

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE MEDICINA  
Escuela de Tecnología Médica



## **TESIS PROFESIONAL**

*Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en  
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico*

**“Efecto a corto y largo plazo de la preñez sobre el transcriptoma ovárico  
murino y su implicancia en el riesgo de cáncer ovárico”**

**Alumna:** Valentina López Gómez

**Tutor:** Dr. Ulises Urzúa Tobar

2023

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE MEDICINA  
Escuela de Tecnología Médica



## **TESIS PROFESIONAL**

*Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en  
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico*

**“Efecto a corto y largo plazo de la preñez sobre el transcriptoma ovárico  
murino y su implicancia en el riesgo de cáncer ovárico”**

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser 'Valentina López Gómez', escrita con un estilo cursivo y fluido.

Valentina López Gómez

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser 'Ulises Urzúa Tobar', escrita con un estilo cursivo y fluido.

Dr. Ulises Urzúa Tobar

## Índice

<b>1. Resumen.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Palabras clave.....</b>	<b>8</b>
<b>4. Introducción.....</b>	<b>8</b>
4.1. Factores de riesgo.....	8
4.2. Etiología del CO.....	9
4.3. La función ovárica.....	10
4.3.1 El cuerpo lúteo en el ciclo ovárico y el embarazo.....	10
4.4. Rol de las hormonas esteroideas gonadales en el ovario durante el embarazo.....	12
4.4.1. Progesterona.....	12
4.4.2 Estradiol.....	13
4.4. Trabajo previo en Laboratorio de Genómica Aplicada.....	13
4.5 Planteamiento del problema de investigación.....	14
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>14</b>
<b>6. Objetivo General.....</b>	<b>15</b>
6.1. Objetivos Específicos.....	15
<b>7. Materiales y métodos.....</b>	<b>15</b>
7.1 Diseño experimental y previa obtención de datos.....	15
7.2 Análisis de transcriptomas y de expresión génica diferencial.....	16
7.3 Análisis de trabajos relacionados.....	17
7.4 Análisis de marcadores de tipos celulares ováricos.....	17
7.5 Análisis biológico de la expresión génica diferencial.....	18
<b>8. Resultados.....</b>	<b>18</b>
8.1 Genes expresados diferencialmente en ovarios de ratones jóvenes primíparas (OJP) respecto a jóvenes nulíparas (OJN).....	18
8.2. Análisis de trabajos relacionados.....	21
8.3. Análisis de marcadores por tipo celular.....	23
8.4. Análisis biológico funcional de genes sobre y subexpresados en OJP.....	26
8.4.1 Análisis de enriquecimiento de vías canónicas (CP) en genes sobreexpresados en OJP.....	27
8.4.2. Análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) en genes sobreexpresados en OJP.....	28
8.4.3. Análisis de enriquecimiento de vías canónicas (CP) en genes subexpresados en OJP.....	30
8.4.4. Análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO) en genes subexpresados en OJP.....	31
8.5. Comparación entre los GED de ovarios a edad fértil (OJP-OJN) con los GED de ovarios a edad post-reproductiva (OVM-OVN).....	33
<b>9. Discusión.....</b>	<b>36</b>

9.1. Genes regulados positivamente en el OJP.....	37
9.2. Genes regulados negativamente en OJP.....	40
9.3. Análisis de trabajos relacionados.....	42
9.4. Análisis de marcadores de tipo celular.....	44
9.4.1 Marcadores de expresión aumentada.....	44
9.4.2. Marcadores de expresión disminuida.....	47
9.5. Funciones enriquecidas en los genes regulados positivamente en el OJP.....	48
9.5.1 Hemostasis (CP).....	48
9.5.2. Inmunidad (CP).....	49
9.5.3. Matrisoma (CP).....	51
9.5.4 Apoptosis (GO).....	52
9.5.5 Transporte vesicular (GO y CP).....	55
9.6. Funciones enriquecidas en los genes regulados negativamente en el OJP.....	58
9.6.1. Ciclo Celular (CP y GO).....	58
9.6.2. Mitocondria (GO).....	60
9.7 Comparación entre los GED de ovarios a edad fértil (OJP-OJN) con los GED de ovarios a edad post-reproductiva (OVM-OVN).....	62
9.7.1. Genes que conservan su regulación positiva a largo plazo.....	63
9.7.2. Genes que conservan su regulación negativa a largo plazo.....	63
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>64</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>66</b>

## 1. Resumen

El cáncer de ovario (CO) es la segunda causa de muerte por cáncer ginecológico en el mundo. El riesgo de CO aumenta con la edad y se reduce por conductas reproductivas que interrumpen la continuidad de los ciclos ovulatorios de la mujer durante su vida fértil. Este efecto se basaría en un número reducido de eventos de ruptura y reparación proliferativa del epitelio de la superficie ovárica (OSE) en cada ciclo ovulatorio. De esta forma, la paridad reduce el riesgo de CO mientras que la nuliparidad lo aumenta. En esta Tesis se propuso investigar los cambios que el embarazo induce en la expresión génica del ovario y si dichos cambios persisten hasta la edad menopáusica influyendo en la reducción del riesgo frente al CO.

Se identificaron ~700 genes expresados diferencialmente (GEDs) al comparar los transcriptomas ováricos del ratón hembra primíparo frente al nulíparo a edad adulta. El análisis de vías canónicas y de ontología génica reveló una diversidad de procesos biológicos relacionados principalmente a la luteólisis funcional y estructural. Estos incluían la degradación de P4, un desbalance oxidativo, aumento de apoptosis y autofagia, la regulación de la inflamación, la remodelación de la MEC ovárica y la detención del desarrollo folicular. Se detectaron además genes implicados en la persistencia de funciones ováricas asociadas a la gestación a nivel sistémico, como por ejemplo la hemostasia, la angiogénesis, la secreción de algunas hormonas peptídicas, la sensibilidad a la insulina y la señalización de prolactina. El análisis de tipos celulares sugirió enriquecimiento de marcadores ovocitarios, de CG -particularmente atrésicas- y de células mesenquimales -principalmente fibroblastos-, mientras que la proporción de células estromales esteroideogénicas se vio reducida.

Finalmente, los GEDs por efecto del embarazo en ovarios adultos fueron comparados con los GEDs entre ovarios envejecidos con diferente historia de paridad, obtenidos en un trabajo previo del laboratorio. La coincidencia de GEDs alcanzó sólo un 3,8% (26 genes)

indicando que una gran parte de la expresión génica inducida por el embarazo a edad adulta aparentemente se pierde en la transición hacia edad post-reproductiva. Sin embargo, dentro de las coincidencias, se encontró genes implicados en la restricción del desarrollo folicular por inhibición de la señalización de TGF-beta y la mantención de la reserva ovárica dependiente de la AMH.

Se concluye que el embarazo en el modelo de ratón C57BL/6 genera profundos cambios en el transcriptoma ovárico postparto asociados a la regresión del cuerpo lúteo, a la persistencia de algunas funciones ováricas sistémicas remanentes de la gestación, cambios de la MEC ovárica y la inhibición de la maduración folicular. Es precisamente este último efecto el que parece perpetuarse en forma limitada hasta la edad post-reproductiva, y contribuiría al efecto protector ante CO mediante la mantención de una mayor reserva ovárica folicular residual en la condición de paridad. Un estudio interesante a futuro sería caracterizar funcional o fenotípicamente la reserva ovárica residual en ambas condiciones de paridad.

## **2. Abstract**

Ovarian cancer (OC) is the second cause of death from gynecological cancer worldwide. The OC risk increases with age and is reduced by reproductive behaviors that interrupt the continuity of a woman's ovulatory cycles during her fertile life. This effect would be based on a lower number of events of rupture and proliferative repair of the ovarian surface epithelium (OSE) in each ovulatory cycle. Thus, parity reduces the OC risk while nulliparity increases it. In this Thesis we proposed to investigate the changes that pregnancy induces in ovarian gene expression and whether these changes persist until menopausal age, influencing the reduction of risk against OC.

Nearly 700 differentially expressed genes (DEGs) were identified by comparing the ovarian transcriptomes of primiparous versus nulliparous female mice at adulthood. The

analysis of canonical pathways and gene ontology revealed a diversity of biological processes mainly related to functional and structural luteolysis. These included P4 degradation, an oxidative imbalance, increased apoptosis and autophagy, regulation of inflammation, remodeling of the ovarian ECM, and arrest of follicular development. Genes involved in the persistence of ovarian functions associated with pregnancy on a systemic level were also detected, such as hemostasis, angiogenesis, secretion of certain peptide hormones, insulin sensitivity and prolactin signaling. The analysis of cell types suggested an enrichment of oocyte markers, GC -particularly atretic- and mesenchymal cells -mainly fibroblasts-, while the proportion of steroidogenic stromal cells was reduced.

Finally, the DEGs due to pregnancy in adult ovaries were compared with the DEGs between aged ovaries with different parity history, obtained in a previous work of our laboratory. The coincident DEGs were just 3.8% (26 genes) indicating that a large part of the gene expression induced by pregnancy in adulthood is apparently lost in the transition to the post-reproductive age. However, among this limited coincidence, we identified three genes involved in the restriction of follicular development by inhibition of TGF-beta signaling and the maintenance of AMH-dependent ovarian reserve.

We conclude that pregnancy in the C57BL/6 mouse model generates profound changes in the postpartum ovarian transcriptome associated with the regression of the corpus luteum, the persistence of some systemic ovarian functions remaining from gestation, changes in the ovarian ECM and inhibition of follicular maturation. It is precisely this latter effect that seems to be perpetuated in a limited way until post-reproductive age, and would contribute to the protective effect against OC by maintaining a greater residual ovarian follicular reserve in the parity condition. An interesting future study would be to functionally or phenotypically characterize the residual ovarian reserve in both parity conditions.

### **3. Palabras clave**

Transcriptoma, ovario murino, embarazo, post-parto, cáncer ovárico, reserva folicular.

### **4. Introducción**

El cáncer ovárico (CO) es un tumor maligno cuya histología puede ser epitelial, estromal o de células germinales. El más común es el carcinoma epitelial, que constituye aproximadamente el 90% de todos los CO [1], y se presenta frecuentemente en la edad menopáusica [2]. A nivel mundial para el año 2020, el CO fue el octavo cáncer más frecuente en mujeres, con una incidencia de 6.6 y una mortalidad de 4.2 por cada 100.000 mujeres, siendo la octava causa de muerte por cáncer [3]. En nuestro país, el CO fue el tercer cáncer ginecológico más frecuente en mujeres con una incidencia de 6.0 y una mortalidad de 3.6 por cada 100.000 mujeres en el año 2020 [3].

En general, el CO es de mal pronóstico y potencialmente mortal, ya que aproximadamente dos tercios de todos los cánceres epiteliales de ovario suelen detectarse en etapas avanzadas [4]. Por esta razón, resulta de vital importancia la detección temprana y principalmente la prevención primaria, ya sea evitando factores de riesgo o fortaleciendo la exposición a factores protectores.

#### **4.1. Factores de riesgo**

Los datos epidemiológicos sugieren una fuerte relación entre el número de eventos ovulatorios y el riesgo de CO. La hipótesis de la ovulación incesante, la más aceptada, explica esta relación y postula que la ruptura y reparación proliferativa incesante del epitelio de la superficie ovárica (OSE), producto de la ovulación, favorece la acumulación de aberraciones genéticas en las células epiteliales que pueden derivar en una neoplasia maligna [5]. En este sentido, el embarazo constituye un factor protector al inhibir la ovulación,

disminuyendo el riesgo de CO en forma proporcional al número de embarazos. Bajo esta misma lógica, la lactancia y el uso de anticonceptivos orales también disminuyen el riesgo al inducir la anovulación [6, 7].

La edad también constituye un factor de riesgo importante. De hecho, la incidencia y mortalidad de CO alcanzan un máximo durante la perimenopausia y posmenopausia temprana [8]. Además, se ha sugerido que el agotamiento de la reserva folicular ovárica que subyace a la menopausia podría ser un factor importante que contribuya a un mayor riesgo de CO, asociado directamente con los hallazgos epidemiológicos sobre la historia reproductiva. El agotamiento folicular altera la homeostasis ovárica al provocar un aumento de las gonadotropinas séricas y estas estimulan un entorno inflamatorio que facilita la transformación maligna de las células de la OSE y el desarrollo de CO [9].

#### **4.2. Etiología del CO**

La localización intraabdominal del ovario y la detección de CO en estados avanzados han dificultado el estudio de los eventos genéticos y moleculares que dan origen a la enfermedad. La etiología del CO sigue siendo poco conocida, de hecho, sigue sin definirse concluyentemente cuál es la célula de origen del CO epitelial [8]. Hasta la fecha se han propuesto dos hipótesis sobre el origen del CO. Por un lado, se piensa que el CO surge de la invaginación de la superficie ovárica y la consecuente formación de quistes de inclusión, que están sujetos a estimulación proliferativa del estroma ovárico, por lo que sufren displasia y metaplasia [10]. Otra hipótesis postula que el epitelio de la fimbria oviductal puede desarrollar lesiones del tipo carcinoma intraepitelial tubárico seroso (STIC) y estas células transformadas pueden desprenderse y alojarse dentro del estroma ovárico generando un quiste de inclusión revestido por epitelio oviductal [11]. Independientemente del origen de este quiste de inclusión, eventualmente puede derivar en un carcinoma epitelial de ovario.

### **4.3. La función ovárica**

El ovario mamífero es un órgano altamente dinámico y heterogéneo que transita cíclicamente por cuatro fases: desarrollo folicular, ovulación, luteinización y luteólisis [12]. Cada fase está coordinada por múltiples vías de señalización e interacciones funcionales que permiten la comunicación entre el ovocito, las células de la granulosa (CG), las células de la teca (CT) de los folículos ováricos, y las células estromales como fibroblastos, células endoteliales y células inmunes [13]. Los folículos ováricos constituyen la unidad funcional endocrina del ovario y determinan el potencial y la duración de la vida reproductiva [14].

El ciclo ovárico está controlado por la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) desde el hipotálamo, lo que induce la liberación de las gonadotropinas hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) desde la hipófisis. Brevemente, la FSH actúa sobre las CG del folículo en desarrollo, estimulando la síntesis de estradiol para el desarrollo folicular y maduración del ovocito [15]. La FSH también estimula la expresión del receptor de LH (LHCGR), lo que sensibiliza a las células de la teca para la síntesis de andrógenos, que a su vez son precursores de la síntesis de estradiol en las CG [16]. Un aumento repentino de LH induce la maduración final del folículo ovárico, desencadena la ovulación e inicia la luteinización. Este último proceso se caracteriza por una rápida proliferación de las CG y CT remanentes del folículo ovulado, que luego se diferencian terminal e irreversiblemente en células esteroideogénicas lúteas grandes y pequeñas formando el cuerpo lúteo (CL), respectivamente [17].

#### **4.3.1 El cuerpo lúteo en el ciclo ovárico y el embarazo**

El CL es una glándula endocrina temporal cuya función es la producción de hormonas peptídicas como relaxina y hormonas esteroideas como progesterona (P4) que prepara el endometrio para la implantación del embrión y el mantenimiento del embarazo [18]. Durante su formación, una buena parte de las células esteroideogénicas se hipertrofia [19], lo que

aumenta el tamaño de la glándula. Esto va acompañado de una extensa angiogénesis impulsada por la expresión de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular A (*VEGFA*) [20]. El CL expresa factores pro-angiogénicos durante toda la fase lútea y el embarazo [21]. Un CL altamente vascularizado es esencial para la función lútea, tanto para el transporte de la P4 desde las células esteroideogénicas hacia la circulación, como para una apropiada nutrición del CL [22], que se requiere para la síntesis de grandes cantidades de P4 [15].

En ausencia de fecundación, la vida del CL es limitada y deja de sintetizar P4, en un proceso conocido como regresión lútea o luteólisis. Por el contrario, si hay fecundación ocurre un fenómeno conocido como “rescate del CL” promovido por la prolactina (PRL). El estímulo coital en ratones induce la secreción de PRL desde la hipófisis [23], un importante factor luteotrópico que rescata el CL de la involución, suprimiendo la expresión de la enzima 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (20 $\alpha$ -HSD) en el ovario, a través de los transductores y activadores de la transcripción (*Stats*) [24, 25]. La supresión de la 20 $\alpha$ -HSD, enzima que cataliza la conversión de P4 en su forma inactiva, la 20 $\alpha$ -dihidroprogesterona (20 $\alpha$ -DHP) [24], mantiene los niveles de P4 necesarios para las etapas iniciales de implantación y mantención del embarazo [25]. En el ratón, a diferencia del humano, en el que la producción de P4 se deriva desde el CL a la placenta en el tercer trimestre [26], el CL persiste durante todo el período gestacional, constituyendo la principal fuente de P4 [27].

Muchos de los cambios ocurridos en el ovario post-parto dependen del CL. Por otro lado, una vez finalizado el período de gestación, ocurre una involución del cuerpo lúteo, que comprende una regresión funcional y estructural [28]. La luteólisis funcional se define como la disminución de P4 inducida por la secreción uterina pulsátil de prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) [29], un potente agente luteolítico de acción inversa a PRL. La PGF2 $\alpha$  se une a su receptor en el CL induciendo la expresión de la enzima 20 $\alpha$ -HSD [30] y simultáneamente reprime la expresión del receptor de PRL (PRL-R) [31]. En consecuencia, la PGF2 $\alpha$  genera

una caída abrupta de la P4 sérica que es incapaz de sustentar el embarazo y da inicio al parto.

Por su parte, la luteólisis estructural se define como una involución estructural del CL con la pérdida de células luteales [28] y angioregresión de células endoteliales [32]. Esta fase se caracteriza por procesos apoptóticos complejos cuyos mecanismos no han sido definidos del todo. Algunos estudios sobre apoptosis del CL en ratas preñadas han identificado tres factores mediadores de la muerte celular ovárica: citoquinas, Fas/FasL y caspasas [28].

Como se mencionó, las conductas reproductivas que detienen los ciclos ovulatorios reduciendo así su número total a lo largo de la vida fértil de la mujer, confieren protección ante el desarrollo de CO. Por lo tanto, el particular interés en esta Tesis es analizar el efecto del embarazo sobre el perfil de expresión génica del ovario en el postparto inmediato y determinar si dicho efecto se mantiene, se pierde o se modifica hacia el final de la vida reproductiva.

#### **4.4. Rol de las hormonas esteroideas gonadales en el ovario durante el embarazo**

El efecto protector del embarazo en la incidencia y desarrollo de CO ha sido atribuido principalmente a la P4. Un efecto similar estaría dado por los progestágenos contenidos en los anticonceptivos anovulatorios, cuyo consumo también ha sido vinculado a una reducción del riesgo de CO.

##### **4.4.1. Progesterona**

Los efectos beneficiosos del embarazo -período en donde los niveles de P4 son 10 veces mayores que los niveles en fase lútea del ciclo menstrual- y el aumento de la incidencia de CO en mujeres deficientes de P4 refuerzan esta hipótesis [33]. De forma similar, un meta-análisis de datos de 45 estudios epidemiológicos estimó que una mayor

duración del uso de ACO se correlacionó con un menor riesgo y que esta reducción en el riesgo de CO persistió durante más de 30 años después de que cesó el uso de ACO [7]. Más del 95% de los ACO utilizados en estas poblaciones habrían sido del tipo combinado (estrógeno-progestágeno).

Varias investigaciones sustentan la hipótesis de que la P4 podría estimular su propia producción. Si bien no se han identificado receptores de P4 (PR) en el CL, se ha observado una inhibición en la producción de la P4 luteal en ratas preñadas tras la administración intraovárica de anticuerpos de P4 o antagonistas del PR [34]. Asimismo, al tratar cultivos de células luteales con R5020 (P4 sintética), se observó un incremento en la producción de P4 en relación al cultivo control [35].

#### **4.4.2 Estradiol**

Por su parte, el estradiol producido por las células lúteas actúa sobre sus propios receptores en el CL estimulando la producción de P4, la vascularización y la hipertrofia del CL a lo largo del embarazo [36, 37]. Debido a su elevada concentración en el líquido folicular de folículos ovulatorios, se le ha asignado un papel promotor de la carcinogénesis ovárica [38].

#### **4.4. Trabajo previo en Laboratorio de Genómica Aplicada**

El estudio realizado por Urzúa et al [39] motiva la investigación que aborda esta Tesis. Estos autores estudiaron las diferencias del transcriptoma ovárico entre nuliparidad y multiparidad en ratones hembra C57BL/6 a edad comparable a la menopausia humana. Se observó que el ovario múltiparo envejecido retiene una mayor cantidad de folículos ováricos respecto a su contraparte nulípara. Estos hallazgos relacionan la disminución de la reserva ovárica con el riesgo de CO observado en la menopausia [8]. Más aún, sugieren que el

agotamiento folicular del ovario depende no sólo de la edad, sino que también del historial reproductivo durante la edad fértil.

Las conclusiones de este estudio sugieren que la multiparidad durante la vida reproductiva promueve la retención de folículos y mejora la inmunovigilancia innata local y sistémica en ratones hembra en edad estropáusica. Estos resultados plantean la necesidad de comprender el (los) posible(s) mecanismo(s) mediante el cual el embarazo durante la vida fértil, se asocia a la reducción del riesgo de CO a largo plazo.

#### **4.5 Planteamiento del problema de investigación**

Un estudio adicional del Laboratorio de Genómica Aplicada permitió obtener perfiles transcriptómicos de ovarios de ratones hembra jóvenes con un parto (primíparas). Estos datos se analizaron en la presente Tesis para determinar el efecto del embarazo en la expresión génica ovárica a corto plazo. En conjunto con los datos ya publicados [39], se analizó si el efecto del embarazo sobre el transcriptoma ovárico a edad fértil, persiste, se modifica o se pierde en el ovario a edad estropausica.

Hasta la fecha no se han realizado estudios en ovarios humanos que apunten a identificar expresión génica diferencial inducida por el embarazo, ni en edad fértil ni en edad menopáusica. El análisis de datos transcriptómicos propuesto en esta Tesis permitirá determinar si los cambios en la expresión génica inducidos por el embarazo persisten o se pierden hasta la edad menopáusica y cuáles de ellos podrían estar involucrados en la reducción del riesgo frente al CO

#### **5. Hipótesis**

La preñez promueve cambios en la expresión génica del ovario. Algunos de esos cambios se mantienen en el largo plazo y podrían prevenir el desarrollo de una neoplasia en el ovario estropáusico.

## 6. Objetivo General

Identificar el efecto de la preñez a corto y largo plazo sobre la transcripción ovárica murina.

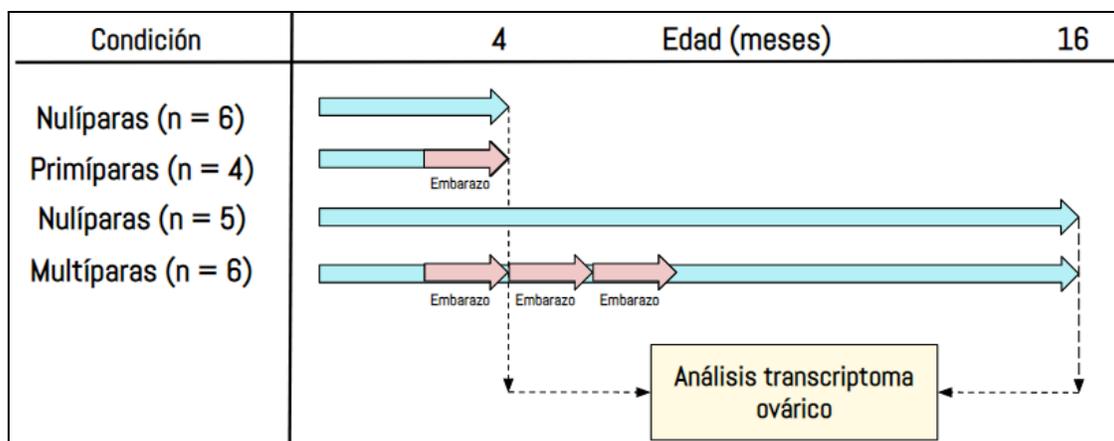
### 6.1. Objetivos Específicos

- A. Determinar expresión génica diferencial a nivel de transcriptoma completo entre ovarios nulíparos y ovarios primíparos, ambas condiciones en edad fértil (4 meses).
- B. Caracterizar la ontología, vías de transducción y vías metabólicas de la expresión génica diferencial entre ovario nulíparo y primíparo de edad fértil.
- C. Determinar si la expresión génica diferencial inducida por la preñez en edad fértil se altera a causa del envejecimiento ovárico (16 meses).

