO.- El propósito del presente estudio es determinar si existen cambios en algunos genes y proteínas que expliquen la predisposición a esta enfermedad

PROCEDIMIENTO. Su participación se verá limitada a una extracción de exudado de la mejilla ó a la donación de células de descarte luego de procedimientos de fertilización asistida y/o una eventual extracción de sangre.

Ud. Puede ser solicitada a participar ya sea porque es portadora de la enfermedad en estudio o porque fue elegida como control de la misma.

RIESGOS. Ud. ha sido informada que ninguno de estos procedimientos conlleva riesgos mayores.

RIESGOS MENORES: se aclara que si Ud. es sometida a extracción de sangre esto conlleva un riesgo considerado medicamente menor y que consiste en posible dolor en la región o formación de un hematoma en el sitio de aplicación de la jeringa. No se detectan otros riesgos físicos o emocionales de los procedimientos descritos previamente.

PROTECCION DE RIESGOS MENORES: utilización de material en buen estado y desechables manejados por personal experto.

COMPENSACIÓN. Los médicos le informarán a Ud. de los resultados obtenidos con sus muestras. En el caso que Ud. lo solicite, el equipo de investigación le podrá informar del resultado general del estudio.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA. La intervención en este estudio no recibirá ninguna compensación económica pero tampoco le producirá ningún gasto.

CONFIDENCIALIDAD. Toda información recogida será mantenida en estricta confidencialidad. Si cualquier publicación resulta de esta investigación Ud. no será identificada con su nombre.

Los datos obtenidos en el estudio llevado a cabo en la Policlínica de Endocrinología del Hospital de Clínicas, serán debidamente codificados de tal manera de mantener el anonimato de los participantes en todo momento.

INTERRUPCION DE SU PARTICIPACION: Ud. acepta que su participación en este estudio es totalmente voluntaria y que podrá retirarse en cualquier momento que desee sin ninguna consecuencia y que podrá solicitar la destrucción de las muestras.

DERECHOS DE LOS PARTICIPANTES: Ud. comprende que si desea más información respecto a sus derechos puede consultar a los miembros del equipo mencionados en el encabezado. Ud. ha tenido la posibilidad de realizar preguntas y han sido contestadas satisfactoriamente por el equipo responsable.

CONCLUSION. Ud. ha leído y comprendido este consentimiento. Luego de firmar este documento Ud. recibirá una copia del mismo.

A) Consiento participar del estudio SI NO

B) Consiento que mi muestra sea guardada y pueda ser usada en otras investigaciones de la misma enfermedad: SI NO

Nombre del participante. Firma Fecha.

Nombre del investigador. Firma Fecha.

Anexo 4. Formulario

Ficha N°:			Fecha:			
Datos Personales						
Nombre		C.I.:		Edad		
Antecedentes						
Antecedentes personales						
	Diabetes		Hiperinsulinemia			
	Hipertrigliceridemia		Hipercolesterolemia			
	Tabaquismo					
Antecedentes familiares						
	Diabetes		PCOS		Esterilidad	
Datos Clinicos						
	FUM		Ciclos M:		R	I
	Embarazos		Hijos			
	Infertilidad					
Examen Fisico						
Hirsutismo		Acné				
Peso		Talla				
Perimetro Abdominal						
Exámenes Paraclínicos						
Ecografía	NO		SI			
			Quistes			
			Número			
			Tamaño			
Estudios Hormonales	LH	FSH	E	P	A	PL
	17 OH PROG	DHEA	TEST TOT	TEST LIBRE	TSH	
Observaciones						
GLUCOSA						

Anexo 5. Protocolo de extracción de ADN

El cepillo con el que se obtiene la muestra se sumerge en 1ml de PBS 1x en un tubo eppendorff de 1.5ml hasta el procesamiento de la misma y se conserva a 4°C

