



Universidad Autónoma de Tlaxcala

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas**

Efecto del hipotiroidismo sobre la organización
funcional del epitelio oviductal en la coneja

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Maribel Méndez Tepepa

Directora de Tesis:

Dra. Estela Cuevas Romero

Tlaxcala, Tlax.

Agosto 2015



Universidad Autónoma de Tlaxcala

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas**

Efecto del hipotiroidismo sobre la organización
funcional del epitelio oviductal en la coneja

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Maribel Méndez Tepepa

Comité tutorial:

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Dr. Francisco Castelán

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio

Tlaxcala, Tlax.

Agosto 2015

Esta tesis fue realizada bajo la dirección de la Dra. Estela Cuevas Romero en el laboratorio de Endocrinología del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Para el desarrollo de este proyecto se contó con el financiamiento de CONACyT (367041-AA y 106226-EC).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Reforma Curricular 2012



Universidad de la Autorrealización

Financiamiento

Universidad Autónoma de Tlaxcala (Proyecto CACyPI-UATx-2013) y CONACyT (367041-AA y 106226-EC)



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que Maribel Méndez Tepepa realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: "Efecto del hipotiroidismo sobre la organización funcional del epitelio oviductal en la coneja".

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 15 DE 2015


DR. PABLO PACHECO CABRERA


DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO


DR. FRANCISCO CASTELAN


DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO


DRA. ROSA ANGÉLICA LUCIO LUCIO

Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis a las personas más importantes de mi vida:
Mi madre, padre, hermana y abuelos.

Por su puesto mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de la presente tesis:

Dra. Estela Cuevas Romero, gracias por su dirección, paciencia, orientación y valiosos consejos durante el seguimiento y la supervisión continua en la presente investigación, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido.

Dr. Pablo Pacheco Cabrera, Dr. Francisco Castelán, Dra. Leticia Nicolás Toledo y Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio gracias por su tutoría, comentarios, correcciones y sugerencias para el mejoramiento de la presente tesis.

Compañeros de laboratorio: Marlenne, Arely, Julia, Adriana, Patricia, Cristhian, Yadira y Arturo gracias por su apoyo, convivencias y sobre todo por sus ánimos.

Amigos: Gabriela, Yulemy, Kenia, Nohemi, Pamela, Zayas, Rodrigo, José Luis, Pablo y Edith. Por sus valiosos consejos, momentos divertidos y risas. Gracias por su amistad ¡los quiero!

Al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta gracias por permitirme formar parte del posgrado y por el apoyo para la realización de la presente tesis. ¡Gracias!

RESUMEN

El epitelio oviductal participa en la secreción de moléculas, formación de moco, protección y transporte de gametos, fertilización y desarrollo del embrión. La disminución en la concentración de hormonas tiroideas, conocida como hipotiroidismo, aumenta la longitud de las células epiteliales (ciliadas y secretoras) de manera diferencial entre las regiones del oviducto, sin afectar la proliferación celular. Este aumento en el tamaño celular podría estar relacionado con cambios en la función de las células epiteliales, por ejemplo su metabolismo y/o secreción. El epitelio oviductal produce y secreta mucopolisacáridos y mucinas, ayudan con el transporte de gametos y señalización durante la fertilización. El epitelio contiene receptores de farnesoides (FXR α), que participan en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, por ello en el presente estudio quisimos evaluar el impacto del hipotiroidismo sobre el contenido de mucopolisacáridos, sulfomucinas, sialomucinas y la inmunoreactividad del receptor de farnesoides (FXR α) en el epitelio del oviducto en la coneja. Para ello se utilizaron conejas controles e hipotiroideas. Se les indujo el hipotiroidismo con el fármaco anti-tiroideo metimazol (10 mg/kg) administrado en agua potable durante treinta días. Para el análisis histológico del epitelio, se extrajeron los oviductos y se procesaron con las técnicas ácido peryódico de Schiff (mucopolisacáridos), azul-alcian pH 1 (sulfomucinas) y pH 2.5 (sialomucinas) e inmunohistoquímica anti-FXR α . Encontramos que el hipotiroidismo modificó el contenido de los mucopolisacáridos, sulfomucinas y sialomucinas en las células epiteliales de manera diferencial entre las regiones oviductales. El contenido de mucopolisacáridos se modificó en todas las regiones del oviducto. Se aumentó el contenido de sulfomucinas en fimbria-infundíbulo, pero en istmo y útero-tubal disminuyó. Las sialomucinas también disminuyeron en fimbria-infundíbulo, pero en istmo y útero-tubal aumentaron. Mientras que la inmunoreactividad del FXR α solo fue afectada en la región útero-tubal. Posiblemente, los cambios en el contenido de estas moléculas y en la presencia de FXR α podrían estar relacionados con el aumento en el tamaño celular descrito previamente.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Infertilidad femenina	1
1.2.1. Generalidades de las hormonas tiroideas	1
1.2.2. Hipotiroidismo y tracto reproductivo de la hembra	3
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Generalidades del oviducto	7
2.1.1 Importancia del epitelio en los procesos reproductivos del oviducto	9
2.2 Receptor de farnesoides y hormonas tiroideas: implicaciones en la reproducción	12
2.1.7 Hipotiroidismo y daño epitelial	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	16
6. METODOLOGÍA	17
7. RESULTADOS	21
7.1 Contenido de mucopolisacáridos en el epitelio del oviducto	21
7.2 Contenido de sulfomucinas en el epitelio del oviducto	21
7.1.3 Contenido de sialomucinas en epitelio del oviducto	26
7.1.4 Inmunoreactividad del FXRα en el epitelio del oviducto	26
8. DISCUSIÓN	31
8.1 Contenido de mucopolisacáridos en el epitelio oviductal	31
8.2 Contenido de sulfomucinas dentro del epitelio oviductal	32
8.3 Contenido de sialomucinas dentro del epitelio	32
8.4 Hipotiroidismo y contenido de mucopolisacáridos y mucinas en el epitelio oviductal ...	33
8.5 Expresión del FXRα en el epitelio del oviducto	35
9. CONCLUSIONES	38
10. MODELO	39
11. PERSPECTIVAS	41
12. REFERENCIAS	43
12. GLOSARIO DE TÉRMINOS	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infertilidad femenina

La infertilidad femenina se define como la incapacidad de concebir un embarazo después de un año teniendo relaciones sexuales regulares. Es un problema de salud común que afecta al 12-18% de las mujeres entre 15 y 34 años de edad (Thoma y cols. 2013). Entre los factores que conllevan a la infertilidad femenina se encuentran: disfunciones ovulatorias, daños a las trompas de Falopio, endometriosis¹ y alteraciones al moco cervical. Sin embargo, las causas que conducen a la infertilidad femenina no son claras aun (Lindsay y Vitrikas 2015). Debido al interés del presente estudio, solo abundaremos en la información relacionada con las trompas de Falopio.

La infertilidad relacionada con las trompas de Falopio provoca cambios sutiles en la histología del oviducto. Las mujeres que fuman tabaco tienen mayor riesgo de padecer un embarazo ectópico. La nicotina² provoca la proliferación³ y muerte celular, aumenta la proporción de células ciliadas y secretoras, disminuye el flujo sanguíneo y la renovación de las células epiteliales, afectando así la motilidad tubárica. Mientras que infecciones patológicas por *Chlamydia trachomatis*, gonorrea y salpingitis provocan la ruptura y destrucción de las células epiteliales, descamación del epitelio, pérdida de microvellosidades en las células secretoras, acortamiento de los cilios, aumento de los macrófagos y linfocitos, así como edema del tejido conectivo debido a un mayor contenido de proteoglicanos⁴ y colágeno (Horne y cols. 2014). A pesar de ello, los factores que regulan y mantienen el microambiente normal en las trompas de Falopio son aún desconocidos.

1.2.1. Generalidades de las hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas, triyodotironina (T3) y tetrayodotironina (T4), son secretadas por las células epiteliales foliculares o tirocitos que conforman a la glándula tiroidea (Figura

¹ Ver glosario.

² Ver glosario.

³ Ver glosario.

⁴ Ver glosario.