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Diseño experimental y previa obtención de datos

A partir de un proyecto desarrollado previamente, se disponía de una base de datos de transcriptomas ováricos de ratón (*Mus musculus*, C57BL6). Las variables de interés eran el estado de paridad (nulíparo, primíparo y múltiparo) y la edad (fértil y estropausica). En la **Figura 1** se muestran las condiciones analizadas en esta Tesis. Para abordar el objetivo específico “A” se compararon transcriptomas ováricos de animales nulíparos y primíparos en edad fértil. Los genes expresados diferencialmente que se identificaron, permitieron abordar el objetivo específico “B”, que apuntaba a caracterizar el significado biológico de dichos genes (ver más abajo). Finalmente, el objetivo “C” consistió en la comparación de la expresión diferencial ovárica observada a edad fértil (objetivo específico “A”) con la expresión diferencial ya reportada a edad estropausica [39].



**Figura 1.** Diagrama de flujo del estudio. Los transcriptomas ováricos de animales nulíparas y primíparas de 4 meses corresponden a edad fértil, mientras que los transcriptomas de animales nulíparas y multíparas de 16 meses corresponden a edad estropáusica.

El ARN ovárico total se extrajo con el kit All-Prep (Qiagen, GmbH). La amplificación de los ARN se realizó con el kit Ambion Illumina (Ambion, Austin), lo que permitió obtener un ARN complementario (ARNc) biotinilado. En breve, 550 ng de ARN total fueron retrotranscritos con partidores oligo (dT)-T7. Se obtuvo un ADNc primera hebra y luego un ADNc doble hebra, que sirve de molde para una transcripción in vitro con polimerasa T7 más biotin-NTPs. El ARNc biotinilado fue hibridado en microarreglos de perlas *Mouse Ref-8 expression v2* (Illumina, San Diego). Finalmente se añadió fluorolink streptavidin-Cy3 (Amersham, UK) para detectar la señal fluorescente con un escáner confocal Illumina. El análisis se realizó con Illumina Genome Studio v2011.1, módulo de expresión génica v1.9.0.

## 7.2 Análisis de transcriptomas y de expresión génica diferencial

Los datos fueron obtenidos en un proyecto previo (FONDECYT regular 1130292). Las intensidades de fluorescencia para 25.697 sondas en 10 experimentos (primíparas n=4; nulíparas n=6) fueron normalizadas mediante cuantiles. Los genes expresados diferencialmente (GED) fueron determinados mediante una prueba *limma* (*linear models for microarray data*) con el programa Pomelo II (<http://pomelo2.iib.uam.es/>). La prueba *limma* es una herramienta que calcula valores de p crudo y p ajustado, este último utilizando una

corrección por pruebas múltiples del tipo FDR (*False Discovery Rate*). Paralelamente se repitió un análisis de expresión diferencial utilizando el mismo test sobre datos ya publicados para ovarios en edad estropáusica (multíparos n=6; nulíparos n=5) por Urzúa et al [39]. Para ambos análisis se calculó la razón logarítmica en base 2 ( $\log_2$ ) de las veces de cambio ( $\log_2$  FC, del inglés *fold change*) entre el promedio de las intensidades de fluorescencia de las 25.697 sondas (18.600 genes únicos) de ovarios de animales de la misma edad (4 o 16 meses) y de las dos condiciones reproductivas (nuliparidad o paridad) estudiadas.

### 7.3 Análisis de trabajos relacionados

Mediante una búsqueda bibliográfica utilizando palabras clave se identificaron trabajos relacionados con la expresión de genes ováricos durante diferentes días de la gestación y postparto murinos. Desde el cuerpo de los artículos, o desde el material suplementario [40, 41, 42, 43], se recopilaron las listas de genes estudiados. Luego, estos genes se cotejaron con la planilla de datos completa de expresión diferencial entre OJP y OJN de la presente Tesis. Estos últimos fueron filtrados bajo criterios de  $p$  crudo  $< 0.05$  y  $FC \pm 0.5$ . La comparación se muestra en la **Tabla 3**.

### 7.4 Análisis de marcadores de tipos celulares ováricos

Se utilizó la información del estudio de Morris et al, 2022 [44] para obtener listados de genes marcadores para 6 tipos celulares ováricos, y marcadores para otros 14 subtipos derivados de los primeros. Desde nuestros datos, los genes seleccionados para este análisis fueron aquellos que presentaron una expresión génica diferencial ( $p$  crudo  $< 0.01$ ) de OJP respecto a OJN. Los resultados del análisis se muestran en la **Tabla 4**.

## 7.5 Análisis biológico de la expresión génica diferencial

La lista de GED fue analizada mediante *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>). El análisis se hizo en la colección de genes humanos previa conversión de la lista de GED con símbolos oficiales de la especie *Mus musculus*, ingresando la lista con la opción *Mouse (to be orthology-mapped)*. Se calcularon las primeras 100 coincidencias con FDR  $q\text{-value} < 0.05$ , seleccionando CP (Canonical Pathways) y GO (Gene Ontology).

## 8. Resultados

### 8.1 Genes expresados diferencialmente en ovarios de ratones jóvenes primíparos (OJP) respecto a jóvenes nulíparos (OJN)

Aplicando un  $adj\ p\ FDR < 0.05$  y  $\log_2\ FC > +1 / < -0.8$  para el resultado del t-test limma, se obtuvieron 692 GED en la comparación OJP versus OJN. Esta lista se descompuso en 418 genes regulados positivamente y 274 genes regulados negativamente en el OJP respecto al OJN. El log en base 2 de las veces de cambio (FC) para los GED regulados a la baja se fijó en  $< -0.8$  con el propósito de rescatar un número de genes comparable en ambos sentidos (sobre y sub-expresados), y con ello un número equivalente de términos biológicos significativos en el análisis GSEA en ambos sentidos. En las **Tablas 1 y 2** se muestran los 20 genes de mayor y menor expresión, respectivamente, ordenados en base al  $\log_2\ FC$  decreciente. Se describe una breve reseña funcional de cada gen.

**Tabla 1. Top 20 genes regulados positivamente en OJP**

Gen	Fold change	Función celular *
<i>Rln1</i> , relaxin 1	7.27	Hormona peptídica producida por el cuerpo lúteo. Modula el crecimiento y remodelación del cuello uterino, y glándula mamaria, facilitando el parto y la lactancia [45].

<i>Serpinb2</i> , serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2	5.60	Inhíbe el activador del plasminógeno y regula negativamente la fibrinólisis [46].
<i>Serpina6</i> , serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 6	5.55	Transporte plasmático de progestinas y glucocorticoides. Expresado en ovario murino al final de la gestación [40].
<i>Mmp10</i> , matrix metallopeptidase 10	5.49	Rol en los cambios foliculares asociados con la ovulación, luteinización y luteólisis en humano y rata [47, 48]
<i>Grp</i> , gastrin releasing peptide	4.33	Promueve la desgranulación de mastocitos [49].
<i>Kng1</i> , kininogen 1	4.06	Codifica para el precursor de los cininógenos, que poseen un rol pro-inflamatorio en la ovulación [50].
<i>Nt5e</i> , 5' ectonucleotidase	3.91	Promueve un entorno antiinflamatorio [51] y antitrombótico [52] a través de la adenosina. Aumenta su actividad en plaquetas de mujeres embarazadas [53].
<i>Csgalnact1</i> , chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1	3.89	Regula la síntesis de sulfato de condroitina y participa en la regeneración y plasticidad neuronal [54]. Alta expresión en extremidades y lóbulo frontal de ratón.
<i>Rnase1</i> , ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	3.44	Regulador negativo de la inflamación en el sistema cardiovascular inducida por eARN secundario al daño tisular [55]
<i>Enpp2</i> , autotaxin	3.42	Participa en la regresión del cuerpo lúteo. Expresado predominantemente en las células esteroideogénicas lúteas [56].
<i>Prol1/Muc10</i> , proline rich, lacrimal 1	3.37	Principal mucina de la glándula submandibular de ratón [57]. Altamente expresado en ovario de ratón.
<i>Emb</i> , embigin	3.17	Proteína transmembrana involucrada en la adhesión celular y recepción de señales [58]. Altamente expresada en ovario de ratón.
<i>Cdc73</i> , cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component	3.16	Supresor tumoral de carcinomas paratiroideos [59]. Regulada negativamente en muchos tipos de cánceres.
<i>Scgb1a1</i> , secretoglobin, family 1A, member 1	3.12	Inhíbe la producción de citoquinas y quimioquinas en macrófagos alveolares [60]. Expresión detectada previamente en pulmón.
<i>Cyp4f18</i> , cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 18	3.04	Participa en la regulación negativa de la respuesta a LTB4 en neutrófilos. Altamente expresado en ovario y bazo de ratón [61].
<i>Tmem178</i> , proteína transmembrana 178	3.00	Reduce la respuesta proinflamatoria de los macrófagos [62]. Se expresa altamente en cerebelo.
<i>Gpr176</i> , G protein-coupled receptor 176	2.86	Modulador negativo de la síntesis de AMPc en el SNC. Implicado en el comportamiento circadiano [63].
<i>Lbh</i> , limb-bud and heart	2.60	Cofactor transcripcional que promueve un estado de MaSC basal multipotente y reprime la diferenciación luminal en la glándula mamaria [64].

<i>Ggct</i> , gamma-glutamyl cyclotransferase	2.53	Participa en el equilibrio redox y supervivencia de glóbulos rojos mediante la regulación del metabolismo del glutatión [65].
<i>Cblb</i> , casitas B-lineage lymphoma b	2.50	Regulador negativo de la activación de células inmunes como linfocitos T y B, células asesinas naturales (NK) y células dendríticas (DC) [66].

Genes seleccionados según los 20 valores positivos máximos de fold change con criterio de FDR < 0.05 en OJP. (\*) Se realizó búsqueda en PubMed y en GeneCards priorizando funciones relacionadas a la biología del ovario.

**Tabla 2. Top 20 genes regulados negativamente en OJP**

Gen, descripción	Fold change	Función celular *
<i>Cdhr5</i> , cadherin related family Member 5	-1.81	Componente del complejo de adhesión entre microvellosidades de células epiteliales [49].
<i>Lrat</i> , lecithin retinol acyltransferase	-1.80	Forma ésteres de ácido retinoico [67]
<i>Gpha2</i> , glycoprotein hormone subunit alpha 2	-1.53	Subunidad de una glicoproteína heterodimérica que se une y activa al TSHR [49]. Expresión específica de glándula suprarrenal y ovario.
<i>Ankrd35</i> , ankyrin repeat domain 35	-1.43	Función desconocida. Se expresa altamente en vejiga de ratón.
<i>Kctd14</i> , potassium channel tetramerization domain containing 14	-1.42	Altamente expresado en ovario. Podría participar en el desarrollo folicular [68].
<i>ApoE</i> , apolipoprotein E	-1.39	Transporte de colesterol para esteroidogénesis en folículos ováricos [69].
<i>Rsph3a</i> , radial spoke 3A homolog	-1.39	Proteína de anclaje de proteína quinasa A que se une a ERK1/2 [49]. Amplia expresión en ovario de ratón.
<i>Abcg4</i> , ATP binding cassette subfamily G member 4	-1.37	Transportador de la familia ABC. Podría participar en el transporte de colesterol [70].
<i>Lum</i> , lumican	-1.37	Participa en la ovulación. Alterado en endometriosis [71].
<i>Sct</i> , secretin	-1.37	Hormona peptídica. Regula el equilibrio ácido-base [49].
<i>Tmem35</i> , transmembrane protein 35a	-1.34	Chaperona molecular que promueve el ensamblaje y la expresión de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en el cerebro [72].
<i>Eef2</i> , eukaryotic translation elongation factor 2	-1.34	Promueve la síntesis de estradiol en CG foliculares del ovario de ratón a través del aumento de la expresión de <i>Nr5a1</i> [73].
<i>Galnt10</i> , polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	-1.33	Participa en la O-glicosilación tipo mucina de proteínas secretadas y asociadas a la membrana [74]. Alta expresión en colon de ratón.
<i>Susd3</i> , sushi domain	-1.32	Alta expresión en ovario de ratón. Se sobreexpresa en respuesta a

containing 3		estrógenos en cáncer de mama [75]. Sin función conocida..
<i>Mmd2/Paqr10</i> , monocyte to macrophage differentiation-associated 2	-1.32	Mejora la retención y activación de la cascada de señalización de Ras [76].
<i>Metn</i> , meteorin, glial cell differentiation regulator	-1.31	Regula la diferenciación de las células gliales y promueve la extensión axonal [77]. Ampliamente expresado en el SNC. No se ha descrito su función en el ovario.
<i>Fus</i> , fused in sarcoma	-1.31	Participa en la regulación transcripcional, metabolismo del ARN y la reparación de daño en el ADN [78]. Expresión moderada en el ovario.
<i>Selenbp2</i> , selenium binding protein 2	-1.30	Su homólogo <i>Selenbp1</i> participa en el transporte de proteínas intra-Golgi [79] y en la modulación del estrés oxidativo [80]. Altamente expresado en colon, hígado y riñón.
<i>Gdf10</i> , growth differentiation factor 10	-1.29	Codifica para un ligando de la superfamilia TGF-beta. Participa en la formación y remodelación ósea [81], y en la diferenciación de adipocitos [82]. Alta expresión en útero, tejido adiposo y hueso [83].
<i>Fabp3</i> , fatty acid binding protein 3, muscle and heart	-1.29	Participa en absorción, transporte y catabolismo de ácidos grasos vía $\beta$ -oxidación mitocondrial [84]. Asociada a acumulación de lípidos en oocitos bovinos [85].

Genes seleccionados según los 20 mejores valores negativos de fold change con criterio de FDR < 0.05 en OJP. (\*) Se realizó búsqueda en PubMed y en GeneCards priorizando funciones relacionadas a la biología del ovario.

## 8.2. Análisis de trabajos relacionados

Como una forma de validar nuestros resultados y comprender mejor los cambios en la expresión génica ovárica debido a la preñez y postparto en ovarios de ratones jóvenes primíparas (OJP), se hizo una búsqueda manual de estudios relacionados en PubMed utilizando las palabras *corpus luteum* AND *ovary* AND *mouse* AND *gene expression* AND *pregnancy* NOT *pcos*. Se obtuvieron 67 artículos, de los cuales se seleccionaron los siguientes cuatro: i) Waite et al, 2016 [40], donde se exploran las alteraciones dependientes de Gq/11 en el transcriptoma ovárico de ratones al final de la gestación; ii) Foyouzi et al., 2005 [41], que determinan variaciones en la expresión de genes esteroideogénicos y antioxidantes en el cuerpo lúteo de ratón durante la luteólisis; iii) Miyado et al, 2015 [42], donde se estudia la influencia del gen *Maml1* en la luteólisis funcional en ratones; y iv) Mejia

et al, 2015 [43], acerca de la participación de Gq/11 en el parto murino. Desde estos artículos se recopilieron genes candidatos que se expresaban en el ovario en días específicos de la gestación, en el post parto murino y en ovarios de ratones no preñados. Luego se hizo una búsqueda manual de cada uno de ellos en nuestra planilla de resultados del test de *limma* para determinar si había un aumento o disminución de su expresión en el OJP. Se seleccionaron aquellos que cumplieron con el criterio  $p$  crudo  $< 0.05$  y fold change  $\pm 0.5$ . La comparación se muestra en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Comparación de GED en OJP con GED de trabajos relacionados en ovario de *M. musculus***

Gen	FC (esta Tesis)	Referencias*
Akr1c18	1.8 ↑	[↑] 1, [↑] 3, [↑] 4a
Ch25h	2.7 ↑	[↑] 2
Hsd17b7	1.16 ↑	[↓] 1, [↓] 2
Tnc	2.29 ↑	[↑] 1
Cdkn2b	2.04 ↑	[↑] 1
Onecut2	2.19 ↑	[↑] 1
Rgl1	1.57 ↑	[↑] 1
Bhlhe40	2.07 ↑	[↑] 1
Sbsn	1.81 ↑	[↑] 1
Chrna1	1.5 ↑	[↑] 1
Serpina6	5.55 ↑	[↓] 1
Enpp2	3.42 ↑	[↓] 1
Grp	4.33 ↑	[↓] 1
Itih4	1.52 ↑	[↓] 1
Kng1	4.06 ↑	[↓] 1
Cryba4	1.25 ↑	[↓] 1
Lrp11	0.94 ↑	[↓] 1
Lhcgr	1.8 ↑	[↓] 1, [↑] 4b
Slc41a3	1.39 ↑	[↓] 1
Sfrp4	2.42 ↑	[↓] 1, [↑] 4b

Los GED coincidentes entre esta Tesis (OJP vs OJN) y los trabajos relacionados se seleccionaron con un criterio de  $p$  crudo  $< 0.05$  y FC  $\pm 0.5$ .\* Las referencias corresponden a: **[1]** Waite et al, 2016. GED entre el día 18 de gestación y 1-2 días postparto. **[2]** Foyouzi et al, 2005. GED entre los días 15 y 19 de gestación. **[3]** Miyado et al, 2015. GED entre los días 17.5 y 18.5 de gestación. **[4a]** Mejia et al, 2015. GED entre el día 14 de gestación y 1-2 días postparto. **[4b]** GED entre ratones no preñados y ratones en el día 14 de gestación. Flechas hacia arriba (↑) y hacia abajo (↓) indican un aumento o disminución de la expresión génica en el período señalado.

### 8.3. Análisis de marcadores por tipo celular

Dado que nuestros datos transcriptómicos de ovario no dan cuenta de la expresión génica en cada tipo celular, nos pareció útil estudiar el nivel de expresión de genes marcadores de varios tipos celulares en el ovario y determinar si su expresión se alteraba debido a la preñez y al parto murino. Mediante secuenciación de RNA de células únicas y el uso de herramientas bioinformáticas como Seurat y MAST, Morris et al [44] identificaron los 10 genes con mayor expresión en 6 tipos celulares característicos del ovario: granulosa, mesénquima, endotelial, inmune, ovocito y epitelial. De los dos primeros, estos autores identificaron 6 subtipos celulares de granulosa y 8 subtipos mesenquimales, cada uno de ellos también con sus respectivos 10 genes de expresión elevada. Además, estos marcadores fueron validados mediante hibridación *in situ* de ARN y/o inmunohistoquímica para confirmar su expresión en sitios específicos del ovario. Desde nuestra planilla de datos se filtraron manualmente los valores de FC para todos estos marcadores (ver sección 7.4). En la **Tabla 4** se muestran los genes marcadores expresados diferencialmente entre OJP y OJN ( $p$  crudo  $< 0.01$ ). Para un total de 198 marcadores, 41 mostraron expresión diferencial entre las condiciones estudiadas.

Tabla 4. Expresión de genes marcadores de tipo celular en OJP respecto a OJN

<b>A. Marcadores de tipos celulares característicos del ovario</b>		
<b>Genes</b>	<b>Tipo</b>	<b>Fold change</b>
<i>Slc18a2</i>	Granulosa	1.57
<i>Fam13a</i>	Granulosa	0.95
<i>Col3a1</i>	Mesenquimal	0.85
<i>Tcf21</i>	Mesenquimal	-0.69
<i>Lum</i>	Mesenquimal	-1.36
<i>Cd93</i>	Endotelio	1.15
<i>H2-Aa</i>	Inmune	1.05
<i>Oosp1</i>	Ovocito	1.36
<i>Rfp14</i>	Ovocito	0.80
<i>Upk1b</i>	OSE	1.07
<i>Gpm6a</i>	OSE	0.76
<b>B. Marcadores de subtipos celulares mesenquimales</b>		
<b>Genes</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Fold change</b>
<i>Htra3</i>	Céls. esteroideogénicas estromales	-0.86
<i>Tcf21</i>	Céls. esteroideogénicas estromales	-0.69
<i>Itih5</i>	Céls. esteroideogénicas estromales	-0.70
<i>Enpp2</i>	Céls. similares a fibroblastos	3.41
<i>Fzd1</i>	Céls. similares a fibroblastos	0.62
<i>Plat</i>	Céls. similares a fibroblastos	0.62
<i>Tnc</i>	Céls. similares a fibroblastos	2.29
<i>Adcy7</i>	Teca temprana	-0.73
<i>Thbd</i>	Teca temprana	1.30
<i>Mest</i>	Teca temprana	0.57
<i>Stmn1</i>	Teca temprana	0.92
<i>Hhip</i>	Teca temprana	0.97
<i>Hmgb2</i>	Teca temprana	-1.0

<i>Aldh1a1</i>	Teca esteroideogénica	0.64
<i>Folr1</i>	Teca esteroideogénica	-0.61
<i>Acsbg1</i>	Teca esteroideogénica	-0.88
<i>Serpina5</i>	Teca esteroideogénica	-0.76
<i>Ednrb</i>	Músculo liso	1.37
<i>Rgs4</i>	Pericitos	0.85
<b>C. Marcadores de subtipos celulares de la granulosa</b>		
<b>Genes</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Fold change</b>
<i>Kctd14</i>	Preantral-Cúmulo	-1.42
<i>Slc18a2</i>	Preantral-Cúmulo	1.57
<i>Fndc5</i>	Preantral-Cúmulo	-0.84
<i>Wt1</i>	Preantral-Cúmulo	0.63
<i>Mro</i>	Antral-Mural	1.50
<i>Nap1l5</i>	Antral-Mural	1.50
<i>Ghr</i>	CG atrésicas	0.45
<i>Cald1</i>	CG atrésicas	1.47
<i>Itih5</i>	CG atrésicas	-0.70
<i>Asb4</i>	CG atrésicas	0.41
<i>Cdc42ep3</i>	CG atrésicas	0.92
<i>Birc5</i>	CG mitóticas	-0.69
<i>Hmgb2</i>	CG mitóticas	-1.00
<i>Col3a1</i>	CL activo	0.85
<i>Igfbp7</i>	CL activo	0.65
<i>Sfrp4</i>	CL activo	2.42
<i>Birc5</i>	CG antrales mitóticas	-0.69
<i>Nap1l5</i>	CG antrales mitóticas	1.50
<i>Tnc</i>	CL en regresión	2.29
<i>Sfrp4</i>	CL en regresión	2.42

A. Marcadores de tipos celulares característicos del ovario. B. Marcadores de subtipos celulares mesenquimales. C. Marcadores de subgrupos celulares de la granulosa. Fold change positivo y negativo indican un aumento o disminución, respectivamente, en la expresión génica en OJP.

#### 8.4. Análisis biológico funcional de genes sobre y subexpresados en OJP

GSEA es una herramienta para analizar una lista de GED e identificar dentro de ella subgrupos de genes asociados a diversas funciones, vías y fenotipos biológicos. Cuando la proporción dentro de la lista de GED de un subgrupo de genes clasificados en cierta función o vía es mayor a la proporción para aquella vía o función en una lista al azar del mismo tamaño que la lista de GED, ambas con respecto al genoma completo, tenemos que aquel subgrupo está sobrerrepresentado o enriquecido en la lista de GED. Como resultado, GSEA calcula el parámetro “k/K” donde (k) representa la fracción de genes de nuestra lista que pertenecen a una categoría específica y (K) es el número total de genes en esa categoría en todo el genoma.