- a) Centrifugar a 2500rpm por 10min para que se desprendan las células del cepillo
- b) Descartar el cepillo y el sobrenadante.
- c) Agregar a la muestra 0,5 ml de solución de lisis celular, y colocar en baño a 55°C durante toda la noche
- d) Agregar 0,7 ml de isopropanol, agitar por inversión hasta observar el ADN precipitado
- e) Volver a centrifugar durante un minuto a 13500 rpm,
- f) Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet de ADN con 0,5 ml de etanol 70%
- g) Centrifugar durante un minuto a 13000 rpm
- h) Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet de ADN
- i) Una vez seco, disolver el pellet en 0,1 ml de agua destilada e incubar a 65° C por 20 minutos para disolver el pellet
- j) Almacenar la muestra de ADN a -20°C hasta su uso

(Modificado de un protocolo de extracción de ADN a partir de sangre total)

Anexo 6. Protocolo para ELISA de IL1 β (Human IL-1 β ELISA Set II, BD OptEIA, BD Biosciences)

- 1) Cubrir cada pozo con 100 μ l de anticuerpo de captura (1:250) diluido en "Coating Buffer" (0.1M Carbonato de sodio, pH 9.5 7.13g NaHCO₃, 1.59g Na₂CO₃; q.s. para 1L; pH 9.5 con NaOH 10N).
- 2) Cubrir la placa e incubar overnight a 4°C
- 3) Descartar el contenido de cada pozo
- 4) Lavar 3 veces cada pozo con 300 μ l de "Wash buffer" (PBS con 0.05% Tween-20) y luego del último lavado invertir la placa sobre papel absorbente para remover cualquier residuo de buffer.
- 5) Agregar a cada pozo 200 μ l de "Assay Diluent" (PBS con 10% FBS, pH 7.0) para bloqueo. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 6) Descartar el contenido de cada pozo
- 7) Lavar como en paso 4
- 8) Agregar 100 μ l de cada estándar, muestra o control al pozo que corresponda. Sellar la placa e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
- 9) Descartar el contenido de cada pozo
- 10) Lavar como en paso 4 un total de 5 veces
- 11) Agregar 100 μ l por pozo del anticuerpo de detección diluido en "Assay Diluent" (1: 1000). Sellar la placa e incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
- 12) Lavar como en paso 4 un total de 5 veces
- 13) Agregar 100 μ l por pozo de "Enzyme Reagent" (Streptavidin-HRP) diluido en "Assay Diluent" (1:250). Sellar la placa e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 14) Lavar como en paso 4 un total de 7 veces.
- 15) Agregar 100 μ l por pozo de "Substrate solution" (Tetrametilbenzidinia + Peróxido de hidrogeno, 1:1) Incubar la placa sin sellar por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- 16) Agregar 50 μ l por pozo de "Stop Solution" (1M H₃PO₄ o 2N H₂SO₄).
- 17) Medir la absorbancia a 450nm dentro de los 30 minutos de haber detenido la reacción

Anexo 7. Aislamiento del ARN mensajero (TRIzol® Qiagen)

- 1) Incubar la muestra 5 minutos a temperatura ambiente
- 2) Agregar 200µL de cloroformo por cada 1mL de Trizol usado inicialmente para despegar las células.
- 3) Incubar a temperatura ambiente entre 2 y 3 minutos.
- 4) Centrifugar a 12.000g por 15 minutos (temperatura ambiente).
- 5) Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo y agregar 500µL (por cada 1mL de Trizol usado inicialmente) de alcohol isopropílico (Isopropanol). Mezclar bien.
- 6) Incubar 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 12.000g por 10 minutos (temperatura ambiente -- aunque es mejor centrifugar a 4°C).
- 7) Descartar sobrenadante y lavar pellet con 1ml (por cada 1mL de Trizol usado inicialmente) de alcohol 75% (preparado previamente con H₂O DEPC). Vortexear brevemente (un poco, para levantar/lavar pellet).
- 8) Centrifugar a 7.500g por 5 minutos.
- 9) Descartar sobrenadante con pipeta y dejar secar el pellet (tubo abierto a temperatura ambiente sobre mesada).
- 10) Disolver pellet en H₂O DEPC (RNase-free) e incubar 10 minutos a 55-60°C. La cantidad de H₂O con la cual resuspender el pellet depende del volumen del pellet (entre 20 a 50µL según kit/protocolo de Trizol)
- 11) Proceder a medir concentración de ARN o guardar a -80°C.