1A). Ésta se ubica cerca de la tráquea justo por debajo del cartílago tiroideo, se constituye por dos lóbulos unidos por un istmo tiroideo donde hay gran irrigación sanguínea y linfática. Los tirocitos están revestidos por una pared capilar y epitelio cúbico simple que encierran al coloide y que contienen a las hormonas tiroideas. Durante la síntesis de hormonas, los tirocitos realizan funciones especializadas, tales como captar el yoduro mediante transportadores de yodo soluble, transportarlo desde la membrana basal hacia la membrana apical de la célula mediante el transportador Na^+/I^- , donde el yoduro sale al coloide por la proteína pendrina localizada en la membrana apical del tirocito. Consecuentemente se produce la oxidación del yodo (debido al peróxido de hidrógeno) por acción del enzima específica denominada tiroperoxidasa (TPO), así el yoduro se incorpora a la tiroglobulina mediante la TPO para producir yodotirosinas, monoyodotirosinas y diyodotirosinas, moléculas que forman a las hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas, una vez sintetizadas y para que realicen su mecanismo de acción, son transportadas al torrente sanguíneo por proteínas como la globulina fijadora de tiroxina, transtiterina y albúmina (Bizhanova y Kopp 2009). La homeostasis⁵ de las hormonas tiroideas ocurre mediante el mecanismo de retroalimentación del hipotálamo-adenohipófisis-tiroides. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), que estimula la síntesis y secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en la adenohipófisis. La TSH a su vez estimula a la glándula tiroides para que sintetice a las hormonas tiroideas; T4 y T3 (ver Figura 1B; Abalovich y cols. 2007).

Las hormonas tiroideas son sintetizadas y metabolizadas con ayuda de las enzimas desyodasas. La desyodasa tipo 1 (D1) se expresa en el hígado, endometrio y riñón; la D2 en el tejido adiposo, placenta, sistema nervioso central y endometrio⁶; y la D3 que es expresada en la placenta, sistema nervioso central y endometrio. Estas enzimas forman a las hormonas tiroideas mediante dos vías: la D1 y D2 eliminan un ion yoduro de la posición 5' del anillo fenólico de la molécula T4 para formar T3 y la otra vía conocida como T3 reversa o T3 inactiva, donde la D3 cataliza un ion yoduro de la posición 3 del anillo tirosil generando diyodotirosina a partir de la T3. Por su parte la T4 se convierte en la hormona activa T3, por monodesyodación del enzima específica D3. Por lo que, las reacciones básicas de las

⁵ Ver glosario.

⁶ Ver glosario.

desyodasas en la formación de las hormonas tiroideas es muy importante, debido a que la reproducción también se ve afectada cuando los niveles de T3 son bajos, y la D2 es la enzima que genera mayores niveles de T3 (Bianco y Kim 2006; ver Figura 1C).

En la célula, el mecanismo de acción de las hormonas tiroideas depende principalmente de la unión a sus ligandos nucleares específicos (receptores de hormonas tiroideas, TRs). Dichas hormonas actúan principalmente a través de sus receptores nucleares TR α y TR β que se expresan diferencialmente en los tejidos. Las hormonas tiroideas son introducidas a la célula por acción de sus transportadores (monocarboxilato, proteínas transportadoras de aniones orgánicos y la proteína G), para posteriormente unirse a sus TRs. Los TRs unidos como heterodímeros al receptor del ácido retinoico (RXR), activan un fragmento de DNA donde se inicia la transcripción o bloqueo de un gen. Este mecanismo es conocido como activación del elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) presente en algunos genes (Pascual y Aranda 2012; ver Figura 2).

1.2.2. Hipotiroidismo y tracto reproductivo de la hembra

Los trastornos tiroideos son más comunes y afectan frecuente a mujeres que a hombres de todo el mundo. El déficit de las hormonas tiroideas es conocido como hipotiroidismo. El hipotiroidismo clínico se caracteriza por presentar valores disminuidos de T4 libre (<0.7 ng/dL) y concentraciones elevadas de TSH (> 4.6 μ U/ml) (Priya y cols. 2015). Las manifestaciones clínicas de personas hipotiroideas son diversas afectando al sistema cardiovascular, muscular, piel, órganos metabólicos, etc. El hipotiroidismo prevalece en aproximadamente del 4% al 8.5% de la población en general siendo mayor en personas que tienen problemas de infertilidad (Abalovich y cols. 2007). Además, dado que se ha evidenciado la presencia de los TRs (TR α , TR β y TSHR) en ovario, oviducto, útero y vagina de diversos mamíferos como la mujer, rata, vaca, mono y coneja (Aghajanova y cols. 2009; Hulchiy y cols. 2012; Rodríguez-Castelán y cols., en proceso), se ha sugerido un efecto directo de las hormonas tiroideas y TSH sobre los tejidos reproductivos.

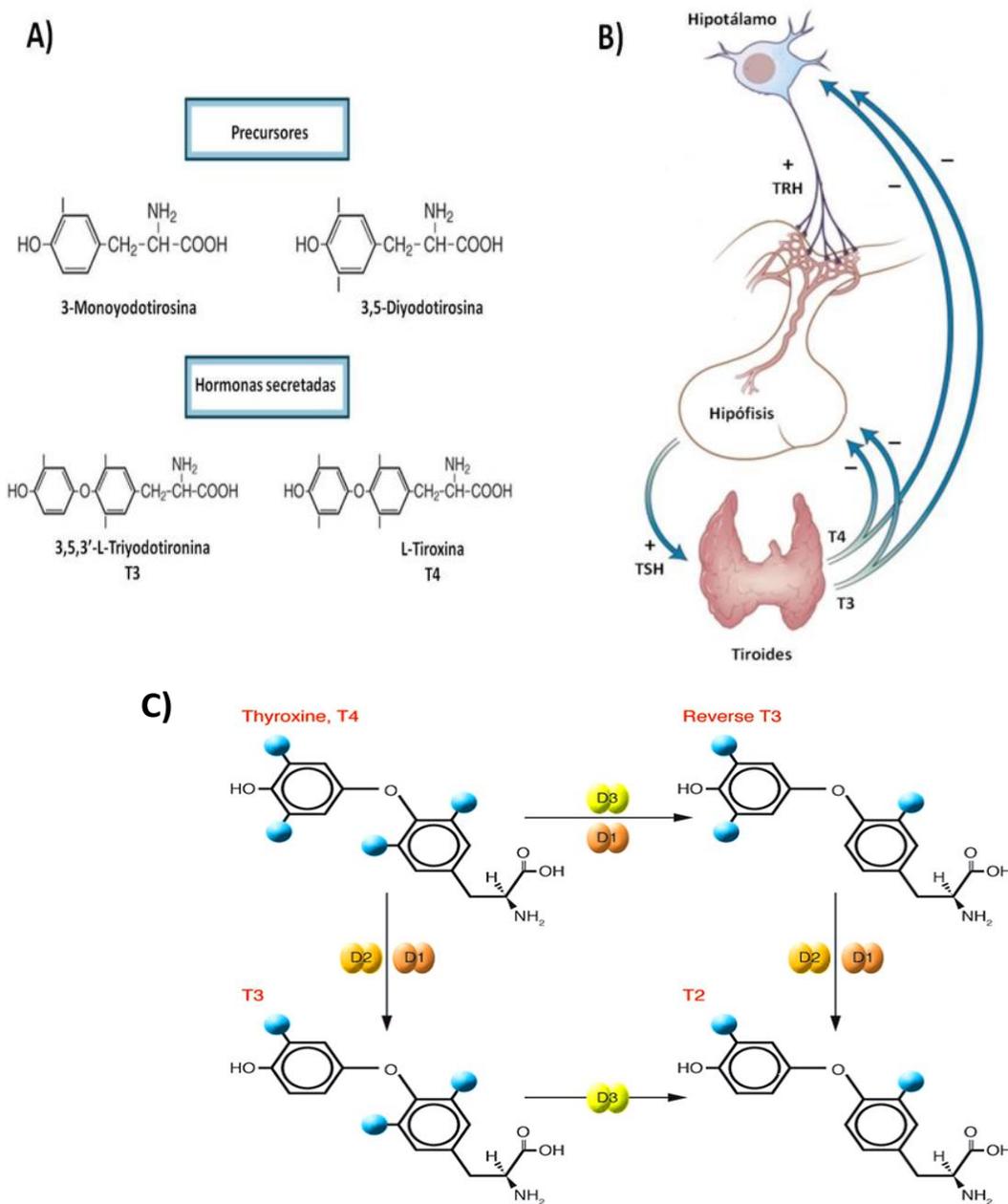


Figura 1. A) Fórmula química de las hormonas tiroideas (modificada de Bianco y Kim 2006). B) Mecanismo de retroalimentación de síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (modificado de Bassett y Williams 2008). C) Reacciones básicas de las desyodasas para formar las hormonas tiroideas. Las reacciones son catalizadas por las desyodasas que eliminan restos de yodo (esferas azules) de los anillos fenólicos (anillos exteriores) o tirosil (anillos interiores) de las yodotirosinas. Estas vías pueden activar la T4 mediante su transformación en T3 (a través de D1 o D2) o evitar que se active mediante su conversión a la forma metabólicamente inactiva o T3 reversa (a través de D1 y D3). La T2 es un producto inactivo común a las dos vías que se metaboliza rápidamente por desyodación adicional (Bianco y Kim 2006).