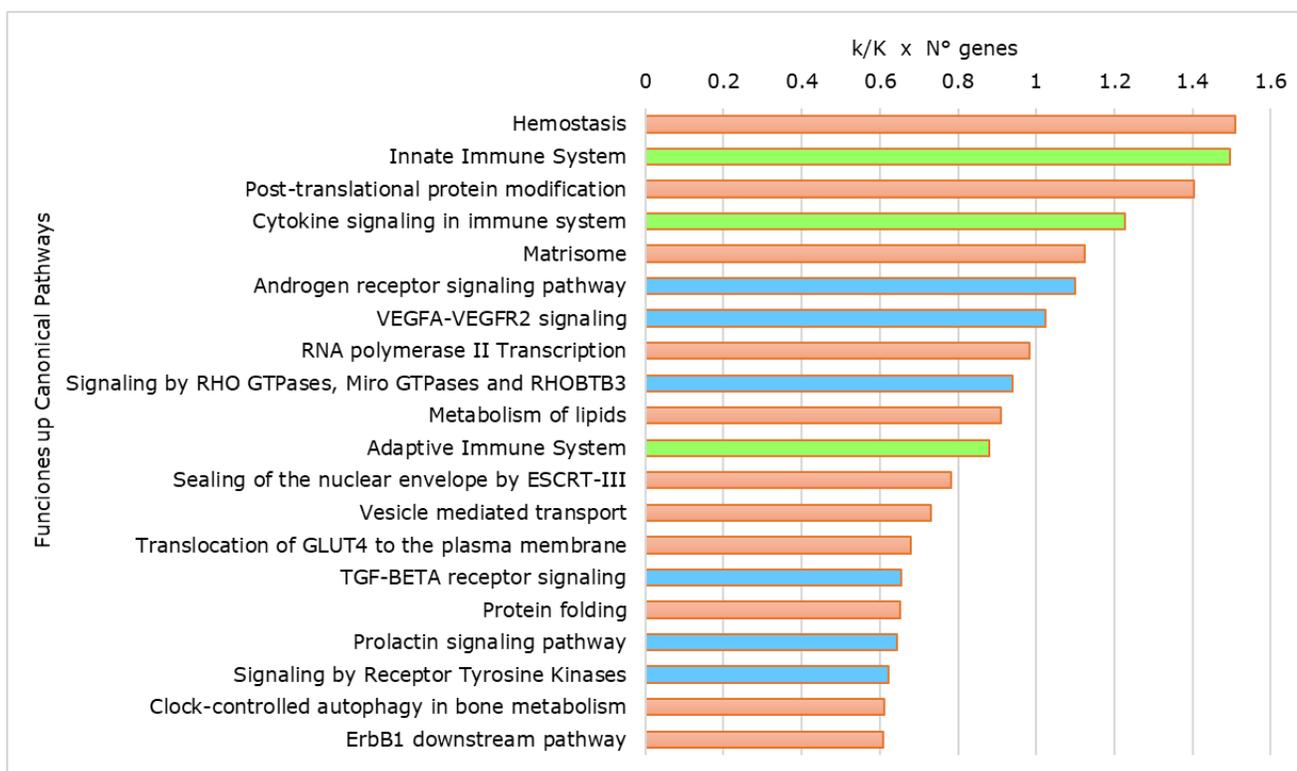
Se realizaron análisis de enriquecimiento en GSEA para los genes up y down regulados separadamente, con las opciones *Gene Ontology* (GO) y *Canonical Pathways* (CP), cuyo método se detalla en la sección 7.5. Del total de 692 GED únicos, 684 genes fueron convertidos a ortólogos humanos y 681 genes se utilizaron en los análisis de enriquecimiento. Para los genes *4930486L24Rik*, *E330034G19Rik*, *Ifi47*, *Mug-ps1*, *Oog1*, *Prol1*, *H2-M2* y *Hist1h2ad* no se encontraron ortólogos humanos, mientras que los siguientes pares fueron convertidos a un único ortólogo humano: *2010005H15Rik* y *Gm5483* a *CSTA*; *Kng1* y *Kng2* a *KNG1*; y *Selenbp1* y *Selenbp2* a *SELENBP1*.

En el proceso de selección de términos de GO y vías CP significativas se eliminaron aquellos(as) que carecían de relevancia informativa por ser demasiado generales. Además, cuando los genes de cierto término o vía estaban contenidos en otro(a) más amplio, se priorizó este último. Luego, dado el diverso número de funciones resultantes, se fijó un criterio de prioridad basado en el producto entre el número de genes en cada término GO o CP multiplicado por el enriquecimiento k/K [# genes × k/K]. Así, este producto constituía un valor numérico que ponderaba términos con un buen enriquecimiento (k/K) y con un número

alto de genes. En lo sucesivo, es necesario aclarar que un mayor enriquecimiento (k/K) no necesariamente corresponde a un mayor número de genes en cierto término, sea éste de CP o de GO.

#### 8.4.1 Análisis de enriquecimiento de vías canónicas (CP) en genes sobreexpresados en OJP

Las vías canónicas (CP, del inglés *canonical pathways*) que GSEA utiliza para calcular enriquecimiento incluyen las bases de datos *Reactome* (<https://reactome.org/>), *WikiPathways* (<https://www.wikipathways.org/>) y *KEGG* (<https://www.genome.jp/kegg/>) entre otras. La **Figura 2** representa la distribución de CP clasificadas en forma decreciente según el producto [# genes × k/K] de cada término o vía. *Hemostasis* fue la función clasificada en primer lugar con 32 genes, entre los que se encontraban *SERPINB2* (Serpin Family B Member 2), que inhibe el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa y *KNG1* (*Kininogen 1*) un inhibidor de tiol proteasas [49], ambos fueron parte de los top 20 sobre-regulados en el OJP (**Tabla 1**). A continuación, *Innate immune system*, compuesta por 41 genes donde destacaron *HLA-DQA1* (Major Histocompatibility Complex, Class II, DQ Alpha 1), participa en la presentación de antígenos y *IL1RN* (Interleukin 1 Receptor Antagonist), encargado de contrarrestar la inflamación sistémica descontrolada [49]. *Post translational protein modification* fue la función con mayor número de genes (44) donde cabe mencionar a *PSMD12* (Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 12), implicado en la degradación de proteínas ubiquitinadas, *UBE2D3* (Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 D3), enzima conjugadora de ubiquitina E2 y *USP14* (Ubiquitin Specific Peptidase), enzima desubiquitinante asociada al proteasoma [49]. La función mejor clasificada según el parámetro k/K fue *Sealing of the nuclear envelope by ESCRT-III*, que contenía 5 genes, cuyo gen más relevante fue *IST1* (IST1 Factor Associated With ESCRT-III), implicado en el reeemplazamiento de la envoltura nuclear [49].

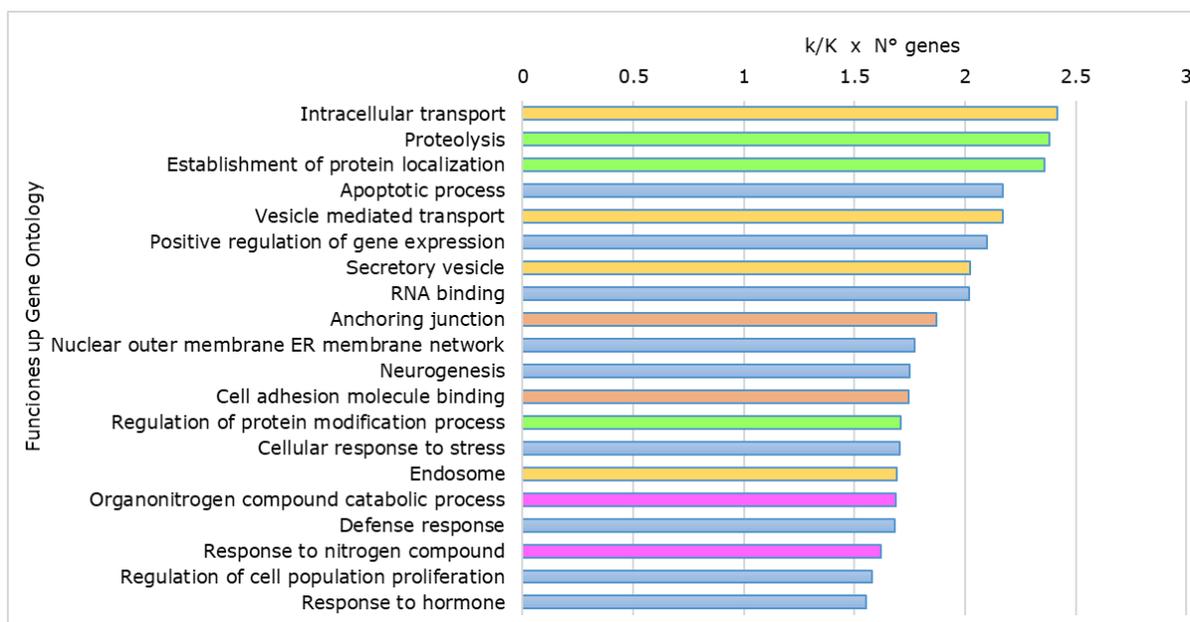


**Figura 2. Distribución de funciones CP enriquecidas en los genes sobreexpresados en OJP.** Se ingresaron los 418 genes regulados positivamente para su análisis de enriquecimiento en GSEA para 100 sets con FDR < 0.05. Se muestran las 20 vías canónicas clasificadas en orden decreciente en base al producto  $[k/K \times N^\circ \text{ genes}]$ . Las barras de un mismo color reflejan actividades biológicas relacionadas.

#### 8.4.2. Análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) en genes sobreexpresados en OJP

La herramienta ontología génica (GO, del inglés *Gene Ontology*) corresponde a una base de datos de información biológica que clasifica a todos los genes del genoma en tres amplios dominios: i) proceso biológico; ii) función molecular y iii) componente celular. Desde éstos, se derivan términos de un grado creciente de especificidad donde encontramos subconjuntos de genes que establecen interrelaciones jerárquicas entre diversos procesos, funciones y componentes celulares. De esta forma, cada gen puede ser clasificado en uno o más de aquellos tres dominios y sus derivados. Así, es posible caracterizar biológicamente subgrupos de genes dentro de una lista de GED. En la **Figura 3** se observa la distribución

de términos GO clasificados de mayor a menor según el parámetro [# genes × k/K] en los genes sobre-expresados en OJP. En primer lugar se encontraba el proceso *intracellular transport*, con un total de 62 genes donde destacan *TOMM70* (Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 70), que participa en la importación de proteínas precursoras mitocondriales y *ARL8A* (ADP Ribosylation Factor Like GTPase 8A), que juega un rol en la motilidad de los lisosomas [49]. Le siguió el proceso *proteolysis*, compuesto por 65 genes donde mencionamos *MMP10* (Matrix Metallopeptidase 10), que participa en la degradación de la matriz extracelular y *PREPL* (Prolyl Endopeptidase Like), una serina peptidasa [49]. El cuarto término, con igual número de genes (65), fue *apoptotic process*, dentro de los que mencionamos a *BCAP31* (B Cell Receptor Associated Protein 31), participa en la apoptosis mediada por caspasa 8 y *AIFM1* (Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1), un factor proapoptótico independiente de caspasas [49]. En base al parámetro k/K, el término mejor ranqueado fue *cell adhesion molecule binding* compuesto por 31 genes. Algunos son *TJP1* (Tight Junction Protein 1), proteína adaptadora de uniones estrechas; *VCL* (Vinculin), implicada en la adhesión célula-matriz y célula-célula; y *CTNNB1* (Catenin Beta 1), un componente de las uniones adherentes [49].

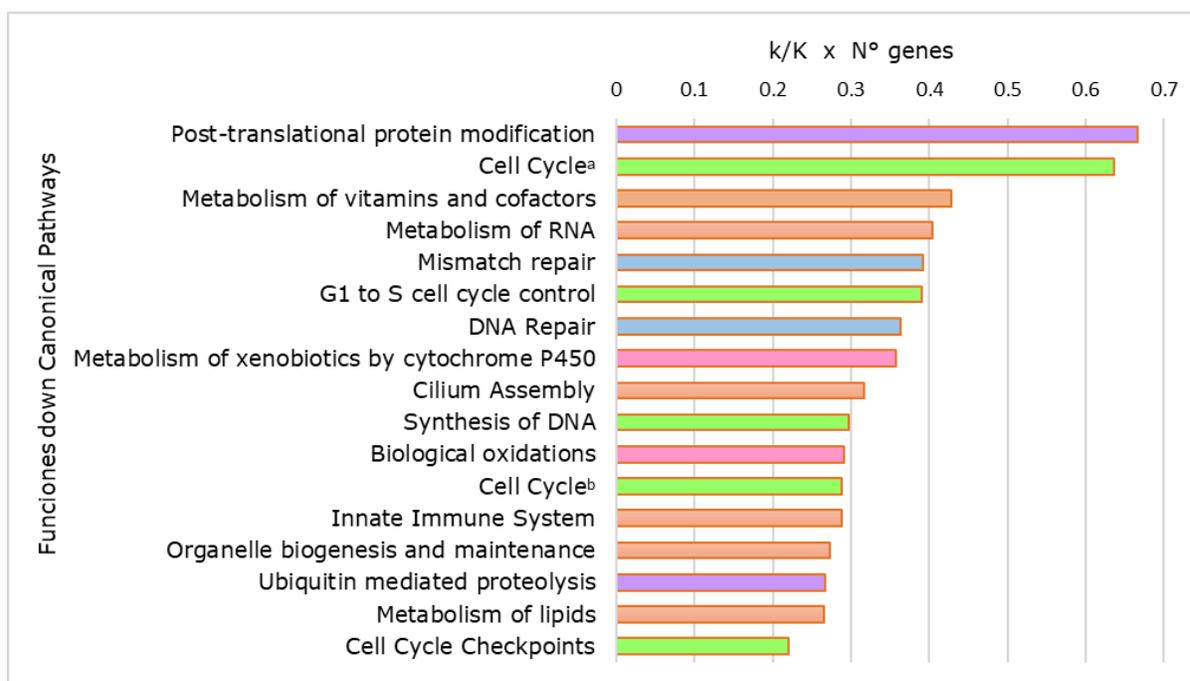


**Figura 3. Distribución de funciones GO enriquecidas en los genes sobreexpresados en OJP.** Se analizó el enriquecimiento de los 418 genes regulados positivamente en GSEA para 100 sets con FDR < 0.05. Se muestran los 20 términos de ontología génica mejor posicionados según el parámetro  $k/K \times N^\circ$  genes. ER: endoplasmic reticulum. Las barras de un mismo color reflejan términos biológicos relacionados.

#### 8.4.3. Análisis de enriquecimiento de vías canónicas (CP) en genes subexpresados en OJP

Como ya se mencionó, se detectaron 274 genes sub-expresados en el OJP respecto al OJN. El análisis de CP mostrado en la **Figura 4**, indica que la vía clasificada en primer lugar de acuerdo al producto  $[\# \text{ genes} \times k/K]$  fue *Post-translational protein modification*, que contenía a *PSMB10* (Proteasome 20S Subunit Beta 10), un componente del proteasoma y *CUL4A*, una ubiquitina ligasa E3 [49], como parte de un total de 30 genes. La segunda vía más enriquecida fue *Cell Cycle (Reactome)* con 21 genes, donde destacan *RRM2* (Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2), que participa en la síntesis de ADN y *NINL* (Ninein Like), que participa en la nucleación de microtubulos en la mitosis [49]. A continuación, con 18 genes, encontramos *Innate Immune System*, cuyos genes representativos eran *CYBA* (Cytochrome B-245 Alpha Chain), componente principal del

sistema microbicida oxidasa de los fagocitos y *C1QA* (Complement C1q A Chain), que forma parte del primer componente del sistema del complemento [49]. La vía mejor ranqueada según k/K fue *Mismatch repair* con 3 genes: *RPA2* (Replication Protein A2), involucrado en el metabolismo del ADN, *LIG1* (DNA Ligase 1), implicado en la reparación del ADN y *MLH3* (MutL Homolog 3), forma parte del sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN [49].

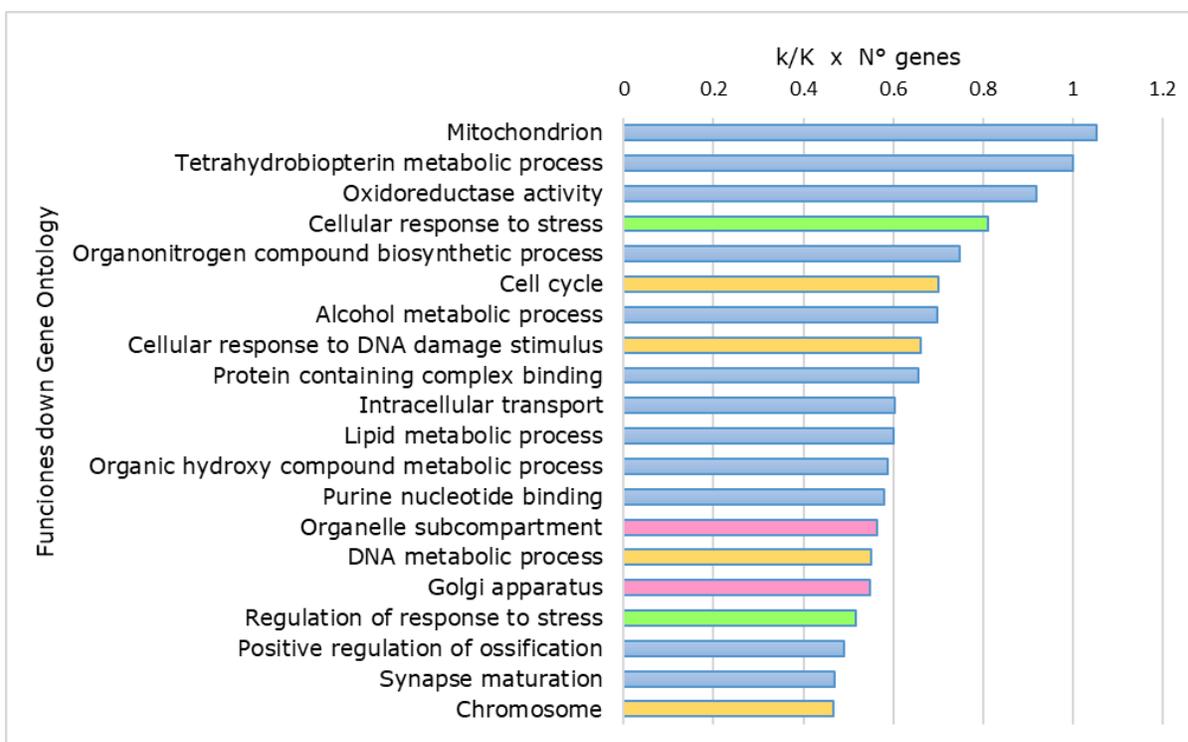


**Figura 4. Distribución de funciones CP enriquecidas en los genes subexpresados en OJP.** Se ingresaron los 274 genes regulados negativamente para su análisis de enriquecimiento en GSEA para 100 sets con FDR < 0.05. Se muestran las 17 vías canónicas mejor posicionadas según el parámetro k/K x N° genes. Cell Cycle<sup>a</sup> proviene de la base de datos *Reactome* y Cell Cycle<sup>b</sup> proviene de *KEGG*. Las funciones de un mismo color reflejan actividades biológicas relacionadas.

#### 8.4.4. Análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO) en genes subexpresados en OJP

En la **Figura 5** se observa el análisis de enriquecimiento de GO en genes subexpresados en el OJP. En el primer lugar se encontró *Mitochondrion* conformado por 42 genes, entre los que destacan *ACAA2* (Acetyl-CoA Acyltransferase 2) que cataliza el último

paso en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, *COQ6* (Coenzyme Q6, Monooxygenase) y *COQ9* (Coenzyme Q9), que participan en la biosíntesis de ubiquinol [49]. Le seguía *Tetrahydrobiopterin metabolic process* que cuenta con 3 genes, *PTS* (6-Pyruvoyltetrahydropterin Synthase), involucrado en la biosíntesis de tetrahydrobiopterina (BH4), *QDPR* (Quinoid Dihydropteridine Reductase), una enzima dihidropteridina reductasa y *SPR*, (Sepiapterin Reductase), importante en la biosíntesis de BH4 [49]. Por otra parte, el término con mayor número de genes, después de *Mitochondrion*, fue *Cellular response to stress*, con 40 genes en total, en donde los más representativos son *ALKBH7* (AlkB Homolog 7), implicado en la respuesta celular al estímulo de daño del ADN y *DDB1* (Damage Specific DNA Binding Protein 1), que eparación del ADN y la ubiquitinación de proteínas [49]. El mejor clasificado según k/K, después de *Tetrahydrobiopterin metabolic process*, fue *Synapse maturation*, que se compone de 4 genes, estos son, *NFATC4* (Nuclear Factor Of Activated T Cells 4), que participa en la expresión inducible de interleucina-2 e interleucina-4, *SEZ6L2* (Seizure Related 6 Homolog Like 2), que contribuye a funciones especializadas del retículo endoplásmico en las neuronas, *SYBU* (Syntabulin), implicado en el transporte axonal anterógrado y *ADGRL1* (Adhesion G Protein-Coupled Receptor L1), un componente del receptor acoplado a proteína G (GPCR) de latrofilina.

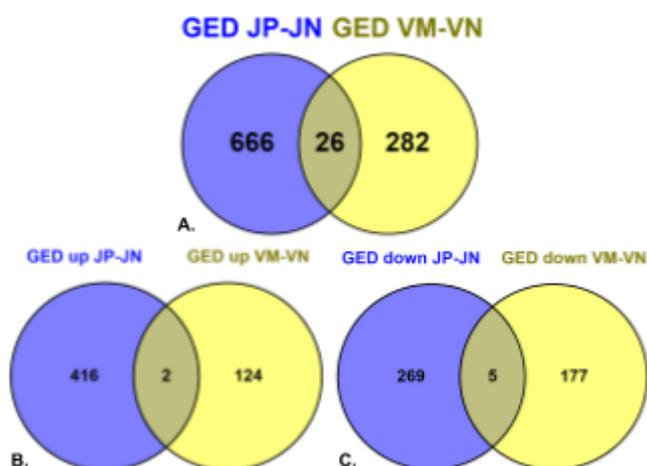


**Figura 5. Distribución de funciones GO enriquecidas en los genes subexpresados en OJP.** Se ingresaron los 274 genes regulados negativamente para su análisis de enriquecimiento en GSEA para 100 sets con FDR < 0.05. Se muestran los 20 términos de ontología génica mejor posicionados según el parámetro  $k/K \times N^\circ$  genes. Las funciones de un mismo color reflejan actividades biológicas relacionadas.

### 8.5. Comparación entre los GED de ovarios a edad fértil (OJP-OJN) con los GED de ovarios a edad post-reproductiva (OVM-OVN)

Con el propósito de identificar el efecto de la preñez a largo plazo sobre la transcripción ovárica murina, los 692 GEDs entre OJP y OJN se compararon con los GEDs entre OVM y OVN. La lista original de 177 GED de OVM-OVN se obtuvo mediante un test *limma* con p ajustado FDR < 0.1 y FC > 0.8, < -0.8 en el trabajo por Urzúa et al. [39]. Dicho criterio de expresión diferencial se flexibilizó utilizando un valor de p crudo < 0.01 y FC > 0.5, < -0.5. Con ello, la lista de GEDs se expandió hasta un total de 308 genes únicos, que se descompuso en 126 genes regulados positivamente y 182 genes regulados negativamente en OVM.