Anexo 8. Retrotranscripción del ARN mensajero

A partir de 1µg de ARN, agregar en 1 tubo eppendorf:

- 1 µl del ARN molde (1µg/µl),
- 1 µl (=0,2µg) de random primers
- H₂O c/DEPC en un volumen final de 12.5 µl.

Mezclar e incubar a 65°C por 5 minutos e inmediatamente poner en hielo.

Luego hacer una mezcla que contenga:

- 4 µl de Reaction Buffer 5X (Thermo Scientific)
- 0, 5 µl (=20 U) de RNAsa Inhibitor (Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor (#EO0381))
- 2 µl de dNTPs (20mM cada uno)
- 1 µl (= 200 unidades) de Enzima transcriptasa reversa (RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo Scientific)

Volumen final de 20 µl.

Finalmente incubar 60 minutos a 42°C y 10 minutos a 72°C en termociclador (Biometra). Guardar el ADN copia resultante a -20°C.

Anexo 9. PCR real time cuantitativo

Mix para PCR:

10 µl Biotools QuantiMix EASY SYG KIT (Biotools)

7 µl H₂O

1 µl cebador directo (20 µM)

1 µl cebador indirecto (20 µM)

1 µl ADNc

Volumen final de reacción de 20µL

Cebadores:

Gen	Secuencia del cebador (directo 5'-3')	Exón	Secuencia del cebador (indirecto 5'-3')	Exón	Tamaño del producto de PCR (pb)
IL1B	CTCGCCAGTGAAATGATG GCT	1	GTCGGAGATTCGTAGC TGGAT	3	144
IL6	CCTTCCAAAGATGGCTGA AA	3	CAGGGGTGGTTATTGC ATCT	5	230
GAPDH	GGGAAGGTGAAGGTCGG	2	TGGA CTCCACGACGTA CTCAG	5	292

Perfil de la reacción de PCR:

95°C por 5 minutos

95°C por 15 segundos

63°C por 60 segundos

} 40 ciclos

Rampa de HRM desde 72°C a 99°C.

Agradecimientos

Agradezco a:

- Todos aquellos que me apoyaron académica y personalmente durante el transcurso de esta tesis (*Rebeca, Rossana, Gabriel, Silvana, Mariana, Mamá, Agustina, Santiago*)
- Al Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina, Universidad de la República.
- A los integrantes del laboratorio de reproducción asistida del Centro de Esterilidad Montevideo (*Dra. Cantú, MSc. Alciaturi*)
- A la Policlínica de Endocrinología y Metabolismo del Hospital de Clínicas, Universidad de la República (*Dra. Torosian, Dra. Close, Dra. Brignardello*)
- A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). *La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código "POS_NAC_2012_1_9117".*
- A los miembros del Tribunal

Foros

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis se presentaron en jornadas y congresos científicos.

1. **Análisis de polimorfismos de genes de la vía del receptor tipo toll4 con significancia funcional en el síndrome de ovario poliquístico.** XV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. 2014. Piriapolis, Uruguay
2. **TLR4 genetic variations in Uruguayan women with Polycystic ovary syndrome (PCOS).** OVARIAN CLUB III - The Inverse Pyramid: regulating follicle number and oocyte quality. 2013. Paris, Francia
3. **Polimorfismos de genes asociados a la respuesta inflamatoria en mujeres con patologías reproductivas.** XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. 2012. Piriapolis, Uruguay
4. **Asociaciones genético-inflamatorias en el Síndrome de ovario poliquístico.** Semana Académica del Hospital de Clínicas. 2011. Montevideo, Uruguay
5. **Incidencia del polimorfismo Asp299Gly del receptor TLR4 en infertilidad femenina.** XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. 2010. Piriapolis, Uruguay
6. **Polimorfismos genéticos asociados a síndrome de ovario poliquístico.** 1er Congreso Asociación Latinoamericana Endocrinología Ginecológica. 2010. Montevideo, Uruguay
7. **Avances en el estudio genético molecular de la PCOS en nuestra población.** Jornada Científica "Síndrome de Ovario Poliquístico" SURH. 2009. Montevideo, Uruguay