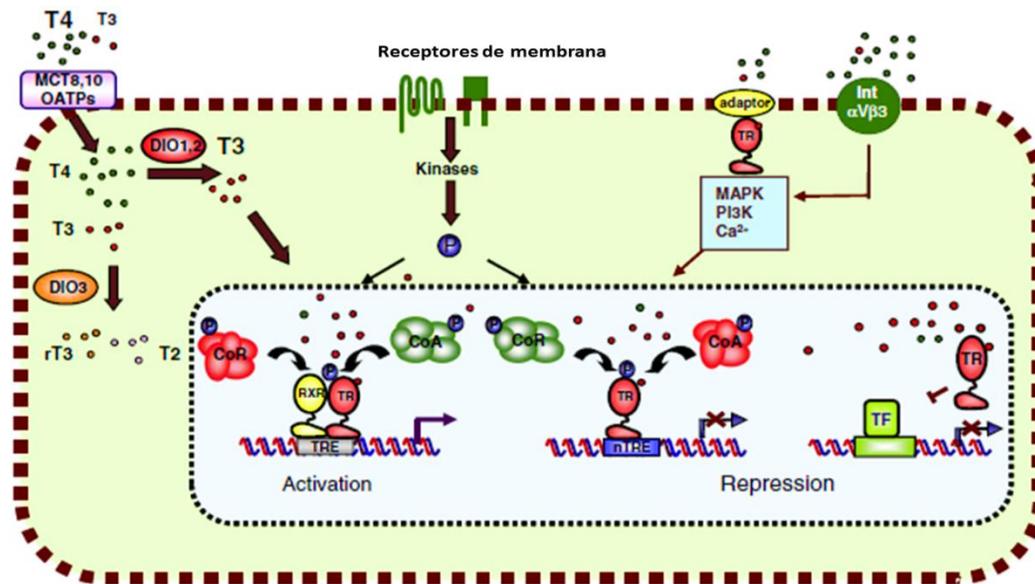


Figura 2. Mecanismo de acción de los receptores de hormonas tiroideas. La T3 y T4 entran a la célula a través de las proteínas transportadoras (monocarboxilato, OATs, integrinas y proteína G). Dentro de las células, las D1 y D2 convierten la T4 a la forma principal de la hormona tiroidea, T3. Esta se une a sus TRs que activan la transcripción mediante la unión con el ácido retinoico (RXR) y finalmente se activa el TRE situado en las regiones reguladoras de los genes objetivos. Esta actividad se rige por un intercambio de co-represor y co-activador para que se inicie de la transcripción del gen (modificada de Pascual y Aranda 2012).

El hipotiroidismo es la principal enfermedad asociada con alteraciones en la glándula tiroidea que afecta la reproducción femenina causando trastornos menstruales irregulares (oligomenorrea⁷, menorragia⁸ y polimenorrea⁹), disminución de la libido, falta de la ovulación, abortos espontáneos y nacimientos prematuros que condicionan incluso a la infertilidad femenina. El hipotiroidismo eleva los niveles de las hormonas prolactina, y disminuye a las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), asociadas con las disfunciones ovulatorias (Abalovich y cols. 2007). En modelos animales, el hipotiroidismo inducido, tanto por tiroidectomía (extracción de la glándula tiroidea) o por fármacos (con metimazol¹⁰ o propiltiouracilo), afecta las características histológicas y funcionales del tracto reproductivo. Así, el hipotiroidismo reduce el peso del útero (Inuwa y Williams 1996), inhibe las contracciones rítmicas uterinas mediante la reducción de Ca^{2+} en el miometrio (Parija y cols. 2006), provoca ciclos estrales irregulares, atrofia del ovario (Vriend y cols. 1987), así

⁷ Ver glosario.

⁸ Ver glosario.

⁹ Ver glosario.

¹⁰ Ver glosario.

como un mayor número de folículos atrésicos (Dijkstra y cols. 1996) y disminuye la FSH y LH en la rata (Ruiz y cols. 1989). En la coneja, el hipotiroidismo aumenta el tamaño de las células epiteliales, sin afectar la proliferación (Anaya-Hernández y cols. 2014) y disminuye la proporción de células inmunitarias en las diferentes regiones del oviducto (Rodríguez-Castelán en proceso).

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del oviducto

En los mamíferos, los oviductos son los órganos esenciales para el éxito de la reproducción, pues es ahí suceden los eventos más importantes para el establecimiento de un embarazo. Dichos eventos incluyen la protección y transporte de los gametos femeninos y masculinos, la fertilización y el desarrollo del embrión (Coy y cols. 2012).

En la coneja, la pared del oviducto está formada por tres capas de tejido: la externa o serosa que consta de tejido conectivo altamente irrigado; la intermedia o muscular que consta de capas de músculo liso orientado longitudinal y circularmente; y la capa mucosa o epitelial formada por dos tipos de células epiteliales (ciliadas y secretoras) que se encuentran entremezcladas, aunque existe cierta predominancia de uno u otro tipo. Por su parte, la capa de la submucosa está compuesta por tejido conectivo donde se proporciona los nutrientes a través de los vasos sanguíneos, así como la inervación al epitelio. Mientras que la capa muscular participa en el transporte de gametos y embriones. En efecto cada segmento del oviducto es diferente y representa un microambiente específico que favorece la capacitación de los espermatozoides y la fertilización del óvulo, además de condicionar el sustrato para el desarrollo embrionario en sus primeras etapas (Coy y cols. 2012).

De acuerdo con sus características histológicas, el oviducto de la coneja está formado por cinco regiones: fimbria, infundíbulo, ámpula, istmo y útero-tubal (Pedrero-Badillo y cols. 2013; Figuras 3 y 4). La fimbria está formada por pliegues de epitelio, no presenta capa muscular y ayuda en la captura del óvulo liberado por el ovario. El infundíbulo corresponde a la región que se encuentra cercana al ovario y se caracteriza porque la mucosa presenta pliegues largos de células principalmente ciliadas. El ámpula comprende aproximadamente la otra mitad del oviducto, es la porción más larga que contiene invaginaciones o pliegues de tejido epitelial y una capa muscular delgada orientada circularmente, aquí ocurre principalmente la fertilización. El istmo corresponde a la siguiente región, comprende casi la mitad de la longitud del oviducto, tiene una capa muscular gruesa orientada longitudinal y circularmente. En esta región se lleva a cabo el almacenamiento y capacitación de los espermatozoides. Finalmente la región útero-tubal es la porción más cercana al útero, ahí se

forma la capa muscular del oviducto, que proporciona una barrera para los microorganismos infecciosos que provienen del útero, también selecciona el paso de los espermatozoides y regula su movimiento desde el útero hacia el oviducto (Suarez 2008). En las regiones de fimbria-infundíbulo predominan las células ciliadas, en el ámpula hay más células ciliadas que secretoras, mientras que en istmo y útero tubal son más frecuentes las células secretoras (Pedrero-Badillo y cols. 2013; Figuras 3 y 4).