La **Figura 6A** muestra un diagrama de Venn entre la lista de 692 GEDs detectados entre ovarios jóvenes frente a los 308 GEDs entre ovarios viejos sin considerar su sentido (sobre- o sub-regulados). En las **Figuras 6B** y **6C** se muestra una comparación similar, pero con ambas listas separadas entre genes up y down regulados, respectivamente.



**Figura 6. Comparación de GED entre ovarios a edad fértil con GED entre ovarios envejecidos.**

En (A) se muestran los dos conjuntos de GEDs (692 entre ovarios a edad fértil y 308 entre ovarios envejecidos) sin considerar su estado de sobre- o desregulación. En (B) se comparan los genes regulados positivamente en ambas edades (416 en OJP y 126 en OVM) y en (C) los genes regulados negativamente en ambas edades (274 en OJP y 182 en OVM).

En la **Tabla 5** se muestra el detalle de los 26 genes coincidentes entre GED de ovarios jóvenes y GED de ovarios viejos, considerando el factor preñez como diferencia en cada edad. Dentro de las coincidencias, siete genes conservaron el sentido de la expresión. *Tgif1* (TGFB-induced factor homeobox 1) y *E330034G19Rik* (RIKEN cDNA E330034G19 gene) se encontraron regulados positivamente en ambas condiciones, mientras que *Kctd14* (potassium channel tetramerization domain containing 14), *Mmd2* (monocyte to macrophage differentiation-associated 2), *Acaa2* (acetyl-CoA acyltransferase 2), *Mapt* (microtubule-associated protein tau) y *Gucy1a3* (guanylate cyclase 1, soluble, alpha 1) se encontraron regulados negativamente.

**Tabla 5. Coincidencias entre GED de ovarios jóvenes y GED de ovarios viejos en relación a paridad**

Gen	Descripción	Sentido de la expresión
<i>Kctd14</i> , potassium channel tetramerization domain containing 14	Altamente expresado en ovario. Podría participar en el desarrollo folicular [68].	▼
<i>Adamts4</i> , ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 4	Participa en la ovulación. Se expresa en las células de la granulosa y del cúmulo [86].	↔
<i>Mmd2</i> , monocyte to macrophage differentiation-associated 2	Mejora la retención y activación de la cascada de señalización de Ras [76].	▼
<i>Cdkn1a</i> , cyclin dependent kinase inhibitor 1A	Se expresa predominantemente en CG y participa en la detención del ciclo celular y la diferenciación terminal hacia células lúteas en la fase periovulatoria en primates y ratas [87]	↔
<i>Ecm1</i> , extracellular matrix protein 1	Estimula la angiogénesis [88]. Promueve la polarización M1 de macrófagos [89]. Altamente expresado en glándula suprarrenal.	↔
<i>Slc1a1</i> , solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1	Reabsorción de L-glutamato y L-aspartato en los túbulos renales [90]. Ampliamente expresado en almohadilla de grasa genital y riñones de ratón.	↔
<i>Osgin1</i> , oxidative stress induced growth inhibitor 1	Desempeña un papel en la apoptosis junto a p53 [91]. Alta expresión en hígado, testículo y glándula suprarrenal.	↔
<i>Acaa2</i> , acetyl-CoA acyltransferase 2	Oxidación de ácidos grasos. Aumenta su expresión en las células del cúmulo en respuesta a LH durante la maduración del ovocito [92].	▼
<i>Mapt</i> , microtubule-associated protein tau	Participa en el crecimiento de neuritas de las neuronas en desarrollo y en el transporte axonal de orgánulos y vesículas [93, 94]. Altamente expresado en el SNC.	▼
<i>Gucy1a3</i> , guanylate cyclase 1, soluble, alpha 1	Forma parte de la guanilato ciclasa soluble (sCG), único receptor del óxido nítrico, desempeña un papel en la relajación de las células del músculo liso vascular y la inhibición de la agregación plaquetaria [95, 96]. Amplia expresión en pulmón y SNC.	▼
<i>Cmtm3</i> , CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3	Actúa como gen supresor de tumores mediante la inducción de apoptosis y detención del ciclo celular en células de cáncer testicular humano [97]. Amplia expresión en ovario de ratón.	↔
<i>Zc4h2</i> , zinc finger, C4H2 domain containing	Participa en la regulación de la proliferación y diferenciación de células madre neurales [98]. Amplia expresión en el cerebro y el SNC.	↔
<i>Acad8</i> , acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 8	Enzima mitocondrial que cataliza el tercer paso de la degradación del aminoácido de cadena ramificada valina [99]	↔
<i>Gatb</i> , glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	Implicado en la biosíntesis de glutaminil-tRNAGln mediante transamidación y traducción mitocondrial [100]. Expresión ubicua en riñón y corazón.	↔

<i>Abcg4</i> , ATP binding cassette subfamily G member 4	Transportador de la familia ABC. Podría participar en el transporte de colesterol. Amplia expresión en glándula suprarrenal [49].	↯
<i>Gdf10</i> , growth differentiation factor 10	Codifica un ligando secretado de la superfamilia de proteínas TGF-beta. Participa en la formación y remodelación ósea, así como en la diferenciación de adipocitos. Ampliamente expresado en útero, tejido adiposo y hueso.	↯
<i>Cdkn2c</i> , cyclin dependent kinase inhibitor 2C	Como inhibidor de la CDK4 y CDK6 [101], podría participar en el control de la proliferación de las células de la granulosa en el desarrollo folicular [87]. Amplia expresión en testículo de ratón.	↯
<i>Tgif1</i> , TGFB-induced factor homeobox 1	Suprime la expresión de genes que codifican enzimas esteroideogénicas en las CG de cabra [102]. Amplia expresión en ovario de ratón.	▲
<i>Cldn1</i> , claudin 1	Funciona como una barrera física en el OSE murino [103] y humano [104]	↯
<i>Fxyd6</i> , FXVD domain-containing ion transport regulator 6	Regula el tráfico de Na,K-ATPasa. Podría participar en la excitabilidad neuronal del SNC [105].	↯
<i>Actr3b</i> , ARP3 actin-related protein 3B	Forma parte del complejo ARP2/ARP3 que regula el citoesqueleto de actina y participa en el cambio de forma celular. Por su alta expresión en el SNC, se cree que participa en el desarrollo y/o mantenimiento de las células nerviosas [106].	↯
<i>Rftn2</i> , raftlin family member 2	Desempeña un papel fundamental en la formación y/o mantenimiento de balsas lipídicas, regulando así la señalización mediada por BCR de las Células B. Altamente expresado en cerebro y bazo [107]	↯
<i>Cxxc4</i> , CXXC finger 4	Unión al ADN y transducción de señales. Inhibidor de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Se expresa en células de la granulosa de ratón [108]	↯
<i>Cdk5rap2</i> , CDK5 regulatory subunit associated protein 2	Componente funcional de los centros organizadores de microtúbulos acentriolares (aMTOC) en ovocitos de ratón y desempeña un papel en la regulación del enfoque de los polos del huso meiótico [109]	↯
<i>Ptn</i> , pleiotrophin	Se expresa en las CG y podría participar en la maduración de los folículos ováricos de ratón [110].	↯
<i>E330034G19Rik</i> , RIKEN cDNA E330034G19 gene	Se expresa en ovocitos MII y puede desempeñar un papel en la segregación de cromosomas durante la meiosis o la escisión en la embriogénesis temprana [111].	▲

El símbolo (▲) significa que en ambos casos el gen está regulado positivamente, (▼) significa que en ambos casos el gen está regulado negativamente y (↯) significa que no hay coincidencia en el sentido de la expresión. (\*) Se realizó búsqueda en PubMed y en GeneCards priorizando funciones relacionadas a la biología del ovario.

## 9. Discusión

El embarazo ha sido descrito como un factor protector ante el CO [8]. Dado que la mayor incidencia y mortalidad por esta enfermedad ocurre durante la edad postmenopáusica, es razonable pensar que los cambios en la fisiología ovárica producidos por el embarazo, pudieran persistir en el largo plazo y, de alguna forma, dar cuenta de dicho

efecto protector. Por lo tanto, el objetivo general de esta Tesis fue identificar el efecto de la preñez sobre la expresión génica del ovario de ratón hembra C57BL6 a corto plazo (postparto) y compararlo con aquel observado en ovarios envejecidos [39].

### 9.1. Genes regulados positivamente en el OJP

Se detectaron 418 genes sobre-expresados en el ovario primiparo (OJP) en comparación al ovario nulíparo (OJN), utilizado como muestra de referencia. Los 20 genes de mayor sobreexpresión se muestran en la **Tabla 1**. La relaxina (*Rln1*) es una hormona peptídica estructuralmente relacionada con la insulina que ejerce una variedad de efectos en tejidos reproductivos y no reproductivos [112]. Es producida por el cuerpo lúteo (CL) en la fase lútea del ciclo estral y durante la gestación en mamíferos [113]. La expresión ovárica de relaxina en ratas preñadas es comparable con el aumento en los niveles circulantes de relaxina en ratones y ratas días previos al parto, y su disminución en días posteriores [114, 115], por lo que la relaxina de origen luteal sería la principal responsable de estos cambios. Durante la gestación, la relaxina aumenta gradualmente su concentración sérica y paralelamente se acumula en gránulos de almacenamiento dentro de células lúteas que son liberados 2 a 3 días antes del parto en ratones, alcanzando su concentración máxima [115, 116]. La relaxina tiene efectos en varios órganos, pero no se han demostrado efectos autocrinos en el ovario de ratón. Esto es consistente con nuestros datos, que indicaron que el nivel de expresión del receptor de relaxina *Rxfp1* era indetectable tanto en ratones hembra nulíparas como primíparas (dato no mostrado). Un estudio en ratones hembra preñados *knockout* para *Rln1* (KO *Rln* *-/-*) [45] demostró que hacia el término de la gestación, la relaxina podría facilitar el parto promoviendo el crecimiento y remodelación del cuello uterino, la vagina y la sínfisis púbica. Las crías de este KO *Rln* *-/-* murieron al segundo día de nacidas, lo cual confirmó además el papel de la relaxina en la diferenciación de la glándula mamaria y el desarrollo del pezón, cambios esenciales para una lactancia exitosa. Los

fenotipos descritos sugieren que la relaxina participa en la remodelación del tejido conectivo promoviendo la degradación y la reorganización del colágeno. De hecho, se ha descrito que la relaxina tiene efectos antifibróticos estimulando la expresión de metalopeptidasas de la matriz (MMP) e inhibiendo la expresión de inhibidores tisulares de metalopeptidasas de matriz (TIMP) en varios tejidos [117]. Por otra parte, las MMP son importantes en el crecimiento del tejido normal y patológico [118].

El tercer gen de máxima sobreexpresión en el ovario postparto fue *Serpina6*, que codifica para una proteína de secreción estructuralmente homóloga a un inhibidor del tipo serpin peptidasas, pero que transporta esteroides en el suero. También denominada CBG (globulina de unión a corticosteroides), su nivel circulante aumenta durante el embarazo cumpliendo con el rol de transportar P4 y cortisol, así como de transferir ambos esteroides desde la circulación materna a la fetal [119]. La expresión de *Serpina6* (CBG) ha sido detectada en el cuerpo lúteo humano [120] y de ratón [40].

La ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa *Enpp2*, alias autotaxina (ATX), es una lisofosfolipasa D (lisoPLD) de secreción que hidroliza los lisofosfolípidos extracelulares convirtiéndolos en ácido lisofosfatídico (LPA), un ligando de receptores acoplados a proteínas G específicas (LPA<sub>1-6</sub>) [121]. En el ovario de rata en ciclo no fértil ATX se localiza en células esteroidogénicas del CL temprano y aumenta progresivamente en el CL tardío hasta completar la luteólisis estructural, mientras que los receptores de LPA (LPA<sub>1-4</sub>) se expresan tanto en células esteroidogénicas como en macrófagos y fagocitos de sitios inflamatorios del CL regresivo [56]. El sistema ATX/LPA participaría en la luteólisis estructural modulando la infiltración de neutrófilos y macrófagos y la proliferación de fibroblastos [56] posiblemente a través de la señalización de LPA, cuyos efectos mitogénicos en fibroblastos son conocidos [122]. No está claro si las acciones de ATX descritas en la regresión estructural del CL de ratas no preñadas puedan ser comparables con la regresión del CL que desencadena el parto en ratas o ratones preñados. Por otro lado, si bien se han descrito

niveles bajos de expresión de ATX/*Enpp2* ovárica dependientes de  $G\alpha_q/11$  durante la gestación y post-parto en ratones [40], es importante mencionar que esta disminución ocurre entre los días 18 de gestación y 1-2 días del parto. A pesar de lo anterior, en nuestros datos la expresión de *Enpp2* en el OJP postparto es significativamente mayor que su contraparte nulípara, OJN.

*Mmp10* codifica una metalopeptidasa de matriz altamente expresada en el día 18 de gestación y el día 1 post-parto en el ovario de ratón [123]. También se expresa en cultivos de células de la granulosa luteinizadas de rata, lo que sugiere su participación en la luteinización [47]. Se sabe que las metalopeptidasas participan en la regresión del CL mediada por la PGF2-alfa [124] y se ha demostrado que la *Mmp10* junto a otras metalopeptidasas degradan la matriz extracelular perivascular y las uniones estrechas de células endoteliales, provocando su desprendimiento [125]. La expresión de *Mmp10* puede ser promovida por estímulos inflamatorios [126], lo cual es consistente con el proceso de angioregresión del cuerpo lúteo mediado en parte por factores proinflamatorios que afectan la integridad vascular [32]. Estos datos sugieren la participación de *Mmp10* en la regresión de la vasculatura lútea que ocurre al final de la gestación.

La ecto-5'-nucleotidasa (*Nt5e*) o grupo de diferenciación 73 (CD73) codifica una glicoproteína de superficie anclada a glicosilfosfatidilinositol que hidroliza el adenosín 5'-monofosfato (AMP) extracelular en adenosina [127]. Su función requiere de la actividad ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasa (CD39), que a partir de ATP genera el sustrato AMP para CD73. Ambas enzimas cumplen funciones reguladoras de la señalización purinérgica en células inmunes, modulando la respuesta inflamatoria [51]. Mientras que el ATP extracelular promueve la inflamación, la adenosina tiene un rol anti-inflamatorio [128]. CD73 se expresa en varios tejidos, incluyendo células hematopoyéticas y endoteliales [127] así como en ovario humano [129]. A la fecha, no se ha reportado expresión ovárica durante la gestación en ratón. La expresión elevada de CD73 en el ovario postparto descrita en esta

Tesis podría constituir un mecanismo antiinflamatorio que compensaría el proceso degradativo y de remodelación tisular que acompaña la luteólisis estructural. No obstante, se ha descrito que la expresión de CD73 es promovida por factores proinflamatorios, principalmente TGF- $\beta$  y otros como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  [130]. En el sistema inmune del ratón se ha observado que las células Treg CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> tienen una alta expresión de CD73 y que la adenosina extracelular generada por estas células se une al receptor de adenosina (A2a) en células T efectoras activadas suprimiendo su proliferación. Esto se suma a la función previamente descrita de las células Treg en la inducción de la tolerancia inmunológica [131]. Se sabe que durante la luteólisis aumenta el número de células inmunes, incluyendo tanto células T reguladoras como células T efectoras [132]. Considerando que durante este proceso aumentan los mediadores proinflamatorios, es razonable especular que estos mediadores podrían inducir la expresión de CD73 en las células T reguladoras, lo que podría ser un mecanismo para controlar la exacerbación de la respuesta inflamatoria, al limitar la proliferación de las células T efectoras mediada por la adenosina generada.

## 9.2. Genes regulados negativamente en OJP

Se detectaron 274 genes reprimidos en el ovario primiparo postparto en relación al ovario nulíparo que se utilizó como muestra de referencia. Los 20 genes de mayor subexpresión se muestran en la **Tabla 2**. La enzima lecitina retinol aciltransferasa, codificada por el gen *Lrat*, cataliza la esterificación de retinol (vitamina A) con lecitina para formar retinil-ésteres [67], una forma de almacenar retinol [133]. La represión de *Lrat* en el ovario postparto, indicaría una menor actividad de esterificación y con ello una mayor disponibilidad de retinol. De hecho, la regresión lútea en ratas pseudopreñadas se ha asociado con un marcado aumento en los niveles ováricos de vitaminas E y A [134].

En el ovario post parto, también se detectó una expresión reducida de *ApoE*. Este gen codifica para la apolipoproteína ApoE, presente en algunas lipoproteínas plasmáticas que

transportan colesterol, cuya regulación ha sido ampliamente estudiada en el hígado [135]. Las lipoproteínas HDL y LDL son la principal fuente de colesterol para órganos esteroideogénicos [136]. ApoE se expresa en las células de la teca, intersticiales, y en alto nivel en las células del cuerpo lúteo del ovario murino y se ha vinculado al desarrollo folicular y la esteroideogénesis ovárica [137, 69]. Dado que ApoE es reconocida por el receptor de LDL, que también se expresa en los mismos tipos celulares mencionados incluyendo el cuerpo lúteo murino [138, 139], este par receptor-ligando podría dar cuenta de un mecanismo endógeno de transferencia de colesterol para la síntesis de P4 por el cuerpo lúteo, que al momento del postparto, tras el proceso de luteólisis estructural y subsecuente fibrosis [32], pierde funcionalidad.

Otro gen reprimido en el ovario postparto fue *Lum*, que codifica para lumican, un proteoglicano perteneciente a la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP). Lumican se une al colágeno en la matriz extracelular y desempeña un papel en la regulación de su ensamblaje en varios tejidos conectivos [140]. En el ovario humano, lumican se expresa en las células de la granulosa murales de los folículos secundarios y aumenta su expresión a medida que el folículo madura, siendo más prominente en los folículos preovulatorios y postovulatorios. De igual forma, su expresión en células de la granulosa del cúmulo se correlaciona con la maduración de los ovocitos [71]. Estudios recientes en cultivo de células de la granulosa murales humanas han demostrado que *Lum* es inducido por LH/hCG y que su expresión depende del tamaño folicular, hallazgos que sugieren su participación en la foliculogénesis y en la ovulación [71]. De acuerdo a lo anterior, la expresión de lumican aumentaría en la fase del estro (desarrollo folicular máximo y ovulación). La represión de lumican en el ovario post-parto sugiere que no ha ocurrido una transición al estro, lo que es compatible con el hecho de que en ratones que amamantan el estímulo de succión puede suprimir la secreción de gonadotropinas y con ello inhibir el desarrollo folicular en la lactancia temprana [141].

El gen *Eef2* codifica para el factor de elongación eucarionte 2, que es esencial para la síntesis de proteínas. Es requerido para la fase de elongación de la traducción, induciendo la translocación del ARNt desde el sitio A al sitio P del ribosoma, lo que requiere de hidrólisis de GTP [142]. En el ovario se ha descrito que *Eef2* participa en la regulación de la síntesis de estradiol, mediante la unión de *Eef2* al ARNm de *Nr5a1*, lo que estimula la expresión de la estrógeno sintasa [73]. La represión de *Eef2* en el ovario post parto, podría asociarse a una menor síntesis de estradiol, lo cual es consistente con la disminución abrupta del nivel sérico de esta hormona que se observa inmediatamente después del parto [143].

Finalmente, otro gen reprimido en el ovario postparto fue *Fabp3*, que codifica para la proteína de unión a ácidos grasos 3. *Fabp3* participa en la absorción, transporte y catabolismo de ácidos grasos vía  $\beta$ -oxidación mitocondrial [84]. En el ovario bovino se expresa en las células del cúmulo y es transportada a través de las proyecciones transzonales hacia el ovocito, aportando lípidos necesarios para su maduración [85]. Se podría sugerir que la maduración ovocitaria se encuentra detenida en el ovario post parto.

### 9.3. Análisis de trabajos relacionados

Una buena parte de la información sobre la expresión génica ovárica asociada a la preñez en el ratón, gira en torno a la funcionalidad y expresión génica del cuerpo lúteo, cuya principal rol es la producción de P4 durante el periodo completo de la gestación en el ratón. En roedores, el cuerpo lúteo se forma a partir de CG y células de la teca interna, posterior a la degradación de la lámina basal [113].

Los resultados de la **Tabla 3** indican que varios GEDs de la presente Tesis coincidieron en cuanto a su sobre-expresión respecto al trabajo de Waite et al [40], donde se estudió el impacto transcripcional de la pérdida de función de *Gna11* (proteína de unión de nucleótidos de guanina, subunidad  $\alpha$ -11) en la luteólisis y el parto en ratón. Estos genes eran *Akr1c18*, *Tnc*, *Cdkn2b*, *Onecut2*, *Rgl1*, *Bhlhe40*, *Sbsn* y *Chrna1*. El gen *Akr1c18* codifica para una

enzima con actividad 3-, 17- y -20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa que, entre varios sustratos, reduce la P4 a 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona disminuyendo así su actividad biológica. *Ch25h* codifica para enzima colesterol 25-hidroxilasa, cuyo producto 25-hidroxicolesterol indirectamente inhibe la síntesis *de novo* de colesterol [144]. La sobreexpresión de estos dos genes en el ovario postparto implica la pérdida de la función esteroidogénica del cuerpo lúteo. Otro gen cuyo sentido de expresión coincidía con los datos de esta Tesis fue *Tnc* (tenascina-C), una proteína de la matriz extracelular altamente expresada en el ovario de ratón, que junto al colágeno tipo-I se han descrito en la formación y regresión del cuerpo lúteo en el ovario de rata [145]. Los genes coincidentes descritos previamente, todos sobre-expresados (**Tabla 3**), serían genes que dentro de la cronología gestación-luteólisis-postparto no se reprimen por efecto del parto, es decir, se mantienen sobre-expresados probablemente en un mediano o largo plazo.

Al contrario, *Serpina6*, *Enpp2*, *Grp* y *Kng1*, que se encontraron dentro de los top-20 sobre-expresados en el ovario postparto (**Tabla 1**) estaban reprimidos en el estudio mencionado [40]. Esto se explica por el uso de diferentes muestras de referencia o control: mientras en el trabajo de Waite et al [40] se comparan ovarios WT(Cre-) de días 1-2 post-parto frente al día 18 de gestación, los datos de esta Tesis comparan ovarios de día 1 post-parto frente a ovarios nulíparos en fase de diestro. Una evidencia que apoya esta explicación, es lo que ocurre con la expresión ovárica de *Rln1*, relaxina. En la gestación del ratón, la relaxina luteal puede aumentar su expresión génica 2-3 días antes del parto y disminuir precipitadamente luego de este [114]. Mientras que *Rln1* fue el gen de máxima expresión en los datos de esta Tesis (**Tabla 1**), aparece reprimido -de igual forma que *Serpina6*, *Enpp2*, *Grp*, *Kng1*- en los datos de Waite et al [40]. En resumen, varios de los genes que en esta Tesis detectamos como sobre-expresados en el ovario postparto respecto al ovario nulíparo, en realidad aparecen reprimidos cuando se los compara en el postparto en relación al inicio de la luteólisis, los días 18-19 de la gestación. En otras palabras, la

diferencia biológica en términos de expresión génica entre un ovario postparto y un ovario nulíparo es mucho mayor que entre un ovario postparto y un ovario pre-luteolisis. Algo similar sucede con el estudio de Foyouzi et al [41] y Miyado et al [42] que reporta diferencias entre el transcriptoma ovárico de ratones hembra el día 15 y 17.5 de gestación frente al día 19 y 18.5 de preparto/luteólisis, respectivamente. En el caso de Mejía et al [43] ambos genes comparables coinciden en su expresión (**Tabla 3, referencia 4b**), producto del uso de muestras de referencia similares a los utilizados en esta Tesis.