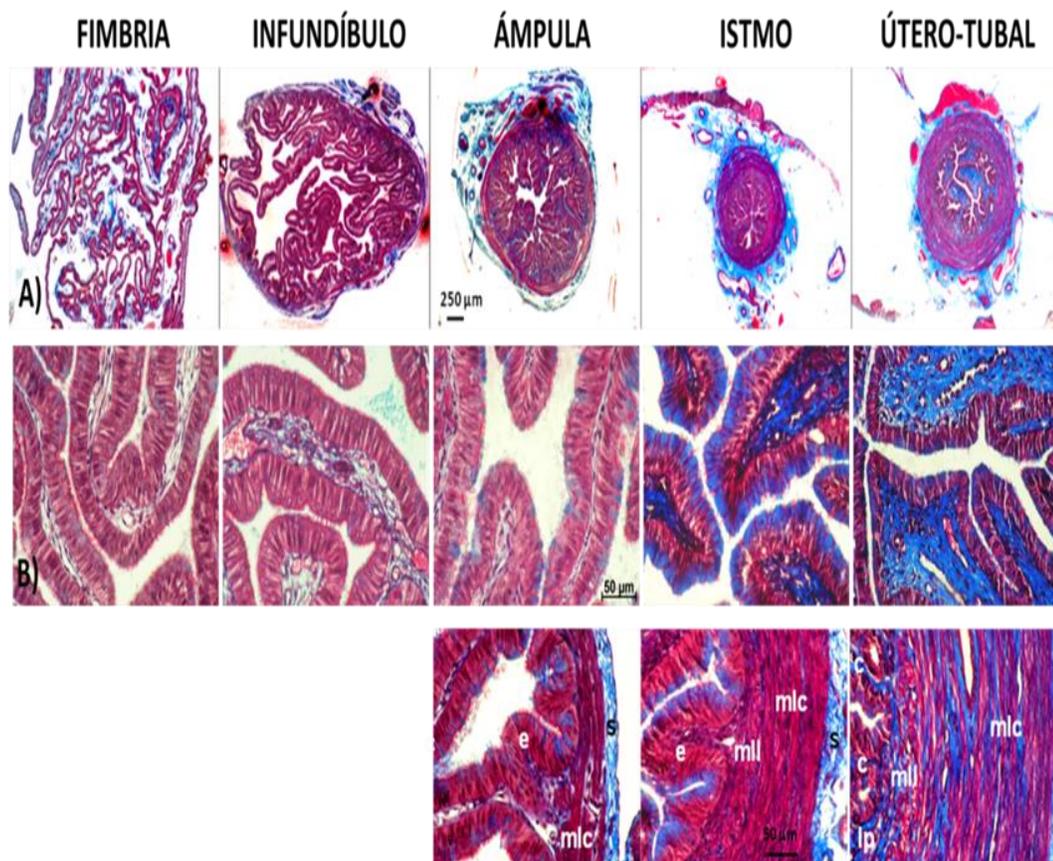


Figura 3. Histología del oviducto de la coneja adulta nulípara. **A)** Cortes transversales de diferentes regiones del oviducto de la coneja adulta nulípara teñidos con Tricrómica de Masson (7 μm). **B)** Imágenes ampliadas que muestran el epitelio (e) de las regiones ámpula, istmo y útero-tubal, e) epitelio, lámina propia (lp), la serosa (s), las criptas (c), el músculo liso con orientación circular (mlc) y longitudinal (mll) de las regiones ámpula, istmo y útero-tubal.

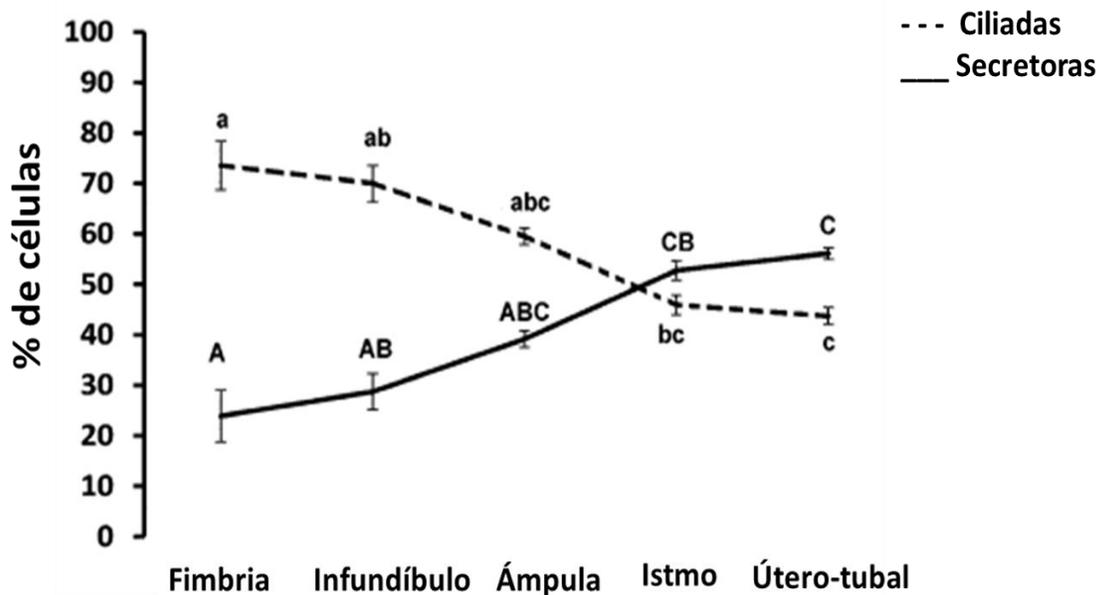


Figura 4. Proporción de células ciliadas (línea continua) y secretoras (línea discontinua) en fimbria, infundíbulo, ámpula, istmo y útero-tubal. La gráfica muestra un mayor contenido de células ciliadas en fimbria-infundíbulo, en la región del ámpula hay más células ciliadas que secretoras, mientras que en istmo y útero-tubal las células secretoras son las que predominan (modificado de Pedrero-Badillo y cols. 2013).

2.1.1 Importancia del epitelio en los procesos reproductivos del oviducto

En los oviductos, el transporte de los gametos y embriones se debe a la secreción de las células secretoras que proporcionan el medio de transporte y los nutrientes necesarios para la sobrevivencia de los gametos. Los cilios de las células epiteliales que proporcionan el empuje de los gametos en la dirección requerida y las células musculares facilitan su movimiento al permitir la contracción del músculo liso (Suarez 2008). Las funciones reproductivas del oviducto pueden resumirse así. Una masa de *cumulus oophorus* (células que rodean al ovocito) es capturada por la fimbria y transportada lentamente por los cilios hacia el infundíbulo. Las células ciliadas del infundíbulo inducen una corriente de fluido mayor para el transporte del *cumulus*. Los ovocitos llegan al ámpula y son inmediatamente unidos al epitelio por un periodo de tiempo variable. El ámpula ofrece un ambiente adecuado y secretor para que ocurra la fertilización en 1.5 h aproximadamente. Para esto, en el istmo se almacenan y capacitan los espermatozoides específicamente en el epitelio y criptas ístmicas (Suárez 2008). La capacitación es el proceso mediante el cual los espermatozoides

tienen modificaciones bioquímicas y funcionales para poder fecundar al ovocito. Los hidratos de carbono secretados por el oviducto (fucosa, manosa y galactosa) unen al espermatozoide al epitelio para su capacitación que les permite tener mejor movimiento del flagelo, para moverse a través de la mucosa girando hacia el ovocito con bateos simétricos y en respuesta a factores quimiotácticos para finalmente penetrar la zona pelúcida del ovocito (Suarez 2008). Esto ocurre cuando el espermatozoide llega al ámpula y se unen al óvulo, entonces enzimas (hialuronidasa y hexosaminidasas) secretadas por el oviducto y unidas al espermatozoide degradan las células del ovocito para su posterior fertilización. Finalmente, el embrión entra a la cavidad uterina de la coneja aproximadamente a los 4 días después de ser fertilizado (Gabrielli y cols. 2004).

Se han hecho estudios *in vitro* sobre los componentes bioquímicos de las secreciones del oviducto en diversas especies mamíferas como: ratón, coneja, bovino e incluso en humano. Durante los procesos reproductivos, el oviducto secreta varias moléculas, tales como lípidos, carbohidratos, proteínas, mucinas, estrógenos, prostaglandinas, factores de crecimiento, glicoproteínas, glucopolisacáridos, enzimas y citoquinas¹¹, inmunoglobulinas, aminoácidos, iones y catecolaminas. En los mamíferos, los carbohidratos y los lípidos son importantes biomoléculas energéticas que facilitan la interacción del espermatozoide con el epitelio, nutrición, protección de ovocitos y embriones en el oviducto (Gabrielli y cols. 2004).

Fuente de energía para las células ciliadas, gametos y embriones. Los mucopolisacáridos forman una cubierta de nutrientes que permite la implantación del embrión en el útero (Gabrielli y cols. 2004). El lactato y piruvato son sustratos de energía importantes para el desarrollo del blastocisto. Particularmente, la glucosa proporciona la energía para el movimiento de los cilios (Hugentobler y cols. 2008). Los β -galactósidos o glucósidos brindan energía para la formación del blastocisto y zona pelúcida del ovocito (Nancarrow y Hill 1995). Por su parte, la síntesis de glucógeno y colesterol es importante para el crecimiento de los cilios. Las células ciliadas presentan grandes gotas de lípidos y rosetas de glucógeno que utilizan como energía durante el transporte ciliar (Lindenbaum y cols. 1983). El glicerol es utilizado para el movimiento del flagelo del espermatozoide, maduración de los ovocitos y desarrollo del embrión. También los ácidos grasos libres,

¹¹ Ver glosario.

triglicéridos y colesterol son utilizados por los cilios para producir energía durante el transporte ciliar (Henault y Killian 1993).

Medio de transporte y guiado de gametos. Los carbohidratos tipo mucina como la MUC1 proporcionan lubricación, evitan la deshidratación del epitelio y permiten que el embrión no se implante en el oviducto (Brayman y cols. 2004). Las mucinas también orientan a los espermatozoides hacia los pliegues del epitelio (Mullins y Saacke 1989). Se sabe que la Muc4 participa en el desarrollo de los gametos (Idris y Carraway 1999).

Capacitación y fertilización. La lactosamina sialilada, un polisacárido secretado por el istmo, une al espermatozoide con las células epiteliales del oviducto (Kadirvel y cols. 2012). La alfa-L-fucosa, que se encuentra en las células ciliadas y secretoras del ampulla e istmo, se asocia con el espermatozoide y ovocito favoreciendo la capacitación y fertilización (Coy y cols. 2012). En la mujer, las MUC1 y MUC9 (oviductina) se unen a gametos y embriones durante la fertilización (Brayman y cols. 2004; Lapensée y cols. 1997). La galactosa se asocia con algunas glicoproteínas y forman el moco que condiciona un ambiente menos ácido importante para que ocurra la fertilización (Nancarrow y Hill 1995).

Protección contra proteólisis o macrófagos. En el oviducto, el sistema inmune es capaz de iniciar una respuesta contra patógenos, al mismo tiempo que debe proteger a gametos y embriones. Los macrófagos fagocitan a los espermatozoides muertos, espermatozoides innecesarios y residuos seminales del tracto reproductivo. Los oligosacáridos de la zona pelúcida reconocen a las células natural Killer¹² para proteger al ovocito, pues son capaces de reconocer a las células propias y destruir a las anómalas (Clark y cols. 1996). Mientras que moléculas efectoras de la inmunidad innata (defensinas y lactoferrinas) producidas por los leucocitos y las células epiteliales, protegen a los espermatozoides y embriones evitando su degradación. Debido a que en el fluido oviductal la presencia de enzimas como las glicosidasas, hexosaminidasas, β -D-galactosidasas, β -galactosilo y fucosidasas, actúan sobre los hidratos de carbono necesarios para unir al espermatozoide con el epitelio o el ovocito, hidrolizan la zona pelúcida¹³ y permiten la expansión y mucificación del *cumulus*. Pero también estas enzimas pueden provocar la proteólisis de los gametos y embriones (Coy y cols. 2012). Sin embargo, los oligosacáridos tipo O-ligados rodean a la zona pelúcida del

¹² Ver glosario.

¹³ Ver glosario.

ovocito, los protegen contra la degradación enzimática y permiten el reconocimiento de los espermatozoides. Moléculas como los glicoconjugados, glicosaminoglicanos sulfatados y ácido siálico-galactosa protegen al óvulo rodeándolo de una mucosa protectora durante la fertilización (Gabrielli y cols. 2004). También las mucinas evitan la proteólisis¹⁴ al unirse a los gametos, por ejemplo la MUC1 y la MUC9 asociadas con la protección del embrión (Brayman y cols. 2004; Lapensée y cols. 1997).

Como podemos ver los carbohidratos y lípidos son biomoléculas importantes que además de participar en los procesos reproductivos, también forman parte de las secreciones del epitelio. Sin embargo, otros componentes de la secreción también son indispensables. Pues el moco está constituido por más de 100 compuestos diferentes, principalmente agua (97%) y sólidos, como proteínas, iones, lípidos, carbohidratos y mucinas. Estas moléculas condicionan las propiedades viscoelásticas formando la consistencia de un gel o moco en el oviducto. En la coneja, el contenido de agua ingresa por canales de acuaporina es mayor dentro de la mucosa después de la ovulación. Las mucinas son almacenadas en forma de gránulos o localizadas en la membrana plasmática de las células epiteliales (Strous y cols.1992), y la glucosa que entra a la célula a través de los transportadores de glucosa (GLUTs) presentes en la membrana apical y basal de la célula, es indispensable para la formación de los polisacáridos (Lindenbaum y cols. 1983).

2.2 Receptor de farnesoides y hormonas tiroideas: implicaciones en la reproducción

El receptor farnesoide X (FXR α o NR1H4) parece tener una participación relevante directa o indirectamente en la reproducción, tanto en el macho como en la hembra (Anaya-Hernández y cols. 2014; Cuevas y cols. 2015). En los mamíferos, incluyendo el humano, se expresan dos genes FXR α (NR1H4) y FXR β (NR1H5). Nosotros nos enfocamos en el análisis del FXR α que une a las moléculas de farnesol (un metabolito de la síntesis de colesterol), sales biliares¹⁵, prostaglandinas, metabolitos de estrógenos y derivados de los ácidos grasos. En la célula, este receptor participa en el metabolismo de los carbohidratos y

¹⁴ Ver glosario.

¹⁵ Ver glosario.

lípidos, al modular diversos genes de enzimas metabólicas tales como: el complejo piruvato deshidrogenasa, fructosa-1,6-bisfosfato, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y glucosa 6-fosfatasa (G6pc) involucrados con el metabolismo de lípidos, gluconeogénesis, homeostasis de la glucosa, síntesis de lactato y piruvato (Savkur y cols. 2005; Cao y cols. 2010). Este receptor también modula transportadores de glucosa GLUT4 (Shen y cols. 2008), así como la expresión de la MUC2 y MUC4 en tejidos patológicos (Macha y cols. 2013; Xu y cols. 2010). En los órganos metabólicos, el FXR α regula la síntesis de sales biliares, lípidos y homeostasis de la glucosa (ver revisión de Cuevas y cols. 2015). Además de encontrarse en tejidos metabólicos (hígado, grasa y páncreas), los FXR α también han sido localizados en los ovarios, oviductos, útero y vagina de conejas (Anaya-Hernández y cols. 2014), así como en la placenta y tejido mamario en humano (Serrano y cols. 2007). En estos tejidos reproductivos, el FXR α parece estar íntimamente relacionado con la expresión de los receptores de estrógenos y progesterona (ver revisión de Cuevas y cols. 2015).

Los FXR α también tienen una estrecha relación con las hormonas tiroideas en diferentes tejidos. La activación del FXR α induce la expresión del RNAm de la hormona tiroidea en tejido mamario (Duncan y Archer 2006). El FXR α es capaz de unirse al elemento de respuesta de la hormona tiroidea (TRE) y favorecer la transcripción de la D2. Los FXR y TRs pueden regular genes de las enzimas relacionadas con la homeostasis de la glucosa (Watanabe y cols. 2006). En nuestro grupo de trabajo, encontramos que una disminución de las hormonas tiroideas (hipotiroidismo) reduce la inmunoreactividad¹⁶ de FXR α en hígado y páncreas de la coneja (Rodríguez- Castelán y cols. en proceso).

Como ya describimos anteriormente, nosotros ya hemos localizado la presencia del receptor FXR α en las células epiteliales del oviducto (Anaya-Hernández y cols. 2014), sin embargo desconocemos cuál es su acción en este órgano. Creemos que este receptor podría estar involucrado con la formación de moco oviductal debido a que regula canales de acuaporina, transportadores de glucosa y participa con el metabolismo de carbohidratos y lípidos en otros epitelios. Por todo ello, en el presente estudio nos enfocamos en el análisis del FXR α en el epitelio del oviducto de la coneja.