#### **9.4. Análisis de marcadores de tipo celular**

El propósito de este análisis fue determinar si producto de la gestación y el parto, se inducen cambios en las proporciones de los diferentes tipos y subtipos celulares ováricos caracterizados previamente en el trabajo de Morris et al [44]. En la **Tabla 4** se muestran los resultados sobre genes marcadores expresados diferencialmente entre el ovario postparto y la condición de referencia, el ovario nulíparo de la misma edad. De los 41 genes marcadores detectados, 29 estaban aumentados y 12 disminuidos en el ovario postparto.

##### **9.4.1 Marcadores de expresión aumentada**

Entre estos cabe destacar a *Slc18a2* y *Fam13a*, dos genes marcadores generales de CG (**Tabla 4A**). *Slc18a2* (Solute Carrier Family 18 Member A2) codifica para un transportador *antiporter* transmembrana de monoaminas/H<sup>+</sup> dependiente de ATP, que se expresa en CG de rata como parte de un posible mecanismo de almacenamiento ovárico de norepinefrina [146]. Por su parte, *Fam13a* (Family With Sequence Similarity 13 Member A) no ha sido estudiado en ovario, pero en el tejido adiposo promueve una mejora de la sensibilidad a insulina previniendo la degradación proteosomal de IRS [147], mientras que en el hígado estimula el almacenaje de lípidos y reduce la actividad respiratoria mitocondrial [148]. Varios otros marcadores de subtipos de CG también se encontraron aumentados (**Tabla 4C**). Estos

son *Mro* y *Nap115* de CG antrales-murales; *Ghr*, *Cald1*, *Asb4* y *Cdc42ep3* de CG atrésicas; *Col3a1*, *Igfbp7* y *Sfrp4* del CL activo y *Tnc* y *Sfrp4* del CL en regresión.

Entre los 3 marcadores generales de células mesenquimales con expresión diferencial, sólo *Col3a1* se encontró aumentado. *Col3a1* (Collagen Type III Alpha 1 Chain) corresponde a un colágeno fibrilar extensible cuya expresión aumenta en el estroma ovárico fetal en ausencia de señalización por TGF $\beta$  [149]. De acuerdo a Morris et al [44] este gen sería un marcador dual (mesenquimal y CL activo). El aumento de *Col3a1* probablemente se relaciona con el aumento de *Enpp2*, *Fzd1*, *Plat* y *Tnc*, que son marcadores de células tipo-fibroblasto, uno de los sub-tipos mesenquimales.

Otro marcador aumentado fue el gen *Cd93* (*CD93 antigen*), marcador de células endoteliales que codifica para una glicoproteína de membrana que tiene actividad pro angiogénica. Junto a distroglicano, una laminina involucrada en la angiogénesis, participan en la migración y organización de células endoteliales para la formación de capilares [150]. Esto es compatible con la profusa vascularización que sufre el CL en el embarazo.

El gen *H2-Aa* (*histocompatibility 2, class II antigen A, alpha*) corresponde a un marcador sobre-expresado en células inmunes. Este gen codifica la cadena alfa del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (MHC II), una proteína heterodimérica presente en células presentadoras de antígenos (CPA) como los linfocitos B, células dendríticas y macrófagos [151]. Se une a péptidos derivados de antígenos que fueron procesados previamente por las CPA y los presenta a las células T CD4. Se ha observado una expresión disminuida de MHC II en células lúteas bovinas en el embarazo que luego aumenta al comenzar la regresión lútea [152], probablemente en respuesta a un aumento de IFN-gamma, una citoquina proinflamatoria que participa en luteólisis [153] y que además induce la expresión de moléculas del MHC II [154]. Se ha sugerido que un aumento en la expresión de MHC II facilita la desaparición del CL mediado por mecanismos de respuesta autoinmune locales [155].

*Oosp1* y *Rfpl4* son marcadores de ovocitos sobre-expresados en el OJP. *Oosp1* (*oocyte secreted protein 1*) codifica una proteína no muy estudiada que se piensa que está implicada en la formación de componentes de la zona pelúcida [156]. *Rfpl4* (*Ret Finger Protein Like 4A*) codifica una proteína ligasa de ubiquitina E3 que regula la degradación de proteínas y la progresión del ciclo meiótico en ovocitos de ratón [157]. Ambos genes son regulados positivamente por *Nobox*, un regulador transcripcional de homeodominio que se expresa exclusivamente en ovocitos. *Nobox* está implicado en la foliculogénesis temprana y es considerado un marcador de reserva ovárica [158, 159]. El fenotipo ovárico de ratones *Nobox* KO (-/-) es similar a la insuficiencia ovárica prematura en mujeres (IOP) [160], caracterizada por el agotamiento de los folículos y la pérdida de la función ovárica antes de los 40 años [159]. Estos antecedentes sugieren que *Oosp1* y *Rfpl4* podrían ser genes candidatos en la mantención de la reserva ovárica.

Los marcadores del OSE, *Upk1b* y *Gpm6a* también se encontraron regulados positivamente. *Upk1b* (*uroplakin 1B*) codifica para una proteína de la familia de las tetraspaninas. No ha sido estudiado en el ovario, pero en la superficie apical del urotelio forma parte de la placa urotelial, estructura que contribuye a la función de barrera de permeabilidad urotelial [161]. La ablación de *Upk1b* en el urotelio resultó en una morfología displásica con anisocariosis [162]. *Gpm6a* (*glycoprotein m6a*) codifica para una glicoproteína de membrana tetraspanina abundante en la superficie de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) [163] que participa en procesos como la formación de filopodios, la extensión de neuritas y la sinaptogénesis [164]. Por otro lado, se ha descrito la presencia de filopodios, microvellosidades y otros tipos de proyecciones citoplasmáticas en todo el OSE de ovarios anovulatorios [165]. Esto podría suponer que la presencia de células con estas especializaciones en el OSE de OJP -caracterizado por no ovular- sería mayor respecto a su contraparte OJN y podría estar influenciado por una mayor expresión de *Gpm6a*.

#### 9.4.2. Marcadores de expresión disminuida

Dos de los 3 marcadores mesenquimales generales que se expresaban diferencialmente, se encontraron disminuidos en el OJP. Éstos corresponden a *Tcf21* y *Lum*. *Tcf21* (transcription factor 21) está implicado en procesos de diferenciación celular que promueven fibrosis [166]. Por otra parte, *Lum* (lumican) es un proteoglicano que se une al colágeno en la matriz extracelular y regula su ensamblaje en el tejido conectivo. Aunque se ha descrito que *Lum* se expresa en CG de folículos en maduración [71], este gen también se expresa en fibroblastos que promueven acumulación de colágeno fibrilar [167].

Se detectó expresión reducida de *Htra3* e *Itih5*, marcadores de células esteroideogénicas estromales, un subtipo mesenquimal, que también expresa *Tcf21*. *Htra3* (*HtrA Serine Peptidase 3*) codifica para una serina proteasa de elevada expresión en el ovario durante el ciclo estral, en el útero preñado después de la implantación y en la placenta durante su formación [168]. Se desconocen sus niveles de expresión en el ovario durante el embarazo, pero en un ciclo no fértil aumenta su expresión en las células de la granulosa a medida que madura el folículo, alcanzando sus niveles más altos en los folículos de la etapa tardía y en las células luteinizantes del CL, por lo que se cree que participa en la foliculogénesis y en la luteinización [169].

*Birc5* y *Hmgb2*, que corresponden a marcadores de subtipo CG mitóticas - y *Birc5* específicamente de antrales mitóticas- también estaban regulados negativamente en el OJP. *Birc5* (*baculoviral IAP Repeat Containing 5*) pertenece a la familia de genes inhibidores de la apoptosis. Codifica para una proteína que tiene dos funciones básicas: la progresión del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis [170]. En cuanto a *Hmgb2* (*High Mobility Group Box 2*), codifica para una proteína no histona que interactúa con la cromatina de los cromosomas mitóticos, posiblemente estabilizando su forma altamente condensada junto a H1 [171]. En el

embarazo el desarrollo folicular se encuentra en un estado quiescente, por lo cual los genes relacionados con la mitosis en CG disminuyen su expresión (ver sección 9.6.1).

## 9.5. Funciones enriquecidas en los genes regulados positivamente en el OJP

Los 418 genes sobreexpresados en el ovario primiparo postparto fueron sometidos a un análisis de vías canónicas (CP) y de ontología génica (GO) que se muestran en las **Figuras 2 y 3**, respectivamente.

### 9.5.1 Hemostasis (CP)

Esta vía fue la más enriquecida. Contenía 32 de los 418 genes sobreexpresados en el ovario joven primiparo. Dos otras vías relacionadas se encontraron enriquecidas en el análisis GSEA: *platelet activation signaling and aggregation* (17 genes) y *response to elevated platelet cytosolic Ca<sup>2</sup>* (12 genes). La primera contenía a la segunda en su totalidad respecto a la identidad de cada gen. De acuerdo a *Reactome*, la hemostasis se define como *una respuesta fisiológica que culmina en el arresto del sangramiento de un vaso sanguíneo dañado*. Normalmente el endotelio vascular se encuentra en un estado de equilibrio que promueve la vasodilatación y suprime la coagulación evitando así la agregación plaquetaria [172]. Se ha descrito que en el embarazo humano ocurre un aumento de los factores VII, X, VIII, del fibrinógeno y del factor de Von Willebrand en la circulación materna, lo que disminuye las complicaciones hemorrágicas asociadas al parto, pero que a su vez aumenta entre 4-10 veces el riesgo de trombosis durante la gestación y el post-parto [173]. El estado de hipercoagulación asociado al embarazo vuelve a la normalidad progresivamente después del parto [174].

La expresión de genes asociados a hemostasia en el ovario postparto sugiere una relación con el fenómeno de angioregresión que se produce durante la luteolisis [32]. Dentro los genes más relevantes fueron detectados *SERPINB2*, alias *PAI-2* (inhibidor-2 del activador

de plasminógeno), que aumenta en suero durante el embarazo, y es el principal responsable de los cambios hemostáticos ocurridos durante este período [173]. *PAI-2* regula negativamente la fibrinólisis inhibiendo la conversión de plasminógeno en plasmina, una enzima proteolítica que degrada la fibrina presente en los coágulos [46]. *SERPINB6* codifica para un inhibidor de un amplio espectro de serina proteasas, incluyendo la trombina [175], una proteasa que cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina [176]. *THBD* codifica para trombomodulina, un receptor de membrana presente en las células endoteliales que al unir trombina regula negativamente la hemostasis, promoviendo la activación de la proteína C que degrada los factores de coagulación impidiendo la generación de trombina [177]. Durante la gestación también aumentan los niveles plaquetarios para su acción ante el desafío hemostático del parto [173, 174]. Dentro de los genes relacionados con la función plaquetaria encontramos *PF4*, que codifica para el factor plaquetario 4, un factor quimiotáctico de neutrófilos liberado de los gránulos alfa de plaquetas activadas durante la agregación plaquetaria [178] y ***SDC1***, que codifica para sindecan-1, un proteoglicano de la superficie celular endotelial que contribuye al anclaje de las fibras del factor de Von Willebrand, promoviendo la captura de plaquetas en la cascada de coagulación [179]. Estos datos también podrían sugerir la participación del ovario en la normalización del estado de hipercoagulación descrito en días posteriores al parto.

### 9.5.2. Inmunidad (CP)

Aquí se incluyeron las vías *Innate Immune System* (41 genes), *Cytokine signaling in immune system* (30 genes) y *Adaptive Immune System* (27 genes) que se muestran en la **Figura 2**. Los genes (*PSMD12*, *SKP1*, *UBE2D3*, *HLA-E*) estaban incluidos en las 3 vías. En el sistema inmunológico reproductivo, procesos como la ovulación, implantación, la regresión lútea y el parto son considerados de naturaleza inflamatoria. Los receptores

*Toll-like*, los macrófagos y las células NK son los principales actores de la inmunidad ovárica y uterina [180].

Una serie de genes asociados a la cascada de receptores *Toll-like* se encontraron sobre-expresados en el ovario postparto (*DDX3X*, *SKP1*, *UBE2D3*, *USP14*, *MAP2K1*, *RPS6KA2*, *DUSP6*, *DUSP4*, *IKBIP*, *PELI1*, *LY96* y *CTSB*). Los TLR se localizan en la membrana celular de algunas células inmunes como macrófagos y células dendríticas [181], y allí intervienen en la detección de señales de peligro relacionadas con la infección o el daño tisular. Dichas señales se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) [181]. El cuerpo lúteo en degeneración constituye una fuente de DAMPs para activar estos receptores. Los TLRs podrían estar involucrados en la luteólisis ya que se ha observado un aumento en la expresión génica de TLRs en la regresión del cuerpo lúteo bovino que se correlaciona positivamente con la expresión de citoquinas proinflamatorias luteolíticas [182].

Por otro lado, se observó un aumento -probablemente compensatorio- de genes que codifican proteínas que podrían participar en la resolución de la inflamación generada en la luteólisis. Los macrófagos tipo M2 suprimen la inflamación y promueven la reparación del tejido dañado al liberar *IL-10* y *TGF-β* [183]. Dentro de nuestros resultados, las vías de *IL-10* (*IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*) y de *TGF-β* (*TGF-BETA receptor signaling*, **Figura 2**) estaban enriquecidas. Por su parte, el antagonista del receptor de interleuquina 1 (*IL1RN*) cuya función es contrarrestar la inflamación sistémica descontrolada provocada por la *IL-1* [184], también se encontró sobreexpresado .

En la mujer post-parto ocurre una disminución en la citotoxicidad de las células NK [185]. La regulación de este proceso es compleja, pero se sabe que la unión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I) de las células diana con el receptor inhibitorio de las células NK, reprime su acción efectora [186]. Nuestros resultados coinciden con este aspecto regulatorio, ya que se ha descrito un aumento en la expresión del

gen *HLA-E*, que codifica para el MHC I, y de *CLEC2D*, un receptor de KLRB1 que protege las células diana contra la lisis mediada por células NK [187].

### 9.5.3. Matrisoma (CP)

Otra de las funciones enriquecidas fue *matrisome* (34 genes). Para este análisis, GSEA extrae la información desde la base de datos <https://matrisomedb.org/>. Se define *matrisoma* como el *conjunto de genes que codifican proteínas de la matriz extracelular y proteínas asociadas a la matriz extracelular*. El ovario es un órgano altamente dinámico, que está sometido a ciclos repetitivos de procesos de maduración e involución, lo que implica una reorganización continua de su matriz extracelular (MEC) [188]. El desarrollo folicular se encuentra detenido debido a la regulación negativa que ejerce la P4 sobre la liberación de gonadotropinas [41]. Estudios biomecánicos del ovario afirman que la rigidez de la MEC ovárica mantiene los folículos en reposo, limitando la expansión del folículo y por ende, la maduración del ovocito [189]. En nuestros resultados destacan genes que participan en la deposición de matriz fibrosa (*TIMP3*, *PCOLCE2* y *BMP6*). *TIMP3* codifica para el inhibidor tisular de metalopeptidasa 3, que forma complejos con algunas metalopeptidasas y las inactiva irreversiblemente [48]. El gen *PCOLCE2* (Procollagen C-Endopeptidase Enhancer 2) codifica para una proteína que promueve la hidrólisis del propéptido C de los procolágenos-I y -III generando monómeros maduros de triple hélice capaces de formar fibrillas [190]. *BMP6* codifica para la proteína morfogénica ósea 6 que estimula la diferenciación de células mesenquimales (estromales/troncales) a fibroblastos [191].

Respecto al CL, se ha descrito que durante la luteólisis existe una expresión coordinada de proteasas que degradan la MEC y sus inhibidores [192]. En este sentido, *MMP10* (ver sección 9.1) y *TIMP3* podrían desempeñar un papel en este proceso. De hecho, el nivel de expresión de *TIMP3* ovárico aumenta en el CL regresivo [192]. Los componentes del sistema del activador del plasminógeno (PA) juegan un rol importante en la fisiología

ovárica [193] y también participan en la luteólisis, momento en el cual aumenta la expresión ovárica de PA y de su inhibidor, PAI-1 [194]. PA participa en la degradación de la MEC a través de activación de plasmina, que además de degradar la fibrina (ver sección 9.5.1), es capaz de escindir el propéptido de algunas pro-MMP y así iniciar su activación [195]. El PA a su vez es regulado por sus inhibidores PAI-1 y PAI-2 [196]. Es de destacar que este último gen también se encuentra sobre-expresado en el OJP (ver sección 9.5.1).

Por otra parte, en el ovario postparto también observamos un aumento en la expresión de *SDC1* (syndecan-1) y de *GPC4* (glypican-4), genes que codifican para proteoglicanos de heparansulfato. *GPC4* se expresa en las células del cúmulo y constituye un marcador de la calidad del ovocito. Tanto *SDC1* y *GPC3* -estructural y funcionalmente similar a *GPC4*- se han encontrado en bajos niveles en el líquido folicular de mujeres con reserva ovárica reducida que se sometieron a fertilización *in vitro* [197]. El heparansulfato y otros glicosaminoglicanos enlazados a proteoglicanos, se encuentran como aniones a pH fisiológico, lo cual facilita la retención de agua, el transporte de nutrientes, la estructura de la matriz y su integridad mecánica [198]. La sobreexpresión de estos proteoglicanos en el ovario post-parto contribuiría al mantenimiento de la reserva ovárica. De hecho, se observó una mayor reserva ovárica por efecto de la paridad en mujeres en edad fértil [199] y en ratones hembra a edad estropausica (16 meses) el recuento de folículos residuales fue significativamente mayor en ovarios de ratones multíparos frente a ovarios de ratones nulíparos [39]. Estos hallazgos sugieren que el embarazo, modulando la composición de la MEC ovárica, podría minimizar la pérdida natural de folículos durante la vida reproductiva hasta la postmenopausia.

#### **9.5.4 Apoptosis (GO)**

Uno de los términos GO más enriquecidos dentro de los genes sobre-regulados en el ovario postparto fue *apoptotic process* (65 genes). La muerte celular programada a lo largo

de la vida reproductiva es un componente esencial del desarrollo y la función ovárica [200]. La atresia folicular y la regresión lútea son procesos de muerte celular. La luteólisis estructural, que incluye una angioregresión y pérdida de la integridad del cuerpo lúteo, implica la muerte celular de células endoteliales y luteales [32]. La información disponible sobre la regresión estructural del CL es diversa, por lo que el mecanismo exacto no se conoce del todo. Sin embargo, se han identificado tres factores mediadores de la muerte celular ovárica en roedores: citoquinas, Fas/FasL y caspasas [28]. En un estudio sobre la regresión del CL murino en cultivo se observó que las citoquinas IFN-gamma y TNF-alfa estaban implicadas en la activación de la apoptosis mediada por Fas/FasL, al inhibir la expresión de FasB, un agente anti apoptótico que se une a FasL [153]. En otro estudio de regresión en CL de rata, el TNF-alfa activó la vía de las caspasas [201], proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica.

Durante la gestación en ratas, el CL experimenta una reducción importante de tamaño desde los 4 días previos al parto en forma simultánea a una disminución de la producción de P4. Hacia el día 3 post-parto se observó un aumento de 3-4 veces en la fragmentación del DNA -una medida de muerte celular apoptótica- en relación a la regresión pre-parto [202]. Esto podría dar cuenta del gran número de genes apoptóticos en nuestros resultados, algunos de ellos son *CSTB*, *BAP31* y *TRAF7*. *CSTB* codifica para la proteasa catepsina B, una proteína involucrada en la muerte de células endoteliales humanas mediada por TNF-alfa e IFN-gamma [203]. Este antecedente sugiere que *Ctsb* podría participar en la angioregresión del CL. Además, también actúa en la apoptosis de células de la granulosa de ratones a través de la vía TNF-alfa, caspasa 8 y caspasa 3 [204]. Esta última se activa en la luteólisis de ratas preñadas [28]. El *BCAP31* codifica una proteína transmembrana del RE que participa en la apoptosis mediada por Fas y caspasa 8 [205]. *TRAF7* codifica el Factor 7 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral, que funciona como un mediador de las

señales del TNF sobre su receptor [206], además se ha informado su participación en la vía de transducción de los TLR [207].

Algunos autores han descrito la existencia de un CL postparto “lactante” en la rata, que presenta una mayor resistencia a la apoptosis por efecto de la prolactina circulante en animales que amamantan frente a los que no lo hacen [208]. Específicamente, el número de células apoptóticas se mantiene bajo hasta el día 9 post-parto en ratas que amamantan, mientras que las ratas que no amamantan reanudan los ciclos ovulatorios después del parto y experimentan aumentos transitorios en el número de células apoptóticas del CL gestacional. En consistencia con nuestros datos, *prolactin signaling pathway* fue una de las vías de señalización significativas en el ovario postparto (**Figura 2**), con 7 genes. Notablemente, dos genes de la vía de señalización de PRL, *Jak1* y *Stat3* [209], son parte de estos 7 genes. Un tercer gen, *Cish* (*cytokine-inducible SH2-containing protein*), ha sido descrito como un regulador negativo de la señalización de prolactina -y algunas citoquinas- a través de la vía análoga JAK-STAT5 [210]. Esto coincide con el hecho de que *Akr1c18*, que codifica la enzima 20 $\alpha$ -HSD esté elevado (ver sección 9.3), ya que durante la luteólisis funcional la PGF<sub>2a</sub> promueve la expresión de *Akr1c18* y reprime la expresión del *Prlr*, el receptor de PRL (ver sección 4.3).

Dentro de los genes clasificados como apoptóticos también encontramos algunos que inhiben la proliferación celular (*DDX3X*, *CDKN1A* y *TP53INP1*). El gen *DDX3X* es miembro de la familia de proteínas *DEAD-box*, codifica una ARN helicasa multifuncional dependiente de ATP, que entre varias funciones, regula positivamente la transcripción de *CDKN1A* [211]. A su vez, la proteína codificada por *CDKN1A* (cyclin dependent kinase inhibitor 1), participa en la inhibición de la proliferación celular mediada por p53/TP53 en respuesta al daño del ADN [212]. Este gen se expresa en el ovario de rata, principalmente en CG, y participa en la detención del ciclo celular [87]. *TP53INP1*, que codifica para la proteína nuclear 1 inducible por p53, tiene actividad antiproliferativa, proapoptótica y antioxidante [213]. El estrés

oxidativo, producto de un desbalance de los niveles de especies reactivas de oxígeno, es un fenómeno desencadenante de la luteólisis [41]. De los 65 genes clasificados en *apoptotic process*, 11 fueron además clasificados en *response to oxidative stress* (GO:0006979) y de éstos 11, 5 en *response to hydrogen peroxide* (GO:0042542). Por último, otros 4 genes (*GGCT*, *OSGIN1*, *SELENOK* y *TXNDC12*) tienen roles en situaciones desbalance oxidativo celular, aunque no aparecen indexados en funciones afines a estrés oxidativo en GO.

### 9.5.5 Transporte vesicular (GO y CP)

El tema *transporte vesicular* comprende el conjunto de genes reunidos en los términos GO *intracellular transport* (62 genes), *vesicle mediated transport* (57 genes), *secretory vesicle* (46 genes), *Endosome* (41 genes). Los genes *PICALM*, *RAB10*, *VTI1B* y *RAB5C* estaban incluidos en estos 4 términos GO. El cuerpo lúteo es una glándula endocrina transitoria que cumple importantes funciones secretoras durante el ciclo estral y el embarazo. Es responsable de la secreción de hormonas esteroides, como P4 y estradiol, hormonas peptídicas como la relaxina y agentes vasoactivos como prostaglandinas y VEGF [214]. En el CL ovino se ha identificado una relación entre la secreción de P4 y la liberación de gránulos secretores desde el Golgi en respuesta a la LH, lo que sugiere que estos gránulos o vesículas contendrían una proteína transportadora de P4 [215], que bien podría ser CBG, codificada por *Serpina6* (ver sección 9.1). Además, se sabe que la relaxina se acumula en gránulos secretores a lo largo del embarazo [216].

Nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol y con el transporte mediado por vesículas. Algunos de ellos son *LHCGR*, *NPC2*, *PGRMC1*, *BECN1*, *RAB10*, *RAB5C* y *RAB9A*. La gonadotropina FSH induce la expresión ovárica del receptor de LH, *LHCGR*. Además de estimular la ovulación, la LH es uno de los más importantes factores luteotrópicos y reguladores de la actividad metabólica, particularmente lipídica, de la autofagia y de la homeostasis mitocondrial y lisosomal del CL

[217]. El gen *NPC2* (*Niemann-Pick C2*) se expresa en las células de la teca y lúteas del ovario murino [218]. Codifica para una proteína lisosomal que promueve la salida del colesterol desde el lumen lisosomal hacia la superficie a través del glicocálix [219]. Participa en el tráfico de colesterol ovárico para su uso como precursor de la síntesis de hormonas esteroideas [218]. De forma similar, las diversas funciones de *PGRMC1* (*Progesterone Receptor Membrane Component 1*) incluyen su participación en el transporte de colesterol, la activación de varias enzimas CYP450 esteroideogénicas, y la síntesis del progestágeno pregnenolona a partir del colesterol [220]. *RAB10* (*RAB10, Member RAS Oncogene Family*), *RAB5C* (*RAB5C, Member RAS Oncogene Family*) y *RAB9A* (*RAB9A, Member RAS Oncogene Family*) codifican miembros de la familia Rab, pequeñas GTPasas de la superfamilia Ras que son reguladores maestros de la exocitosis y el tráfico intracelular de vesículas [221].

*BECN1* (Beclin1) codifica una proteína que desempeña un papel central en la autofagia [222]. Este proceso celular implica el reciclaje de proteínas y organelos con el objeto de mantener la homeostasis y el balance energético celular [223]. Cuando se suprimió dirigidamente la expresión *Becn1* en las CG -precursoras de células luteales- de ratones hembra preñados, se observó niveles bajos de P4 que indujeron un parto prematuro. Esto demuestra un papel crucial de la autofagia mediada por *Becn1* en la síntesis de P4 y el mantenimiento del embarazo [224]. El proceso mediante el cual un autofagosoma entrega microgotas de lípidos a los lisosomas se denomina lipofagia, y su fin es acumular una importante reserva de colesterol para la esteroideogénesis [225].

Otros aspectos del rol de *Becn1* en la autofagia se asocia a la mantención de la reserva ovárica y a la atresia folicular. En los ovarios de animales *Becn1* (+/-) se observó una reducción del 56% de células germinales en comparación con los ovarios de ratones WT en el día 1 postnatal [226]. Por lo tanto, la autofagia pareciera ser un mecanismo de supervivencia celular de las células germinales femeninas con el propósito de mantener la

reserva ovárica de folículos primordiales. Recientemente se ha demostrado que la autofagia regulada por *Becn1* también participa en la atresia folicular, favoreciendo la mantención de folículos primordiales sanos [227]. La atresia folicular es un proceso natural mediante el cual los folículos ováricos inmaduros se degeneran y es una de las causas principales de la disminución natural de la reserva ovárica con el paso de la edad [228]. Estos datos sugieren fuertemente que el papel de *Becn1* es esencial en el mantenimiento de la función ovárica.

Una vía canónica enriquecida y relacionada al transporte vesicular fue *translocation of GLUT4 to the plasma membrane* (7 genes). Algunos de los genes presentes en esta vía son *TUBA8*, *RAB10*, *YWHAZ*, *YWHAE* y *PRKAG2*. El producto codificado por *TUBA8*, Tubulina Alpha 8, es el principal constituyente de los microtúbulos, que son las proteínas motoras responsables del tráfico de GLUT4 a la membrana en respuesta a la insulina [229]. *RAB-10* codifica una Ras GTPasa reguladora del transporte de vesículas enriquecidas del transportador GLUT4 desde la red trans-Golgi (TGN) a la membrana plasmática [221]. Por su parte, *YWHAZ* y *YWHAE* codifican proteínas pertenecientes a la familia 14-3-3, que juegan un papel importante en la translocación de GLUT4 al interactuar con AS160 [230], una proteína activadora de Rab-GTPasa que activa *RAB10* [231]. *PRKAG2* codifica para una subunidad de unión a AMP/ATP de la proteína kinasa activada por AMP (AMPK), una proteína que sensa el estado energético celular y que puede mejorar la sensibilidad a la insulina [232].

La sobre-expresión de los genes mencionados tiene directa relación con cambios en la homeostasis de la glucosa materna que se evidencian hacia el final del embarazo. A pesar de que existen niveles elevados de insulina y una mayor producción de glucosa por parte del hígado, durante la gestación se ha observado un estado de hipoglucemia [233]. Un estudio aplicando la técnica de pinza euglucémica-hiperinsulinémica comparó las tasas de consumo de glucosa de diferentes tejidos entre ratas preñadas y vírgenes. En ratas preñadas se observó una disminución del consumo de glucosa en los tejidos adiposo blanco y muscular

esquelético respecto a las vírgenes. El consumo de glucosa fetal representó un 23% del consumo total de glucosa materna en el estado basal, mientras que durante la hiperinsulinemia, hubo un aumento del 30% en la tasa de consumo de glucosa placentaria [234]. Esto implica una resistencia a la insulina en el tejido muscular y adiposo para destinar una mayor cantidad de glucosa al consumo fetoplacentario [233]. Si bien no existen datos sobre las tasas consumo de glucosa por parte del ovario durante la gestación y el parto subsiguiente, es razonable predecir que las actividades metabólicas de síntesis, transporte y secreción de hormonas esteroidales y su precursor colesterol, la producción de hormonas peptídicas, la remodelación de la MEC, la inflamación y los procesos de angioregresión, autofagia y apoptosis requieren un aporte energético en términos de combustibles celulares [235] que, en consistencia con nuestros datos, implicaría un mayor ingreso y consumo de glucosa por el OJP en relación al OJN.

## **9.6. Funciones enriquecidas en los genes regulados negativamente en el OJP**

### **9.6.1. Ciclo Celular (CP y GO)**

Se asignó el tema *ciclo celular* al conjunto de términos y vías canónicas *cell cycle* (GO, 36 genes) *cell cycle<sup>a</sup>* (CP *Reactome*, 21 genes), *G1 to S cell cycle control* (5 genes), *synthesis of DNA* (6 genes) y *cell cycle<sup>b</sup>* (CP *KEGG*, 6 genes) enriquecidas en los genes sub-expresados en el OJP. *Synthesis of DNA* está contenido en su totalidad en la vía *cell cycle<sup>a</sup>*. Algunos procesos ováricos donde se activan estas vías son la foliculogénesis -que requiere la proliferación de CG- y la ovulación, donde el OSE prolifera para reparar el daño mecánico generado por el paso del ovocito, la ruptura del folículo antral y la exposición al líquido folicular [236]. Por otra parte, sólo durante las primeras fases de la luteinización hay proliferación de las células endoteliales y de la granulosa y teca donde estas últimas continúan diferenciándose hacia células luteales para constituir el cuerpo lúteo [17]. La

foliculogénesis y la ovulación se encuentran en pausa en el ovario postparto mientras que la luteinización ya ha ocurrido. Nuestros datos provienen de comparar el ovario posparto frente a un ovario nullíparo en la fase de diestro del ciclo estral, donde está ocurriendo al menos uno de los procesos proliferativos ya mencionados.

Dentro de los genes sub-expresados encontramos varios genes esenciales en la progresión del ciclo celular y meiosis, algunos de ellos son *RRM2*, *CDC25C*, *CDCA3*, *NINL*, *NEK9* y *CDK5RAP2*. *RRM2* (*Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2*) codifica para la subunidad regulatoria de la ribonucleótido reductasa, la enzima esencial para obtener desoxirribonucleótidos (dNTPs) a partir de ribonucleótidos. Los dNTPs son los precursores de la síntesis y reparación de DNA [237]. Por otra parte, *CDC25* (*Cell Division Cycle 25C*) codifica para una tirosina fosfatasa que desfosforila a CDK1, promoviendo su actividad quinasa, que es crucial para la progresión del ciclo celular. De igual forma, *CDCA3* (*Cell Division Cycle Associated 3*), codifica para una proteína del complejo ubiquitina-ligasa E3 que regula positivamente el inicio de la mitosis mediante la ubiquitinación y degradación de la proteína quinasa WEE1 [238], cuyo rol es regular negativamente la transición de G2 a M al fosforilar a CDK1 [239]. *NINL* (*Ninein Like*) codifica para una proteína centrosomal que participa en la organización de los microtúbulos en la interfase y que una vez iniciada la mitosis, es desplazada del centrosoma para formar un andamio mitótico que posee una actividad optimizada de nucleación de microtúbulos para iniciar la división celular [240]. Apoyando el proceso anterior, la proteína codificada por *NEK9* (*NIMA Related Kinase 9*), promueve la separación de los centrosomas y la configuración bipolar del huso mitótico [241]. Por otro lado, *CDK5RAP2* (*CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 2*) es una proteína que participa en la regulación del huso meiótico en los ovocitos preovulatorios [109]. La disminución uniforme en la expresión de una variedad de genes involucrados en el ciclo celular, da cuenta de un estado de quiescencia folicular y anovulación del ovario post parto previamente observado en ratas que amamantan [141].

### 9.6.2. Mitocondria (GO)

*Mitochondrion* (42 genes) fue el término GO más enriquecido en los genes sub-expresados en el OJP. Los genes *MRPS11*, *MRPS21* y *TUFM* codifican para proteínas del ribosoma mitocondrial en tanto que *ACAA2*, *ACAD10*, *ACAD8* y *ACOT13* participan en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. En particular *ACAD8* además participa en el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada y *COQ6* y *COQ9* en la biosíntesis de ubiquinol. En tanto, las funciones de *ETFB* y *NDUFA8* se relacionan a la cadena de transporte de electrones, localizada en la membrana mitocondrial interna. El transporte de electrones acoplado a la fosforilación oxidativa, constituye la principal fuente celular de ROS a través de una reducción incompleta de oxígeno molecular [242]. La mitocondria también es sensible al estrés oxidativo, por lo que cuenta con un sistema de defensa compuesto por enzimas y antioxidantes no enzimáticos que modulan la producción y eliminación de ROS, respectivamente [242].

El aumento de ROS mitocondriales puede inducir la apoptosis y autofagia celular [243]. De hecho, uno de los eventos iniciales de la luteólisis es la generación y acumulación de ROS que finalmente culminan con la muerte de células luteales [41, 244]. Aunque el mecanismo exacto de generación intracelular de ROS en la regresión del CL no ha sido aclarado completamente, se ha observado un aumento de los niveles de ROS tras el tratamiento con el agente luteolítico PGF2a en cultivos de células luteales de rata [245]. Además, otros estudios de expresión génica confirmaron la disminución de la expresión de genes antioxidantes inducida por PGF2a al final de la gestación [41]. Por otro lado, el ADNmt por su proximidad a la cadena transportadora de electrones, es particularmente susceptible a sufrir daño por ROS [246], por lo que esto puede influir negativamente en la transcripción génica de genes mitocondriales.

La represión de los genes mencionados en el ovario post parto da cuenta de una defensa antioxidante deficiente ante un aumento de ROS. Algunos de ellos son *COQ6*, *COQ9*, *MPV17*, *PAM16* y *NDUFA8*. Las proteínas codificadas por *COQ6* (*Coenzyme Q6, Monooxygenase*) y *COQ9* (*Coenzyme Q9*) participan en la biosíntesis de la Coenzima Q (Coq), también llamada ubiquinona [247, 248]. La Coq, presente en todas las membranas celulares eucariotas [249], es un componente clave de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y uno de los antioxidantes lipofílicos más eficientes en la protección del daño celular causado por ROS [250]. *COQ6* es una monooxigenasa dependiente de FAD que forma una cavidad orientando al precursor de Coq altamente hidrofóbico hacia el sitio catalítico de la enzima [247]. *COQ9* es una proteína mitocondrial que une lípidos y coordina la síntesis de Coq a través de la unión con la hidrolasa *COQ7* formando un heterodímero *COQ7:COQ9*, y sucesivamente un tetrámero que deforma la membrana y genera una vía para que los precursores hidrofóbicos de Coq se transloquen desde la bicapa hacia los sitios de unión a lípidos de las enzimas [248]. Por otro lado, *MPV17* (*Mitochondrial Inner Membrane Protein MPV17*) codifica para una proteína que funciona como un canal no selectivo de la membrana mitocondrial interna regulando el potencial de membrana en condiciones normales o de estrés oxidativo [251]. También mantiene la homeostasis del ADN mitocondrial [252]. *PAM16* (*Presequence Translocase Associated Motor 16*) codifica una proteína mitocondrial que regula la importación de proteínas mitocondriales codificadas nucleares a la matriz [253]. *PAM16* también controla la producción de ROS a través de un aumento en la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones y reduce la acumulación de ROS mejorando la actividad de enzimas antioxidantes [254]. *NDUFA8* (*NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A8*) codifica para una subunidad estructural del complejo I, la NADH deshidrogenasa, que transfiere los electrones del NADH a la cadena respiratoria [255]. Una disminución en la expresión de *NDUFA8* se ha asociado a un aumento de ROS e inestabilidad de la función mitocondrial [256]. Como se mencionó en la

sección 9.5.4, el proceso de muerte celular continúa después del parto, por lo que esta expresión reducida de genes mitocondriales podría relacionarse a un incremento de ROS, que a su vez podrían generar daño en el ADNmt.

### **9.7 Comparación entre los GED de ovarios a edad fértil (OJP-OJN) con los GED de ovarios a edad post-reproductiva (OVM-OVN)**

El último objetivo de esta Tesis fue estudiar si el efecto de la preñez -en términos de expresión génica ovárica- se mantiene en el largo plazo, es decir si es detectable en la edad post-reproductiva. Hasta este punto, hemos visto que el parto promueve una gran diversidad de cambios en la expresión génica ovárica. Cabe preguntarse si estos cambios persisten, se atenúan o se pierden en el tránsito desde la edad fértil a la edad menopáusica. Dadas las similitudes del proceso de envejecimiento ovárico entre humano y ratón y la alta conservación a nivel del genoma y transcriptoma entre ambas especies, las alteraciones producidas por la preñez y que persisten durante el envejecimiento en el modelo murino estudiado en esta Tesis podrían tener implicancias en la biología del ovario humano post-menopáusico, y por lo tanto contribuir a conocer la base genética-molecular del efecto protector del embarazo sobre el riesgo de CO.

Para responder esta pregunta se compararon los 692 GEDs entre ovarios a edad fértil (OJP vs OJN) con los 308 GEDs en la etapa post-reproductiva (OVM vs OVN). En la **Figura 6A** se observa que 26/692, es decir sólo un ~3,8% de los GEDs por efecto del parto en ovarios de edad fértil se perpetúa en el ovario envejecido. De ellos, sólo siete conservan el sentido de su expresión. La identidad y la función de esos 26 genes se muestra en la **Tabla 5**.

### 9.7.1. Genes que conservan su regulación positiva a largo plazo

*Tgif1* y *E330034G19Rik* conservaron su regulación positiva. *Tgif1* es un correpresor transcripcional de *Smad* [257]. Los Smads son factores de transcripción activados por miembros de la familia del TGF-beta que participan en el desarrollo folicular [258]. Otra función de *Tgif1* en el ovario es la inhibición de la fosforilación de Smad2/3, lo que a su vez afecta la transcripción de genes relacionados con la esteroidogénesis en las CG [102]. *E330034G19Rik* es un gen específico de ovocitos [259] y se cree que participa en la maduración meiótica [111]. Su expresión es regulada positivamente por *Figla* [259], un factor de transcripción esencial para la formación de folículos primordiales, considerado un marcador de reserva ovárica [159]. Se ha observado que una sobre-expresión de un miembro de la familia TGF-beta conduce al agotamiento prematuro de la reserva folicular [260], mientras que las mutaciones heterocigotas de *Figla* se asocian a mujeres con insuficiencia ovárica prematura [261]. Considerando que la reserva folicular ovárica decae naturalmente con la edad, la expresión en el largo plazo de estos dos genes en un ovario que experimentó gestación y parto, permite sugerir un rol indirecto en la retención de una mayor reserva ovárica residual en la condición de paridad. Definimos reserva ovárica residual a los folículos primordiales que persisten después de la menopausia [262], o de la estropausia en roedores.

### 9.7.2. Genes que conservan su regulación negativa a largo plazo

Por otra parte, *Kctd14*, *Mmd2*, *Acaa2*, *Mapt* y *Gucy1a3* conservaron su regulación negativa. *Kctd14* se expresa específicamente en las CG del folículo pre-antral y solo en las células del cúmulo de folículos antrales más grandes [44]. Se desconoce su función, pero es posible que esté relacionada con el desarrollo folicular, ya que se regula negativamente por la hormona antimülleriana (AMH) [68], que es producida por células funcionales de la

granulosa para inhibir la foliculogénesis y prevenir la ovulación. AMH además se utiliza como marcador sérico de la reserva ovárica funcional [263].

*Mmd2*, alias *Paqr10* (*progesterin and adipoQ receptor 10*) es una proteína del aparato de Golgi que mejora la retención y activación de la cascada de señalización de Ras, y la consecuente activación de la señalización de ERK [76]. Las proteínas Ras son pequeñas GTPasas de membrana que transmiten señales extracelulares que median supervivencia, proliferación y diferenciación celular [264, 265]. En las CG de los folículos preovulatorios, la LH induce la activación de Ras y la vía ERK1/2 (quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares), también conocida como MAPK3/1 (proteína quinasa 3 y 1 activada por mitógenos), lo que conduce a la maduración preovulatoria y la ovulación [266].

El gen *Acaa2* (acetyl-CoA acyltransferase 2) codifica para la enzima que cataliza la última reacción de la vía de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, para producir acetil-CoA que luego ingresa al ciclo de Krebs para la producción de ATP. *Acaa2* aumenta su expresión en las células del cúmulo durante la maduración del ovocito, probablemente en respuesta a LH [92]. Los genes sub-expresados previamente descritos podrían definir un efecto protector atribuible al embarazo que previene el desarrollo folicular y la ovulación, resultando en una mayor preservación de la reserva folicular.

## 10. Conclusiones

Cerca de 700 genes se identificaron en el análisis comparativo del transcriptoma ovárico entre ratones hembra primíparos y nulíparos de edad adulta fértil. La subsecuente caracterización de las vías canónicas y de ontología génica enriquecidas en dichos genes reveló una diversa gama de diferentes procesos biológicos entre estos dos estados reproductivos, que dan cuenta del efecto a corto plazo de la gestación y del parto.

El perfil de expresión génica del ovario postparto primíparo reflejó claramente una serie de eventos relacionados con la luteólisis funcional y estructural, caracterizada por la

disminución de la esteroidogénesis, la degradación enzimática de P4, los procesos de estrés oxidativo, apoptosis y autofagia, la regulación de la inflamación, la remodelación de la MEC ovárica y la detención del desarrollo folicular. En el ovario postparto también se observaron genes cuya expresión indica la persistencia de funciones relacionadas a la gestación en un contexto sistémico. Estos se relacionan a la hemostasia, la angiogénesis, la secreción hormonal, la sensibilización a la insulina y la señalización de prolactina. Por otro lado, se sub-expresaron genes relacionados con la progresión del ciclo celular que, en el contexto del embarazo y el post-parto, sugieren un estado de quiescencia proliferativa en el desarrollo folicular, la luteinización y la reparación por ruptura del OSE tras la ovulación. El análisis de tipos celulares sugirió enriquecimiento de marcadores ovocitarios, de CG -particularmente atrésicas- y de células mesenquimales -principalmente fibroblastos-, mientras que la proporción de células estromales esteroidogénicas se vió reducida. De especial interés fue la identificación de los genes *Oosp1*, *Rfpl4*, *SDC1*, *GPC4*, *BECN1*, *Tgif1*, *E330034G19Rik* y *Kctd14* asociados con la mantención de la reserva folicular expresados diferencialmente por efecto de la paridad a corto plazo en edad adulta.

Una pequeña parte de expresión génica ovárica inducida por la preñez en edad fértil se mantuvo a largo plazo en el ovario múltiparo envejecido. En este sentido, sólo un 3.8% (26 genes) de los GEDs del OJP coincide con los GEDs de OVM, dentro de los cuales sólo siete genes conservan el sentido de su expresión. El resto de los GEDs inducidos por el embarazo a edad adulta aparentemente se pierde en la transición hacia edad post-reproductiva. Sin embargo, es de destacar que la expresión de *Tgif1* y *E330034G19Rik* se mantuvo regulada positivamente y *Kctd14* negativamente al alcanzar la edad estropáusica del ratón. La función reportada de estos genes permite sugerir que el efecto protector del embarazo a largo plazo se relaciona con la restricción de desarrollo folicular y la consecuente mantención de una mayor reserva ovárica folicular residual en la condición de paridad.

Una limitación del estudio fue el fenómeno de la luteólisis reciente en el ovario post-parto. Este proceso conduce a cambios drásticos en la expresión de múltiples genes ováricos que pueden sobresalir o superponerse a los cambios específicos asociados al embarazo que se mantienen o se alteran en el envejecimiento ovárico.

Considerando el impacto significativo de la luteólisis y el probable efecto protector mediado por la preservación de la reserva folicular, para una futura investigación sería recomendable un intervalo de tiempo entre el postparto y el análisis transcriptómico ovárico además de una caracterización funcional o fenotípica de la reserva ovárica residual en ambas condiciones de paridad. Esto podría entregar datos valiosos acerca del efecto protector del embarazo ante el desarrollo del CO.

## 11. Referencias

1. Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology (2015). FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J Gynecol Oncol* [Internet]. 26(2):87–9.
2. Doubeni CA, Doubeni AR, Myers AE (2016). Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician*. 93(11):937-44.
3. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Observatory (2020). *IARC.fr*. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
4. Berek JS, Renz M, Kehoe S, Kumar L, Friedlander M, (2021). Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum update. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet]. 2021;155 Suppl 1(S1):61–85.
5. Godwin AK, Testa JR, Handel LM, Liu Z, Vanderveer LA, Tracey PA, et al. (1992). Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells: association with cytogenetic changes and implications of repeated ovulation in the etiology of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 84(8):592–601.

6. Sung HK, Ma SH, Choi J-Y, Hwang Y, Ahn C, Kim B-G, et al. (2016). The effect of breastfeeding duration and parity on the risk of epithelial ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Prev Med Public Health [Internet]*. 49(6):349–66.
7. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G. (2008) Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet [Internet]*. 371(9609):303–14.
8. Hunn J, Rodriguez GC (2012). Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol [Internet]*. 55(1):3–23.
9. Smith ER, Xu X-X (2008).. Ovarian ageing, follicle depletion, and cancer: a hypothesis for the aetiology of epithelial ovarian cancer involving follicle depletion. *Lancet Oncol [Internet]*. 9(11):1108–11.
10. Auersperg N (2013). Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: unwarranted speculation or evidence-based hypothesis? *Gynecol Oncol [Internet]*. 130(1):246–51.
11. Dubeau L, Drapkin R (2013). Coming into focus: the nonovarian origins of ovarian cancer. *Ann Oncol [Internet]*. 2013;24 Suppl 8:viii28–35.
12. Richards JS, Pangas SA (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest [Internet]*. 2010;120(4):963–72.
13. Richards JS (2018) The ovarian cycle. *Vitam Horm [Internet]*. 107:1–25.
14. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev [Internet]*. 2000;21(2):200–14.
15. Casarini L, Crépieux P (2019). Molecular mechanisms of action of FSH. *Front Endocrinol (Lausanne) [Internet]*. 10:305.