¹⁶ Ver glosario.

2.1.7 Hipotiroidismo y daño epitelial

Respecto al metabolismo se sabe que el hipotiroidismo afecta diversos epitelios. En el epitelio nasal, incrementa la síntesis de mucopolisacáridos debido al aumento del tamaño de la submucosa e hipertrofia de las glándulas (Eyigor y cols. 2012). En el epitelio mamario, incrementa la oxidación de los lípidos, disminuye la síntesis de colesterol y triglicéridos provocando atrofia, fibrosis y distensión de los alvéolos (Pergialiotis y cols. 2015). En la coneja, el hipotiroidismo aumenta el tamaño de las células ciliadas del ampulla, istmo y útero-tubal, y de las células secretoras del istmo. En fimbria-infundíbulo no afecta el tamaño de las células, pero el porcentaje de células secretoras proliferativas es menor en las hembras controles. Los mecanismos involucrados en tal efecto son aún desconocidos, aunque se cree que pudiera estar relacionado con alteraciones en el metabolismo celular ya que la proliferación no se ve afectada en gran medida (Anaya-Hernández y cols. 2014). En los ovarios, disminuye la cantidad de las gotas lipídicas en todos los estadios foliculares. Mientras que en todas las regiones del oviducto aumenta el tamaño y número de gotas lipídicas en la submucosa. En fimbria- infundíbulo y útero-tubal disminuye el contenido de lípidos en la parte apical dentro de las células epiteliales, y en la submucosa disminuye el contenido de los triglicéridos (Rodríguez-Castelán en proceso). En el hígado, disminuye el contenido de glucógeno, mientras que en páncreas provoca angiogénesis, modifica la histología de los islotes de Langerhans, y en los acinos favorece la infiltración de células inmunes y de gotas lipídicas (Rodríguez-Castelán y cols. 2015). El hipotiroidismo también afecta la inmunoreactividad de receptores nucleares involucrados con el metabolismo celular de algunos epitelios. En las células ciliadas del istmo y útero-tubal, el hipotiroidismo disminuye la inmunoreactividad del PPAR δ , pero aumenta en las células secretoras del istmo. Mientras que en el ovario, el hipotiroidismo incrementa la expresión de PPAR δ (Rodríguez-Castelán en tesis proceso). El hipotiroidismo disminuye la inmunoreactividad de FXR α en epitelio del páncreas e hígado de la coneja (Rodríguez-Castelán en proceso).

Como podemos apreciar, el hipotiroidismo está fuertemente implicado con cambios histológicos en diferentes epitelios, y genera modificaciones en el metabolismo de los mismos. Por ello, en el presente estudio, nos enfocamos específicamente en el estudio del metabolismo epitelial de carbohidratos y lípidos en el oviducto de la coneja.

3. JUSTIFICACIÓN

- El hipotiroidismo afecta la función de diversos epitelios: aumentando la síntesis de mucopolisacáridos ácidos en epitelio nasal (Eyigor y cols. 2012), de triglicéridos y peroxidación lipídica en epitelio mamario (Pergialiotis y cols. 2015), en el contenido de glucógeno del hígado (Rodríguez-Castelán y cols., en proceso), en el tamaño celular del hígado (Rodríguez-Castelán y cols., en proceso), entre otros. En el oviducto, el hipotiroidismo aumenta el tamaño de las células epiteliales, probablemente debido a cambios en el metabolismo o función de las células (Anaya-Hernández y cols. 2014). En el presente estudio, analizamos el efecto del hipotiroidismo en el contenido de mucopolisacáridos y mucinas en el epitelio oviductal.
- En el oviducto, los eventos reproductivos dependen en gran medida del metabolismo de los carbohidratos y lípidos. Diversos receptores nucleares (LXR, LRH-1, PPAR, FXR) participan en varios mecanismos celulares tales como el metabolismo, la proliferación, diferenciación, esteroidogénesis, y apoptosis de los tejidos reproductivos (ver revisión de Cuevas y cols. 2015). Considerando que existe una estrecha relación entre el FXR α y las hormonas tiroideas en tejidos metabólicos, pues el FXR induce la expresión de la hormona tiroidea, juntos regulan la transcripción de la D2 y genes de enzimas metabólicas al unirse al TRE (Watanabe y cols. 2006; Duncan y Archer 2006), y en nuestro grupo de trabajo encontramos que el hipotiroidismo reduce la inmunoreactividad de FXR α en hígado y páncreas de la coneja (Rodríguez- Castelán y cols. en proceso), en el presente estudio evaluamos la regulación que pudiera tener el hipotiroidismo en la inmunoreactividad de FXR en el oviducto.

4. HIPÓTESIS

El hipotiroidismo disminuye el contenido de mucopolisacáridos y mucinas, así como la inmunolocalización del FXR α en el epitelio del oviducto de la coneja adulta.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el hipotiroidismo modifica el contenido de mucopolisacáridos y mucinas, así como la inmunolocalización del FXR α en células epiteliales del oviducto de la coneja.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En cada una de las regiones del oviducto de conejas controles e hipotiroideas:

- Comparar el contenido de mucopolisacáridos.
- Comparar el contenido de mucinas.
- Determinar la inmunolocalización del FXR α en las células ciliadas y secretoras.

6. METODOLOGÍA

Animales: Se utilizaron conejas adultas vírgenes de 8-12 meses de edad de la raza chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*), se mantuvieron bajo condiciones estándar (16 h/8 h de luz y oscuridad a 22 ± 2 °C) en el bioterio del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (Universidad Autónoma de Tlaxcala). Los animales se alojaron en jaulas individuales de acero inoxidable (50 x 60 x 40 cm), y fueron alimentadas con alimento Purina y agua *ad libitum*¹⁷. Para la realización de este proyecto se utilizaron dos grupos: 6 conejas controles y 6 hipotiroideas.

Inducción del hipotiroidismo. Se llevó a cabo mediante tratamiento con el fármaco anti-tiroideo metimazol (Sigma), el cual se les administró en agua potable a una concentración de 0.02% durante treinta días (10 mg/kg; Anaya-Hernández y cols. 2015). Al término del tratamiento, ambos grupos fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (60 mg/kg, Pfizer) y posteriormente sacrificados para su posterior análisis histológico.

Análisis histológico del epitelio. Después del sacrificio con una sobredosis de anestésico, se extrajeron los oviductos para fijarlos en la solución de Bouin-Duboscq por 12 h. Se deshidrataron con alcoholes en concentración ascendente (60-100%), e incluyeron en parafina. Con un micrótomo se hicieron cortes de tejido transversales a $7\mu\text{m}$ y se colocaron 12 cortes en una laminilla. Se observaron los cortes al microscopio y las regiones del oviducto fueron identificadas para su posterior procesamiento histológico. Por cada coneja se utilizó 1 laminilla con tejido de la parte central de cada región del oviducto para la tinción ácido peryódico de Schiff (PAS) y azul-alcián pH 1-pH 2.5. Los cortes fueron desparafinados en xileno y deshidratados con alcoholes en concentraciones descendentes (100-60%). Para determinar el contenido de mucopolisacáridos (PAS) se le agrego a los cortes la solución de ácido peryódico durante cinco minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se colocó el reactivo de Schiff de Coleman por 15 minutos. Finalmente se hizo un lavado con agua corriente y tibia durante 10 minutos. Para determinar las mucinas sulfatadas, se tiñó otra laminilla con el colorante azul-alcián (pH 1.0) /ácido clorhídrico. Se agregó el colorante a los tejidos durante 30 minutos y después fueron secados a papel filtro sin enjuagar. Otra laminilla fue utilizada para determinar mucinas sulfatadas ácido/débiles. Se adicionó el colorante azul alcián (pH 2.5)/ con ácido acético al 3% durante 30 minutos e inmediatamente los cortes se

¹⁷ Ver glosario.

enjuagaron con agua destilada por 10 minutos. Para la contra-tinción de las sulfomucinas y sialomucinas se utilizó el colorante rojo por cinco minutos para contrastar los núcleos. Mientras que para la tinción de PAS los núcleos se contra-tiñeron con hematoxilina-eosina. Finalmente, cada una de las laminillas fue deshidratada con alcoholes en concentración ascendente (60-100%) y se fijaron en un cubreobjetos con cytoseal TM60. Para comparar el contenido de mucopolisacáridos y los tipos de mucinas (sialo y sulfomucinas) en el oviducto, se utilizó un microscopio de luz visible (Nikon ECLIPSE E600) y se tomó fotografía el mejor corte (tomando en cuenta que no estuviera roto o rayado) con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega pixeles. Se utilizó el programa Axionvision Rel 4.8 para contabilizar 90 células epiteliales centrales de cada región para semi-cuantificar el contenido de mucopolisacáridos, sialo y sulfomucinas dentro del epitelio. Para ello, se tomaron fotos a 100x de la capa epitelial. Los criterios de cuantificación del contenido dentro de las células fue determinado en base a cuatro categorías que van de menos a más: sin contenido (0), contenido apical (+), contenido a la mitad (++) y contenido completo (+++) de la célula epitelial (Figura 5).

Inmunolocalización de FXR α . Una laminilla por región/coneja fueron utilizadas para realizar la técnica de inmunohistoquímica que se realizó en base al método avidina-biotina peroxidasa-HRP (ABC), donde los cortes de tejido oviductal, ya hidratados, se incubaron en una solución buffer de citratos (pH= 6) durante tres noches. Posteriormente, los cortes se incubaron con el primer anticuerpo anti-FXR α (1:50; SANTA CRUZ, BIOTECHNOLOGY) en una cámara húmeda a 4°C durante una noche. Seguido de ello, los cortes se incubaron con un anticuerpo secundario Donkey anti-goat biotinilado (1:200; SANTA CRUZ, BIOTECHNOLOGY) durante dos horas a temperatura ambiente. Después, los cortes fueron lavados con una solución buffer de fosfatos (PBS; pH= 7.2) y se incubaron con el ABC (complejo enzimático avidina-biotina) durante 1 h. Para luego realizar el revelado en una solución de diaminobenzidina (DAB) al 0.05% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% en PBS hasta localizar el marcaje de las células. Finalmente, se utilizó la tinción de hematoxilina de Mayer para contrastar el marcaje de núcleos inmunoreactivos. Los cortes se deshidrataron en alcoholes a concentraciones ascendentes y se cubrieron con Cytoseal TM 60 y un cubreobjetos. Para cuantificar la proporción de células inmunoreactivas marcadas se observó a la laminilla con un microscopio de luz visible (Nikon ECLIPSE E600) y se le tomó fotografía al mejor corte (tomando en cuenta que no estuviera roto o rayado) con

una cámara OLYMPUS de 5.1 mega pixeles. Se utilizó el programa Axionvision Rel 4.8 para contabilizar 120 células marcadas vs. las no marcadas por región. Para ello, se tomaron fotos a 100x de la capa epitelial considerando 8 campos centrales/ región/ coneja, se utilizó una cuadrícula 4 x 4 cm y se tomaron los 8 cuadrantes centrales para el conteo celular. Para el ajuste de células por región, se normalizaron considerando el total de células inmunoreactivas positivas y negativas (ciliadas o secretoras) como el 100%.

MUCOPOLISACÁRIDOS

SULFOMUCINAS Y SIALOMUCINAS

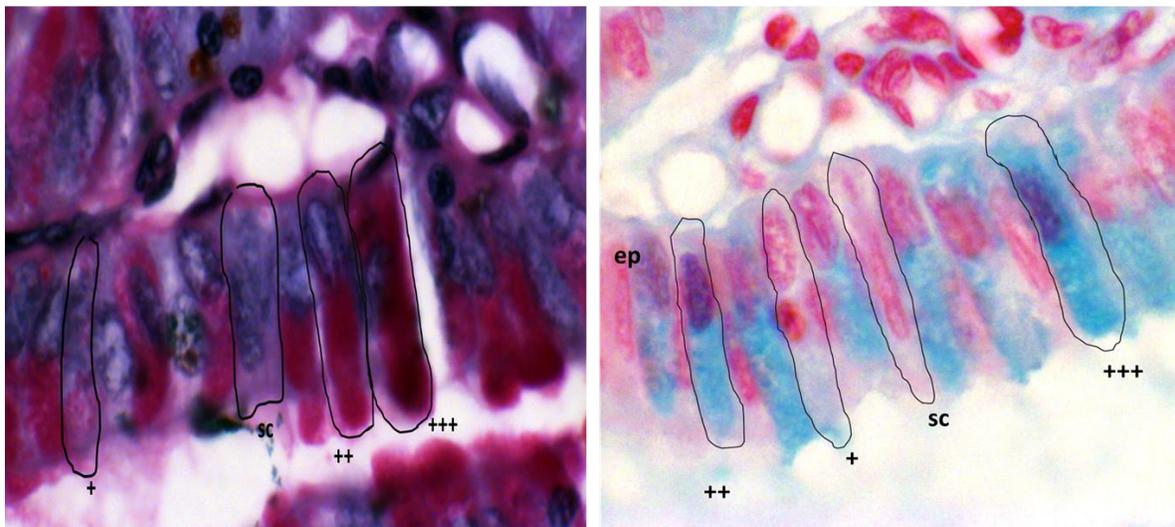


Figura 5. Criterio de cuantificación de mucopolisacáridos y mucinas (sialomucinas y sulfomucinas) dentro del epitelio del oviducto (contorno de la célula; línea negra). En las imágenes se observa la localización de mucopolisacáridos mediante la tinción PAS (ácido peryódico de Schiff; color rojo), de sialomucinas y sulfomucinas mediante azul-alcián (color azul). La abundancia de mucopolisacáridos y mucinas dentro del epitelio (ep) fue cuantificada considerando cuatro categorías; el contenido localizado apical (+), mitad (++) , completamente (+++) y sin contenido (sc) dentro del epitelio. Escala = 20µm.

Análisis estadístico. Para determinar el contenido de mucopolisacáridos, sulfomucinas y sialomucinas dentro del epitelio de cada una de las regiones del oviducto, tanto en el grupo control e hipotiroideo, se utilizó una prueba de Fisher. Mientras que para el análisis de la inmunoreactividad del FXR α en células ciliadas y secretoras de cada una de las regiones del oviducto aplicamos una ANOVA de dos vías. En todos los casos se utilizó el programa de análisis estadístico Prisma para Windows, versión 5.0

7. RESULTADOS

7.1 Contenido de mucopolisacáridos en el epitelio del oviducto

El contenido de los mucopolisacáridos fue evidente en el interior del epitelio de cada una de las regiones del oviducto (fimbria-infundíbulo, ampulla, istmo y útero-tubal). Los mucopolisacáridos fueron localizados dentro de las células epiteliales, submucosa y criptas del oviducto. En el epitelio de las cuatro regiones oviductales hubo un contenido diferencial de mucopolisacáridos en la parte apical, media y completa de las células, tanto en el grupo control como hipotiroideo, encontrándose un mayor porcentaje de células con contenido apical en las regiones fimbria-infundíbulo y un mayor porcentaje de células con contenido medio o completo en las regiones de ampulla-istmo-útero tubal (Figura 6). Cuando se cuantificó la proporción de células dependiendo de la localización del contenido, encontramos que el hipotiroidismo favoreció la presencia de mucopolisacáridos en la parte apical en las regiones fimbria-infundíbulo, ampulla y útero-tubal. Mientras que disminuyó el contenido de mucopolisacáridos en la célula completa de las regiones de ampulla. El contenido en la célula completa fue menor en la región del istmo (Figura 7).

7.2 Contenido de sulfomucinas en el epitelio del oviducto

Las sulfomucinas fueron localizadas dentro de las células epiteliales en cada una de las regiones del oviducto. El contenido se muestra en la parte apical, media y completamente dentro de las células epiteliales, submucosa y criptas del oviducto. El contenido de sulfomucinas fue diferente entre las regiones, encontrándose un mayor porcentaje de células con contenido apical en las regiones fimbria-infundíbulo y un mayor porcentaje de células con contenido medio o completo en las regiones de ampulla-istmo-útero tubal (Figura 8). Cuando se cuantificó la proporción de células dependiendo de la localización del contenido, encontramos que el hipotiroidismo favoreció el contenido de sulfomucinas en la parte apical en fimbria-infundíbulo y ampulla, pero la disminuyó en la región útero-tubal. Mientras que el contenido en la célula completa fue menor en la fimbria-infundíbulo y ampulla, pero mayor en la región útero-tubal del grupo hipotiroideo (Figura 9).