16. Abedel-Majed MA, Romereim SM, Davis JS, Cupp AS (2019). Perturbations in lineage specification of granulosa and theca cells may alter corpus luteum formation and function. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2019;10:832.
17. Smith MF, McIntush EW, Smith GW (1994). Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* [Internet]. 72(7):1857–72.
18. Davis JS, Rueda BR (2002). The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Front Biosci* [Internet]. 7(4):d1949-78.
19. Stocco C, Telleria C, Gibori G (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* [Internet]. 28(1):117–49.
20. Qiu Y, Seager M, Osman A, Castle-Miller J, Bevan H, Tortonese DJ, et al (2012). Ovarian VEGF(165)b expression regulates follicular development, corpus luteum function and fertility. *J Reprod Fertil* [Internet]. 143(4):501–11.
21. Redmer DA, Grazul AT, Kirsch JD, Reynolds LP (1988). Angiogenic activity of bovine corpora lutea at several stages of luteal development. *J Reprod Fertil* [Internet]. 82(2):627–34.
22. Woad KJ, Robinson RS (2016). Luteal angiogenesis and its control. *Theriogenology* [Internet]. 86(1):221–8.
23. Terkel J (1986). Neuroendocrinology of coitally and noncoitally induced pseudopregnancy. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 474(1):76–94.
24. Albarracin CT, Parmer TG, Duan WR, Nelson SE, Gibori G (1994). Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* [Internet]. 134(6):2453–60.
25. Piekorz RP, Gingras S, Hoffmeyer A, Ihle JN, Weinstein Y (2005). Regulation of progesterone levels during pregnancy and parturition by signal transducer and

- activator of transcription 5 and 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol* [Internet]. 19(2):431–40.
26. Csapo AI, Pulkkinen MO, Ruttner B, Sauvage JP, Wiest WG (1972). The significance of the human corpus luteum in pregnancy maintenance. I. Preliminary studies. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 112(8):1061–7.
  27. Bachelot A, Binart N (2005). Corpus luteum development: lessons from genetic models in mice. *Curr Top Dev Biol* [Internet]. 68:49–84.
  28. Sugino N, Okuda K (2007). Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. *J Reprod Dev* [Internet]. 53(5):977–86.
  29. Anderson LL, Bland KP, Melampy RM (1969). Comparative aspects of uterine-luteal relationships. *Recent Prog Horm Res* [Internet]. 25:57–104.
  30. Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF, Gibori G (2000). Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -induced expression of 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem* [Internet]. 275(47):37202–11.
  31. Stocco C, Djiane J, Gibori G (2003). Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) and prolactin signaling: PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -mediated inhibition of prolactin receptor expression in the Corpus luteum. *Endocrinology* [Internet]. 144(8):3301–5.
  32. Monaco CF, Davis JS (2023). Mechanisms of angioregression of the corpus luteum. *Front Physiol* [Internet]. 14:1254943.
  33. Diep CH, Daniel AR, Mauro LJ, Knutson TP, Lange CA (2015). Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 54(2):R31-53.
  34. Rothchild I (1981). The regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent Prog Horm Res* [Internet]. 37:183–298.
  35. Telleria CM, Stocco CO, Stati AO, Deis RP (1999). Progesterone receptor is not required for progesterone action in the rat corpus luteum of pregnancy. *Steroids* [Internet]. 64(11):760–6.

36. Gibori G, Khan I, Warshaw ML, McLean MP, Puryear TK, Nelson S, et al (1988). Placental-derived regulators and the complex control of luteal cell function. *Recent Prog Horm Res* [Internet]. 44:377–429.
37. Telleria CM, Zhong L, Deb S, Srivastava RK, Park KS, Sugino N, et al (1998). Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. *Endocrinology* [Internet]. 139(5):2432–42.
38. Lindgren PR, Bäckström T, Cajander S, Damber M-G, Mählck C-G, Zhu D, et al (2002). The pattern of estradiol and progesterone differs in serum and tissue of benign and malignant ovarian tumors. *Int J Oncol* [Internet]. 21(3):583–9.
39. Urzúa U, Chacón C, Norambuena M, Lizama L, Sarmiento S, Asaki E, et al (2020). The ovarian transcriptome of reproductively aged multiparous mice: Candidate genes for ovarian cancer protection. *Biomolecules* [Internet]. 10(1):113.
40. Waite C, Mejia R, Ascoli M (2016). Gq/11-dependent changes in the Murine ovarian transcriptome at the end of gestation. *Biol Reprod* [Internet]. 94(3):62.
41. Foyouzi N, Cai Z, Sugimoto Y, Stocco C (2005). Changes in the expression of steroidogenic and antioxidant genes in the mouse corpus luteum during luteolysis. *Biol Reprod* [Internet]. 72(5):1134–41.
42. Miyado M, Miyado K, Katsumi M, Saito K, Nakamura A, Shihara D, et al (2015). Parturition failure in mice lacking Mam1d1. *Sci Rep* [Internet]. 5(1):14705.
43. Mejia R, Waite C, Ascoli M (2015). Activation of Gq/11 in the mouse corpus luteum is required for parturition. *Mol Endocrinol* [Internet]. 29(2):238–46.
44. Morris ME, Meinsohn M-C, Chauvin M, Saatcioglu HD, Kashiwagi A, Sicher NA, et al (2022). A single-cell atlas of the cycling murine ovary. *Elife* [Internet]. 11.
45. Zhao L, Samuel CS, Tregear GW, Beck F, Wintour EM (2000). Collagen studies in late pregnant relaxin null mice. *Biol Reprod* [Internet]. 63(3):697–703.

46. Lee JA, Cochran BJ, Lobov S, Ranson M (2011). Forty years later and the role of plasminogen activator inhibitor type 2/SERPINB2 is still an enigma. *Semin Thromb Hemost* [Internet].37(4):395–407.
47. McCord LA, Li F, Rosewell KL, Brännström M, Curry TE (2012). Ovarian expression and regulation of the stromelysins during the periovulatory period in the human and the rat. *Biol Reprod* [Internet]. 86(3):78.
48. Goldman S, Shalev E. MMPS and TIMPS in ovarian physiology and pathophysiology. *Front Biosci* [Internet]. 2004;9(1–3):2474–83.
49. genecards
50. Gao X, Greenbaum LM, Mahesh VB, Brann DW (1992). Characterization of the kinin system in the ovary during ovulation in the rat. *Biol Reprod* [Internet]. 47(6):945–51.
51. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* [Internet]. 2013;19(6):355–67.
52. Packham MA, Mustard JF. Platelet aggregation and adenosine diphosphate/adenosine triphosphate receptors: a historical perspective. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2005;31(2):129–38.
53. Leal CAM, Schetinger MRC, Leal DBR, Bauchspiess K, Schrekker CML, Maldonado PA, et al (2007). NTPDase and 5'-nucleotidase activities in platelets of human pregnant with a normal or high risk for thrombosis. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 304(1–2):325–30.
54. Igarashi M, Takeuchi K, Sugiyama S (2018). Roles of CSGalNAcT1, a key enzyme in regulation of CS synthesis, in neuronal regeneration and plasticity. *Neurochem Int* [Internet]. 119:77–83.
55. Garnett ER, Raines RT (2022). Emerging biological functions of ribonuclease 1 and angiogenin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* [Internet]. 57(3):244–60.

56. Masuda K, Haruta S, Orino K, Kawaminami M, Kurusu S (2013). Autotaxin as a novel, tissue-remodeling-related factor in regressing corpora lutea of cycling rats. *FEBS J* [Internet]. 280(24):6600–12.
57. Peluso G, Tian E, Abusleme L, Munemasa T, Mukaibo T, Ten Hagen KG (2020). Loss of the disease-associated glycosyltransferase Galnt3 alters Muc10 glycosylation and the composition of the oral microbiome. *J Biol Chem* [Internet]. 295(5):1411–25.
58. Tachikui H, Kurosawa N, Kadomatsu K, Muramatsu T (1999) Genomic organization and promoter activity of embigin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Gene* [Internet]. 240(2):325–32.
59. Zheng H-C, Xue H, Zhang C-Y. The roles of the tumor suppressor parafibromin in cancer. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022;10:1006400.
60. Xu M, Yang W, Wang X, Nayak DK. Lung Secretoglobin Scgb1a1 influences alveolar macrophage-mediated inflammation and immunity. *Front Immunol* [Internet]. 2020;11:584310.
61. Christmas P, Tolentino K, Primo V, Berry KZ, Murphy RC, Chen M, et al. Cytochrome P-450 4F18 is the leukotriene B4 omega-1/omega-2 hydroxylase in mouse polymorphonuclear leukocytes: identification as the functional orthologue of human polymorphonuclear leukocyte CYP4F3A in the down-regulation of responses to LTB4. *J Biol Chem* [Internet]. 2006;281(11):7189–96.
62. Yang Z, Yan H, Dai W, Jing J, Yang Y, Mahajan S, et al (2019). Tmem178 negatively regulates store-operated calcium entry in myeloid cells via association with STIM1. *J Autoimmun* [Internet]. 2019;101:94–108.
63. Doi M, Murai I, Kunisue S, Setsu G, Uchio N, Tanaka R, et al (2016). Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein-coupled receptor that sets the pace of circadian behaviour. *Nat Commun* [Internet]. 7(1):10583.

64. Lindley LE, Curtis KM, Sanchez-Mejias A, Rieger ME, Robbins DJ, Briegel KJ (2015). The WNT-controlled transcriptional regulator LBH is required for mammary stem cell expansion and maintenance of the basal lineage. *Development* [Internet]. 142(5):893–904.
65. He Z, Sun X, Wang S, Bai D, Zhao X, Han Y, et al (2021). Ggct ( $\gamma$ -glutamyl cyclotransferase) plays an important role in erythrocyte antioxidant defense and red blood cell survival. *Br J Haematol* [Internet]. 195(2):267–75.
66. Jafari D, Mousavi MJ, Keshavarz Shahbaz S, Jafarzadeh L, Tahmasebi S, Spoor J, et al. E3 ubiquitin ligase Casitas B lineage lymphoma-b and its potential therapeutic implications for immunotherapy. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2021;204(1):14–31.
67. Conaway HH, Henning P, Lerner UH. Vitamin a metabolism, action, and role in skeletal homeostasis. *Endocr Rev* [Internet]. 2013;34(6):766–97.
68. Meinsohn M-C, Saatcioglu HD, Wei L, Li Y, Horn H, Chauvin M, et al. Single-cell sequencing reveals suppressive transcriptional programs regulated by MIS/AMH in neonatal ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2021;118(20):e2100920118.
69. Oriá RB, de Almeida JZ, Moreira CN, Guerrant RL, Figueiredo JR. Apolipoprotein E effects on mammalian ovarian steroidogenesis and human fertility. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2020;31(11):872–83.
70. Koshiba S, An R, Saito H, Wakabayashi K, Tamura A, Ishikawa T. Human ABC transporters ABCG2 (BCRP) and ABCG4. *Xenobiotica* [Internet]. 2008;38(7–8):863–88.
71. Kedem A, Ulanenko-Shenkar K, Yung Y, Youngster M, Avraham S, Yerushalmi GM, et al. The involvement of Lumican in human ovulatory processes. *Reprod Sci* [Internet]. 2022;29(2):366–73.

72. Gu S, Matta JA, Lord B, Harrington AW, Sutton SW, Davini WB, et al (2016). Brain  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor assembly requires NACHO. *Neuron* [Internet].;89(5):948–55.
73. Hu K, Wang C, Xu Y, Li F, Han X, Song C, et al (2023). Interaction of lncRNA Gm2044 and EEF2 promotes estradiol synthesis in ovarian follicular granulosa cells. *J Ovarian Res* [Internet]. 16(1):171.
74. Perrine CL, Ganguli A, Wu P, Bertozzi CR, Fritz TA, Raman J, et al. Glycopeptide-preferring polypeptide GalNAc transferase 10 (ppGalNAc T10), involved in mucin-type O-glycosylation, has a unique GalNAc-O-Ser/Thr-binding site in its catalytic domain not found in ppGalNAc T1 or T2. *J Biol Chem* [Internet]. 2009;284(30):20387–97.
75. Moy I, Todorović V, Dubash AD, Coon JS, Parker JB, Buranaprast M, et al. Estrogen-dependent sushi domain containing 3 regulates cytoskeleton organization and migration in breast cancer cells. *Oncogene* [Internet]. 2015;34(3):323–33.
76. Jin T, Xu D, Ding Q, Zhang Y, Mao C, Pan Y, et al. Identification of the topology and functional domains of PAQR10. *Biochem J* [Internet]. 2012;443(3):643–53.
77. Nishino J, Yamashita K, Hashiguchi H, Fujii H, Shimazaki T, Hamada H. Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *EMBO J* [Internet]. 2004;23(9):1998–2008.
78. Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* [Internet]. 2013;79(3):416–38.
79. Porat A, Sagiv Y, Elazar Z. A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport. *J Biol Chem* [Internet]. 2000;275(19):14457–65.
80. Jamba L, Nehru B, Bansal MP. Redox modulation of selenium binding proteins by cadmium exposures in mice. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 1997;177(1–2):169–75.

81. Takao M, Hino J, Takeshita N, Konno Y, Nishizawa T, Matsuo H, et al (1996). Identification of rat bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b), a new member of BMP-3. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. ;219(2):656–62.
82. Hino J, Miyazawa T, Miyazato M, Kangawa K. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) is expressed in adipocytes and inhibits adipogenesis as a unique complex. *Int J Obes (Lond)* [Internet]. 2012;36(5):725–34.
83. Cunningham NS, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Reddi AH, Lee SJ. Growth/differentiation factor-10: a new member of the transforming growth factor-beta superfamily related to bone morphogenetic protein-3. *Growth Factors* [Internet]. 1995;12(2):99–109.
84. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2008;7(6):489–503.
85. Del Collado M, da Silveira JC, Sangalli JR, Andrade GM, Sousa LR da S, Silva LA, et al. Fatty acid binding protein 3 and transzonal projections are involved in lipid accumulation during in vitro maturation of bovine oocytes. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):2645.
86. Richards JS, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Teuling E, Lo Y, Boerboom D, et al. Regulated expression of ADAMTS family members in follicles and cumulus oocyte complexes: evidence for specific and redundant patterns during ovulation. *Biol Reprod* [Internet]. 2005;72(5):1241–55.
87. Chaffin CL, Schwinof KM, Stouffer RL. Gonadotropin and steroid control of granulosa cell proliferation during the periovulatory interval in rhesus monkeys. *Biol Reprod* [Internet]. 2001;65(3):755–62.
88. Han Z, Ni J, Smits P, Underhill CB, Xie B, Chen Y, et al. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells. *FASEB J* [Internet]. 2001;15(6):988–94.

89. Zhang Y, Li X, Luo Z, Ma L, Zhu S, Wang Z, et al (2020). ECM1 is an essential factor for the determination of M1 macrophage polarization in IBD in response to LPS stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 117(6):3083–92.
90. Bailey CG, Ryan RM, Thoeng AD, Ng C, King K, Vanslambrouck JM, et al. Loss-of-function mutations in the glutamate transporter SLC1A1 cause human dicarboxylic aminoaciduria. *J Clin Invest* [Internet]. 2011;121(1):446–53.
91. Hu J, Yao H, Gan F, Tokarski A, Wang Y. Interaction of OKL38 and p53 in regulating mitochondrial structure and function. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(8):e43362.
92. Dunning KR, Anastasi MR, Zhang VJ, Russell DL, Robker RL. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(2):e87327.
93. Morris SL, Brady ST. Tau phosphorylation and PAD exposure in regulation of axonal growth. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022;10:1023418.
94. Andrés-Benito P, Flores Á, Busquet-Areny S, Carmona M, Ausín K, Cartas-Cejudo P, et al. Deregulated transcription and proteostasis in adult *mapt* knockout mouse. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023;24(7):6559.
95. Wallace S, Guo D-C, Regalado E, Mellor-Crummey L, Bamshad M, Nickerson DA, et al. Disrupted nitric oxide signaling due to GUCY1A3 mutations increases risk for moyamoya disease, achalasia and hypertension. *Clin Genet* [Internet]. 2016;90(4):351–60.
96. Wobst J, Schunkert H, Kessler T. Genetic alterations in the NO-cGMP pathway and cardiovascular risk. *Nitric Oxide* [Internet]. 2018;76:105–12.
97. Li Z, Xie J, Wu J, Li W, Nie L, Sun X, et al. CMTM3 inhibits human testicular cancer cell growth through inducing cell-cycle arrest and apoptosis. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(2):e88965.

98. Zhang L, Ye M, Zhu L, Cha J, Li C, Yao Y-G, et al (2020). Loss of ZC4H2 and RNF220 inhibits neural stem cell proliferation and promotes neuronal differentiation. *Cells* [Internet]. 9(7):1600.
99. Lin Y, Peng W, Jiang M, Lin C, Lin W, Zheng Z, et al. Clinical, biochemical and genetic analysis of Chinese patients with isobutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2018;487:133–8.
100. Echevarría L, Clemente P, Hernández-Sierra R, Gallardo ME, Fernández-Moreno MA, Garesse R. Glutamyl-tRNAGln amidotransferase is essential for mammalian mitochondrial translation in vivo. *Biochem J* [Internet]. 2014;460(1):91–101.
101. Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1995;15(5):2672–81.
102. An X, Cao H, Liu S, Cao B. Effects of TG interaction factor 1 on synthesis of estradiol and progesterone in granulosa cells of goats through SMAD2/3-SP1 signaling pathway. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2021;229(106750):106750.
103. Aravindakshan J, Chen X, Sairam MR. Differential expression of claudin family proteins in mouse ovarian serous papillary epithelial adenoma in aging FSH receptor-deficient mutants. *Neoplasia* [Internet]. 2006;8(12):984–94.
104. Zhu Y, Maric J, Nilsson M, Brännström M, Janson P-O, Sundfeldt K. Formation and barrier function of tight junctions in human ovarian surface epithelium. *Biol Reprod* [Internet]. 2004;71(1):53–9.
105. Kadowaki K, Sugimoto K, Yamaguchi F, Song T, Watanabe Y, Singh K, et al. Phosphohippolin expression in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* [Internet]. 2004;125(1–2):105–12.
106. Jay P, Bergé-Lefranc JL, Massacrier A, Roessler E, Wallis D, Muenke M, et al (2000). ARP3beta, the gene encoding a new human actin-related protein, is

- alternatively spliced and predominantly expressed in brain neuronal cells. *Eur J Biochem* [Internet]. 267(10):2921–8.
107. Saeki K, Miura Y, Aki D, Kurosaki T, Yoshimura A (2003). The B cell-specific major raft protein, Raftlin, is necessary for the integrity of lipid raft and BCR signal transduction. *EMBO J* [Internet].;22(12):3015–26.
108. L'Hôte D, Georges A, Todeschini AL, Kim J-H, Benayoun BA, Bae J, et al. Discovery of novel protein partners of the transcription factor FOXL2 provides insights into its physiopathological roles. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2012;21(14):3264–74.
109. Wang X, Baumann C, De La Fuente R, Viveiros MM. CEP215 and AURKA regulate spindle pole focusing and aMTOC organization in mouse oocytes. *J Reprod Fertil* [Internet]. 2020;159(3):261–74.
110. Muramatsu H, Zou P, Kurosawa N, Ichihara-Tanaka K, Maruyama K, Inoh K, et al. Female infertility in mice deficient in midkine and pleiotrophin, which form a distinct family of growth factors. *Genes Cells* [Internet]. 2006;11(12):1405–17.
111. Cao S, Guo X, Zhou Z, Sha J. Comparative proteomic analysis of proteins involved in oocyte meiotic maturation in mice. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2012;79(6):413–22.
112. Sherwood OD. Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *Endocr Rev* [Internet]. 2004;25(2):205–34.
113. Anand-Ivell R, Ivell R (2014). Regulation of the reproductive cycle and early pregnancy by relaxin family peptides. *Mol Cell Endocrinol* [Internet].382(1):472–9.
114. Kwok SC, Chakraborty D, Soares MJ, Dai G. Relative expression of proprotein convertases in rat ovaries during pregnancy. *J Ovarian Res* [Internet]. 2013;6(1):91.
115. O'Byrne EM, Steinetz BG. Radioimmunoassay (RIA) of relaxin in sera of various species using an antiserum to porcine relaxin. *Proc Soc Exp Biol Med* [Internet]. 1976;152(2):272–6.

116. Sherwood OD 1994 Relaxin. In: Knobil E, Neill JD, eds. The physiology of reproduction, 2nd ed., vol 1. New York: Raven Press; 861–1009
117. Samuel CS (2005). Relaxin: antifibrotic properties and effects in models of disease. Clin Med Res [Internet]. 3(4):241–9.
118. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. Cell Mol Life Sci [Internet]. 1999;55(4):639–52.
119. Sandberg AA, Woodruff M, Rosenthal H, Nienhouse S, Slaunwhite WR Jr. Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. VII. Half-life in normal and estrogen-treated subjects. J Clin Invest [Internet]. 1964;43:461–6.
120. Misao R, Nakanishi Y, Fujimoto J, Ichigo S, Tamaya T. Expression of sex hormone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin mRNAs in corpus luteum of human subjects. Horm Res [Internet]. 1997;48(4):191–5.
121. Perrakis A, Moolenaar WH. Autotaxin: structure-function and signaling. J Lipid Res [Internet]. 2014;55(6):1010–8.
122. van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH (1989). Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. Cell [Internet]. 59(1):45–54.
123. Waterhouse P, Denhardt DT, Khokha R. Temporal expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in mouse reproductive tissues during gestation. Mol Reprod Dev [Internet]. 1993;35(3):219–26.
124. Abe H, Sakumoto R, Okuda K. Expression of matrix metalloproteinases in bovine luteal cells induced by prostaglandin F<sub>2</sub>α, interferon γ and tumor necrosis factor α. J Reprod Dev [Internet]. 2015;61(4):277–86.

125. Chang S, Young BD, Li S, Qi X, Richardson JA, Olson EN (2006). Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell* [Internet]. 126(2):321–34.
126. Rodriguez JA, Orbe J, Martinez de Lizarrondo S, Calvayrac O, Rodriguez C, Martinez-Gonzalez J, et al. Metalloproteinases and atherothrombosis: MMP-10 mediates vascular remodeling promoted by inflammatory stimuli. *Front Biosci* [Internet]. 2008;13(13):2916–21.
127. Minor M, Alcedo KP, Battaglia RA, Snider NT. Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2019;317(6):C1079–92.
128. Regateiro FS, Cobbold SP, Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments: Immune regulation by CD73 and adenosine. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2013;171(1):1–7.
129. Häusler SFM, Montalbán del Barrio I, Strohschein J, Chandran PA, Engel JB, Hönig A, et al (2011). Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* [Internet].60(10):1405–18.
130. Regateiro FS, Howie D, Nolan KF, Agorogiannis EI, Greaves DR, Cobbold SP, et al. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- $\beta$ . *Eur J Immunol* [Internet]. 2011;41(10):2955–65.
131. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* [Internet]. 2007;204(6):1257–65.
132. Walusimbi SS, Pate JL. Physiology and Endocrinology Symposium: role of immune cells in the corpus luteum. *J Anim Sci* [Internet]. 2013;91(4):1650–9.

133. D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS (2011). Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients* [Internet]. 3(1):63–103.
134. Aten RF, Duarte KM, Behrman HR. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione, and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F2 alpha. *Biol Reprod* [Internet]. 1992;46(3):401–7.
135. Marais AD. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease. *Pathology* [Internet]. 2019;51(2):165–76.
136. Grummer RR, Carroll DJ. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *J Anim Sci* [Internet]. 1988;66(12):3160–73.
137. Zhang T, Dai P, Cheng D, Zhang L, Chen Z, Meng X, et al. Obesity occurring in apolipoprotein E-knockout mice has mild effects on fertility. *J Reprod Fertil* [Internet]. 2014;147(2):141–51.
138. Hwang J, Menon KM. Characterization of low density and high density lipoprotein receptors in the rat corpus luteum and regulation by gonadotropin. *J Biol Chem* [Internet]. 1983;258(13):8020–7.
139. Chang X-L, Liu L, Wang N, Chen Z-J, Zhang C (2017). The function of high-density lipoprotein and low-density lipoprotein in the maintenance of mouse ovarian steroid balance. *Biol Reprod* [Internet]. 97(6):862–72.
140. Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life* [Internet]. 2008;60(12):818–23.
141. van der Schoot P, de Greef WJ. Development of ovarian follicles during lactation in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1986;112(2):247–52.
142. Proud CG. Regulation and roles of elongation factor 2 kinase. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2015;43(3):328–32.

143. Anadol E, Kanca H, Yar AS, Helvacioğlu F, Menevşe S, Calgüner E, et al ( 2014). Prostaglandin F receptor expression in intrauterine tissues of pregnant rats. *J Vet Sci [Internet]*. 15(1):125–31.
144. Lund EG, Kerr TA, Sakai J, Li WP, Russell DW. cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism. *J Biol Chem [Internet]*. 1998;273(51):34316–27.
145. Bagavandoss P. Temporal expression of tenascin-C and type I collagen in response to gonadotropins in the immature rat ovary. *Acta Histochem [Internet]*. 2014;116(7):1125–33.
146. Greiner M, Paredes A, Rey-Ares V, Saller S, Mayerhofer A, Lara HE (2008). Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology [Internet]*. 149(10):4988–96.
147. Wardhana DA, Ikeda K, Barinda AJ, Nugroho DB, Qurania KR, Yagi K, et al. Family with sequence similarity 13, member A modulates adipocyte insulin signaling and preserves systemic metabolic homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2018;115(7):1529–34.
148. Lin X, Liou Y-H, Li Y, Gong L, Li Y, Hao Y, et al. FAM13A represses AMPK activity and regulates hepatic glucose and lipid metabolism. *iScience [Internet]*. 2020;23(3):100928.
149. Azumah R, Liu M, Hummitzsch K, Bastian NA, Hartanti MD, Irving-Rodgers HF, et al. Candidate genes for polycystic ovary syndrome are regulated by TGF $\beta$  in the bovine foetal ovary. *Hum Reprod [Internet]*. 2022;37(6):1244–54.
150. Galvagni F, Nardi F, Maida M, Bernardini G, Vannuccini S, Petraglia F, et al. CD93 and dystroglycan cooperation in human endothelial cell adhesion and migration. *Oncotarget [Internet]*. 2016;7(9):10090–103.

151. Sant AJ (1994). Endogenous antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Res* [Internet]. 13(4):253–67.
152. Benyo DF, Haibel GK, Laufman HB, Pate JL (1991). Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine corpus luteum during the estrous cycle, luteolysis, and early pregnancy. *Biol Reprod* [Internet]. 45(2):229–34.
153. Komatsu K, Manabe N, Kiso M, Shimabe M, Miyamoto H. Soluble Fas (FasB) regulates luteal cell apoptosis during luteolysis in murine ovaries. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2003;65(4):345–52.
154. Gannagé M, Münz C (2009). Autophagy in MHC class II presentation of endogenous antigens. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 335:123–40.
155. Cannon MJ, Pate JL. The role of major histocompatibility complex molecules in luteal function. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2003;1(1):93.
156. Paillisson A, Dadé S, Callebaut I, Bontoux M, Dalbiès-Tran R, Vaiman D, et al. Identification, characterization and metagenome analysis of oocyte-specific genes organized in clusters in the mouse genome. *BMC Genomics* [Internet]. 2005;6(1):76.
157. Suzumori N, Burns KH, Yan W, Matzuk MM. RFPL4 interacts with oocyte proteins of the ubiquitin-proteasome degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003;100(2):550–5.
158. Suzumori N, Yan C, Matzuk MM, Rajkovic A. Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mech Dev* [Internet]. 2002;111(1–2):137–41.
159. Wood MA, Rajkovic A. Genomic markers of ovarian reserve. *Semin Reprod Med* [Internet]. 2013;31(6):399–415.
160. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* [Internet]. 2004;305(5687):1157–9.

161. Wu X-R, Kong X-P, Pellicer A, Kreibich G, Sun T-T (2009). Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney Int* [Internet]. 75(11):1153–65.
162. Carpenter AR, Becknell MB, Ching CB, Cuaresma EJ, Chen X, Hains DS, et al. Uroplakin 1b is critical in urinary tract development and urothelial differentiation and homeostasis. *Kidney Int* [Internet]. 2016;89(3):612–24.
163. Lagenaur C, Kunemund V, Fischer G, Fushiki S, Schachner M. Monoclonal M6 antibody interferes with neurite extension of cultured neurons. *J Neurobiol* [Internet]. 1992;23(1):71–88.
164. Alfonso J, Fernández ME, Cooper B, Flugge G, Frasch AC (1982). The stress-regulated protein M6a is a key modulator for neurite outgrowth and filopodium/spine formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005;102(47):17196–201.
165. Hafez ES, Makabe S. Scanning electron microscopy of nonfunctional human ovaries. *J Reprod Med*. 27(5):271–4.
166. Li L, Diao S, Chen Z, Zhang J, Chen W, Wang T, et al. DNMT3a-mediated methylation of TCF21/hnRNPA1 aggravates hepatic fibrosis by regulating the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Pharmacol Res* [Internet]. 2023;193(106808):106808.
167. Rixon C, Andreassen K, Shen X, Erusappan PM, Almaas VM, Palmero S, et al. Lumican accumulates with fibrillar collagen in fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *ESC Heart Fail* [Internet]. 2023;10(2):858–71.
168. Nie G-Y, Li Y, Minoura H, Batten L, Ooi GT, Findlay JK, et al. A novel serine protease of the mammalian HtrA family is up-regulated in mouse uterus coinciding with placentation. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2003;9(5):279–90.
169. Bowden M, Drummond AE, Salamonsen LA, Findlay JK, Nie G. Evolutionary conservation of mammalian HTRA3 and its developmental regulation in the rat ovary. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* [Internet]. 2009;312(7):701–13.

170. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* [Internet]. 396(6711):580–4.
171. Pallier C, Scaffidi P, Chopineau-Proust S, Agresti A, Nordmann P, Bianchi ME, et al. Association of chromatin proteins high mobility group box (HMGB) 1 and HMGB2 with mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2003;14(8):3414–26.
172. Kazmi RS, Boyce S, Lwaleed BA. Homeostasis of hemostasis: The role of endothelium. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2015;41(6):549–55.
173. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res* [Internet]. 2004;114(5–6):409–14.
174. Hellgren M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2003;29(2):125–30.
175. Morgenstern KA, Sprecher C, Holth L, Foster D, Grant FJ, Ching A, et al. Complementary DNA cloning and kinetic characterization of a novel intracellular serine proteinase inhibitor: mechanism of action with trypsin and factor Xa as model proteinases. *Biochemistry* [Internet]. 1994;33(11):3432–41.
176. Davie EW, Kulman JD. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2006;32 Suppl 1(S 1):3–15.
177. Anastasiou G, Gialeraki A, Merkouri E, Politou M, Travlou A. Thrombomodulin as a regulator of the anticoagulant pathway: implication in the development of thrombosis: Implication in the development of thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* [Internet]. 2012;23(1):1–10.
178. Mayo KH, Roongta V, Ilyina E, Milius R, Barker S, Quinlan C, et al. NMR solution structure of the 32-kDa platelet factor 4 ELR-motif N-terminal chimera: a symmetric tetramer. *Biochemistry* [Internet]. 1995;34(36):11399–409.

179. Kalagara T, Moutsis T, Yang Y, Pappelbaum KI, Farken A, Cladder-Micus L, et al (2018). The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular endothelium. *Blood Adv* [Internet]. 2(18):2347–57.
180. Yang Z, Kong B, Mosser DM, Zhang X. TLRs, macrophages, and NK cells: our understandings of their functions in uterus and ovary. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2011;11(10):1442–50.
181. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2010;2010:1–21.
182. Gadsby JE, Tyson Nipper AM, Faircloth HA, D'Annibale-Tolhurst M, Chang J, Farin PW, et al. Toll-like receptor and related cytokine mRNA expression in bovine corpora lutea during the oestrous cycle and pregnancy. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2017;52(3):495–504.
183. Tang M, Zhao M, Shi Y. New insight into the role of macrophages in ovarian function and ovarian aging. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2023;14:1282658.
184. Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* [Internet]. 1991;88(5):1445–51.
185. Groer MW, El-Badri N, Djeu J, Williams SN, Kane B, Szekeres K. Suppression of natural killer cell cytotoxicity in postpartum women: time course and potential mechanisms: Time course and potential mechanisms. *Biol Res Nurs* [Internet]. 2014;16(3):320–6.
186. Bryceson YT, Long EO. Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2008;20(3):344–52.
187. Germain C, Bihl F, Zahn S, Poupon G, Dumaurier M-J, Rampanarivo HH, et al. Characterization of alternatively spliced transcript variants of CLEC2D gene. *J Biol Chem* [Internet]. 2010;285(46):36207–15.

188. Ouni E, Bouzin C, Dolmans MM, Marbaix E, Pyr Dit Ruys S, Vertommen D, et al (2020). Spatiotemporal changes in mechanical matrix components of the human ovary from prepuberty to menopause. *Hum Reprod* [Internet]. 35(6):1391–410.
189. Shah JS, Sabouni R, Cayton Vaught KC, Owen CM, Albertini DF, Segars JH. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2018;35(7):1135–48.
190. Steiglitz BM, Keene DR, Greenspan DS. PCOLCE2 encodes a functional procollagen C-proteinase enhancer (PCPE2) that is a collagen-binding protein differing in distribution of expression and post-translational modification from the previously described PCPE1. *J Biol Chem* [Internet]. 2002;277(51):49820–30.
191. Lui H, Denbeigh J, Vaquette C, Tran HM, Dietz AB, Cool SM, et al. Fibroblastic differentiation of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) is enhanced by hypoxia in 3D cultures treated with bone morphogenetic protein 6 (BMP6) and growth and differentiation factor 5 (GDF5). *Gene* [Internet]. 2021;788(145662):145662.
192. Liu K, Wahlberg P, Hägglund AC, Ny T. Expression pattern and functional studies of matrix degrading proteases and their inhibitors in the mouse corpus luteum. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2003;205(1–2):131–40.
193. Liu Y-X. Plasminogen activator/plasminogen activator inhibitors in ovarian physiology. *Front Biosci* [Internet]. 2004;9(1–3):3356–73.
194. Liu K, Brändström A, Liu YX, Ny T, Selstam G. Coordinated expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 during corpus luteum formation and luteolysis in the adult pseudopregnant rat. *Endocrinology* [Internet]. 1996;137(5):2126–32.
195. Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* [Internet]. 1996;3(11):895–904.

196. Andreasen PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN (1990). Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 68(1):1–19.
197. Gokce S, Herkiloglu D, Cevik O, Turan V. Evaluation of intrafollicular Syndecan 1, Glypican 3, and spermidine levels in women with diminished ovarian reserve. *Reprod Sci* [Internet]. 2023;30(2):569–75.
198. Kurylo MP, Grandfield K, Marshall GW, Altoe V, Aloni S, Ho SP. Effect of proteoglycans at interfaces as related to location, architecture, and mechanical cues. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2016;63:82–92.
199. Moini A, Hedayatshodeh M, Hosseini R, Rastad H. Association between parity and ovarian reserve in reproductive age women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2016;207:184–7.
200. Meresman G. Relevance of apoptosis in the female reproductive system. *Invest Clin*. 2011;52(3):274–90.
201. Abdo M, Hisheh S, Dharmarajan A. Role of tumor necrosis factor-alpha and the modulating effect of the caspases in rat corpus luteum apoptosis. *Biol Reprod* [Internet]. 2003;68(4):1241–8.
202. Kurusu S, Suzuki K, Taniguchi K, Yonezawa T, Kawaminami M. Structural regression of the rat corpus luteum of pregnancy: relationship with functional regression, apoptotic cell death, and the suckling stimulus. *Zoolog Sci* [Internet]. 2009;26(10):729–34.
203. Li JH, Pober JS. The cathepsin B death pathway contributes to TNF plus IFN-gamma-mediated human endothelial injury. *J Immunol* [Internet]. 2005;175(3):1858–66.

204. Chen C, Ahmad MJ, Ye T, Du C, Zhang X, Liang A, et al (2021). Cathepsin B regulates mice granulosa cells' apoptosis and proliferation in vitro. *Int J Mol Sci* [Internet]. 22(21):11827.
205. Nguyen M, Breckenridge DG, Ducret A, Shore GC. Caspase-resistant BAP31 inhibits fas-mediated apoptotic membrane fragmentation and release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000;20(18):6731–40.
206. Zotti T, Vito P, Stilo R. The seventh ring: exploring TRAF7 functions. *J Cell Physiol* [Internet]. 2012;227(3):1280–4.
207. Yoshida H, Jono H, Kai H, Li J-D. The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 AND TRAF7. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(49):41111–21.
208. Takiguchi S, Sugino N, Esato K, Karube-Harada A, Sakata A, Nakamura Y, et al. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol Reprod* [Internet]. 2004;70(2):313–8.
209. Neilson LM, Zhu J, Xie J, Malabarba MG, Sakamoto K, Wagner K-U, et al. Coactivation of janus tyrosine kinase (Jak)1 positively modulates prolactin-Jak2 signaling in breast cancer: recruitment of ERK and signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and enhancement of Akt and Stat5a/b pathways. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2007;21(9):2218–32.
210. Dif F, Saunier E, Demeneix B, Kelly PA, Edery M. Cytokine-inducible SH2-containing protein suppresses PRL signaling by binding the PRL receptor. *Endocrinology* [Internet]. 2001;142(12):5286–93.
211. Chao C-H, Chen C-M, Cheng P-L, Shih J-W, Tsou A-P, Lee Y-HW. DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional

- regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor. *Cancer Res* [Internet]. 2006;66(13):6579–88.
212. Engeland K (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ* [Internet]. 29(5):946–60.
213. Saadi H, Seillier M, Carrier A (2015). The stress protein TP53INP1 plays a tumor suppressive role by regulating metabolic homeostasis. *Biochimie* [Internet]. 118:44–50.
214. Pereira MM, Mainigi M, Strauss JF. Secretory products of the corpus luteum and preeclampsia. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2021;27(4):651–72.
215. Sawyer HR, Abel JH JR, McClellan MC, Schmitz M, Niswender GD. Secretory granules and progesterone secretion by Ovine corpora lutea in vitro. *Endocrinology* [Internet]. 1979 ;104(2):476–86.
216. Belt WD, Anderson LL, Cavazos LF, Melampy RM. Cytoplasmic granules and relaxin levels in porcine corpora lutea. *Endocrinology* [Internet]. 1971;89(1):1–10.
217. Przygodzka E, Plewes MR, Davis JS. Luteinizing hormone regulation of inter-organelle communication and fate of the corpus luteum. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(18):9972.
218. Busso D, Oñate-Alvarado MJ, Balboa E, Zanlungo S, Moreno RD. Female infertility due to anovulation and defective steroidogenesis in NPC2 deficient mice. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2010;315(1–2):299–307.
219. Meng Y, Heybrock S, Neculai D, Saftig P. Cholesterol handling in lysosomes and beyond. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2020;30(6):452–66.
220. Cahill MA, Medlock AE. Thoughts on interactions between PGRMC1 and diverse attested and potential hydrophobic ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2017;171:11–33.

221. Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* [Internet]. 2011;91(1):119–49.
222. Strappazzon F, Vietri-Rudan M, Campello S, Nazio F, Florenzano F, Fimia GM, et al. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy: AMBRA1/BCL-2 in autophagy. *EMBO J* [Internet]. 2011;30(7):1195–208.
223. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res* [Internet].;20(7):748–62.
224. Gawriluk TR, Ko C, Hong X, Christenson LK, Rucker EB 3rd. Beclin-1 deficiency in the murine ovary results in the reduction of progesterone production to promote preterm labor. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014;111(40):E4194-203.
225. Liu K, Czaja MJ. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death Differ* [Internet]. 2013;20(1):3–11.
226. Gawriluk TR, Hale AN, Flaws JA, Dillon CP, Green DR, Rucker EB 3rd. Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *J Reprod Fertil* [Internet]. 2011;141(6):759–65.
227. Bhardwaj JK, Paliwal A, Saraf P, Sachdeva SN. Role of autophagy in follicular development and maintenance of primordial follicular pool in the ovary. *J Cell Physiol* [Internet]. 2022;237(2):1157–70.
228. Gosden RG, Faddy MJ (1994). Ovarian aging, follicular depletion, and steroidogenesis. *Exp Gerontol* [Internet]. 29(3–4):265–74.
229. Batty SR, Langlais PR. Microtubules in insulin action: what's on the tube? *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2021;32(10):776–89.
230. Ramm G, Larance M, Guilhaus M, James DE. A role for 14-3-3 in insulin-stimulated GLUT4 translocation through its interaction with the RabGAP AS160. *J Biol Chem* [Internet]. 2006;281(39):29174–80.

231. Mîinea CP, Sano H, Kane S, Sano E, Fukuda M, Peränen J, et al. AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem J* [Internet]. 2005;391(Pt 1):87–93.
232. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* [Internet]. 2005;1(1):15–25.
233. Nolan CJ, Proietto J (1994). The feto-placental glucose steal phenomenon is a major cause of maternal metabolic adaptation during late pregnancy in the rat. *Diabetologia* [Internet]. 37(10):976–84.
234. Leturque A, Ferre P, Burnol AF, Kande J, Maulard P, Girard J. Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* [Internet]. 1986;35(2):172–7.
235. Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG, Scaramuzzi RJ. An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous difference methods in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 1997;48(1):9–25.
236. Saddick SY. In vitro regulation of sheep ovarian surface epithelium (OSE) proliferation by local ovarian factors. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2012;19(3):285–90.
237. Zuo Z, Zhou Z, Chang Y, Liu Y, Shen Y, Li Q, et al. Ribonucleotide reductase M2 (RRM2): Regulation, function and targeting strategy in human cancer. *Genes Dis* [Internet]. 2024;11(1):218–33.
238. Kraft C. Mitotic entry: tipping the balance. *Curr Biol* [Internet]. 2003;13(11):R445-6.
239. Schmidt M, Rohe A, Platzer C, Najjar A, Erdmann F, Sippl W. Regulation of G2/M transition by inhibition of WEE1 and PKMYT1 kinases. *Molecules* [Internet]. 2017;22(12).

240. Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U, Duncan PI, Körner R, Nigg EA (2003). Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell* [Internet]. ;5(1):113–25.
241. Sdelci S, Bertran MT, Roig J. Nek9, Nek6, Nek7 and the separation of centrosomes. *Cell Cycle* [Internet]. 2011;10(22):3816–7.
242. Czarna M, Jarmuszkiewicz W. Role of mitochondria in reactive oxygen species generation and removal; relevance to signaling and programmed cell death. *Postepy Biochem.* 2006;52(2):145–56.
243. Chen Y, Gibson SB. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? *Autophagy* [Internet]. 2008;4(2):246–8.
244. Riley JC, Behrman HR. In vivo generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. *Endocrinology* [Internet]. 1991;128(4):1749–53.
245. Pepperell JR, Porterfield DM, Keefe DL, Behrman HR, Smith PJS. Control of ascorbic acid efflux in rat luteal cells: role of intracellular calcium and oxygen radicals. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2003;285(3):C642-51.
246. Quan Y, Xin Y, Tian G, Zhou J, Liu X. Mitochondrial ROS-modulated mtDNA: A potential target for cardiac aging. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2020;2020:9423593.
247. Ismail A, Leroux V, Smadja M, Gonzalez L, Lombard M, Pierrel F, et al. Coenzyme Q biosynthesis: Evidence for a substrate access channel in the FAD-dependent monooxygenase Coq6. *PLoS Comput Biol* [Internet]. 2016;12(1):e1004690.
248. Manicki M, Aydin H, Abriata LA, Overmyer KA, Guerra RM, Coon JJ, et al. Structure and functionality of a multimeric human COQ7:COQ9 complex. *Mol Cell* [Internet]. 2022;82(22):4307-4323.e10.
249. Maroko PR, Libby P, Braunwald E. Effect of pharmacologic agents on the function of the ischemic heart. *Am J Cardiol* [Internet]. 1973;32(7):930–6.

250. Bentinger M, Tekle M, Dallner G (2010). Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 396(1):74–9.
251. Antonenkov VD, Isomursu A, Mennerich D, Vapola MH, Weiher H, Kietzmann T, et al. The human mitochondrial DNA depletion syndrome gene MPV17 encodes a non-selective channel that modulates membrane potential. *J Biol Chem* [Internet]. 2015;290(22):13840–61.
252. Dalla Rosa I, Cámara Y, Durigon R, Moss CF, Vidoni S, Akman G, et al. MPV17 loss causes deoxynucleotide insufficiency and slow DNA replication in mitochondria. *PLoS Genet* [Internet]. 2016;12(1):e1005779.
253. Sinha D, Joshi N, Chittoor B, Samji P, D'Silva P. Role of Magmas in protein transport and human mitochondria biogenesis. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2010;19(7):1248–62.
254. Srivastava S, Sinha D, Saha PP, Marthala H, D'Silva P. Magmas functions as a ROS regulator and provides cytoprotection against oxidative stress-mediated damages. *Cell Death Dis* [Internet]. 2014;5(8):e1394.
255. Stroud DA, Surgenor EE, Formosa LE, Reljic B, Frazier AE, Dibley MG, et al. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature* [Internet]. 2016;538(7623):123–6.
256. Zhang Z, Miao G, Lu L, Yin H, Wang Y, Wang B, et al. Crucial physicochemical factors mediating mitochondrial toxicity of nanoparticles at noncytotoxic concentration. *Sci Total Environ* [Internet]. 2023;908(168211):168211.
257. Wotton D, Lo RS, Lee S, Massagué J. A Smad transcriptional corepressor. *Cell* [Internet]. 1999;97(1):29–39.
258. Pangas SA. Bone morphogenetic protein signaling transcription factor (SMAD) function in granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2012;356(1–2):40–7.

259. Joshi S, Davies H, Sims LP, Levy SE, Dean J (2007). Ovarian gene expression in the absence of FIGLA, an oocyte-specific transcription factor. *BMC Dev Biol* [Internet]. 7(1):67.
260. McMahon HE, Hashimoto O, Mellon PL, Shimasaki S. Oocyte-specific overexpression of mouse bone morphogenetic protein-15 leads to accelerated folliculogenesis and an early onset of acyclicity in transgenic mice. *Endocrinology* [Internet]. 2008;149(6):2807–15.
261. Zhao H, Chen Z-J, Qin Y, Shi Y, Wang S, Choi Y, et al. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2008;82(6):1342–8.
262. Faddy MJ, Gosden RG. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod* [Internet]. 1996;11(7):1484–6.
263. Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-müllerian hormone and ovarian reserve: Update on assessing ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2020;105(11):3361–73.
264. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011;11(11):761–74.
265. Johnson DS, Chen YH. Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2012;12(4):458–63.
266. Fan H-Y, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, et al (2009). MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* [Internet]. 324(5929):938–41.