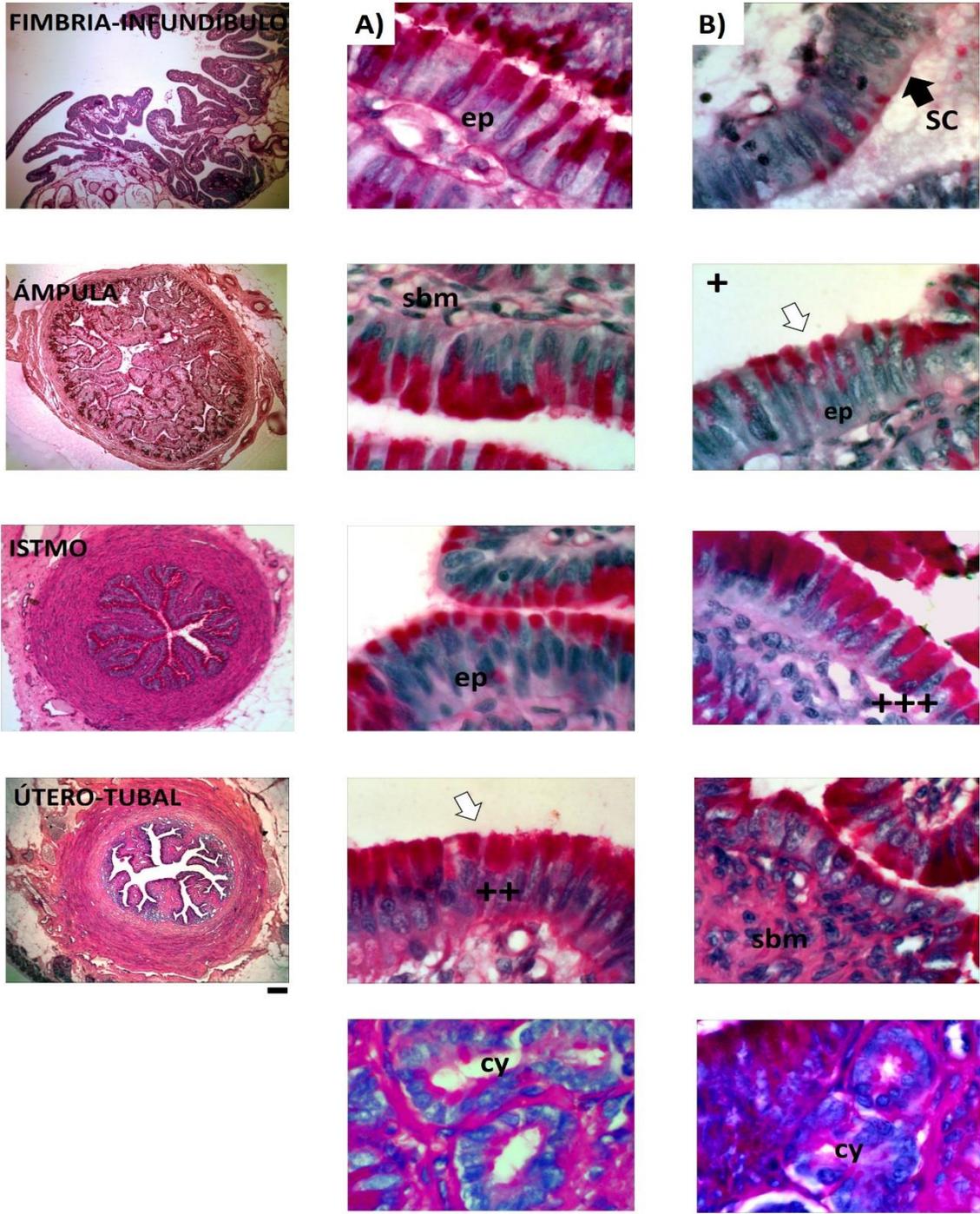


Figura 6. Localización y comparación del contenido de los mucopolisacáridos en el oviducto de conejas controles (letra A) e hipotiroideas (letra B), teñidas con PAS (color rojo). Las imágenes muestran el contenido diferencial de los mucopolisacáridos dentro del epitelio (ep), submucosa (sbm) y criptas (cy) del oviducto. El contenido fue cuantificado considerando cuatro categorías; contenido apical (+), a la mitad de la célula (flechas blancas; ++), completamente (+++) y sin contenido (flecha negra; SC). Podemos observar que el hipotiroidismo modificó mayoritariamente el contenido en la parte apical de la región del ámpula y menor en istmo. Escala = 20 μ m.

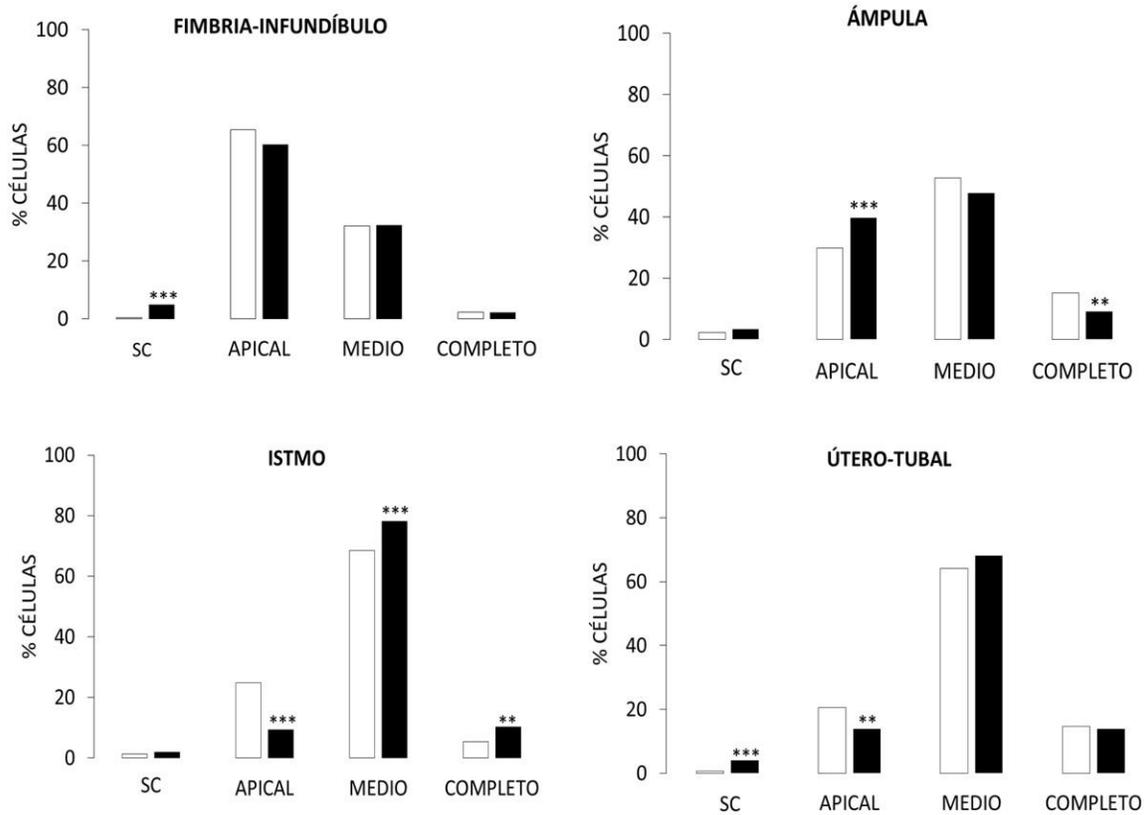


Figura 7. Contenido de mucopolisacáridos dentro del epitelio de cada una de las regiones el oviducto de conejas controles (barras blancas) e hipotiroideas (barras negras). Células sin contenido (SC), con contenido apical, a la mitad y completamente dentro de la célula. En el grupo hipotiroideo observamos que hubo un aumento del contenido apical en fimbria-infundíbulo, ampulla y útero-tubal. Mientras que el contenido en la célula completa fue menor en el ampulla y mayor en el istmo. Los asteriscos * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ indican las diferencias significativas entre grupo control e hipotiroideo.

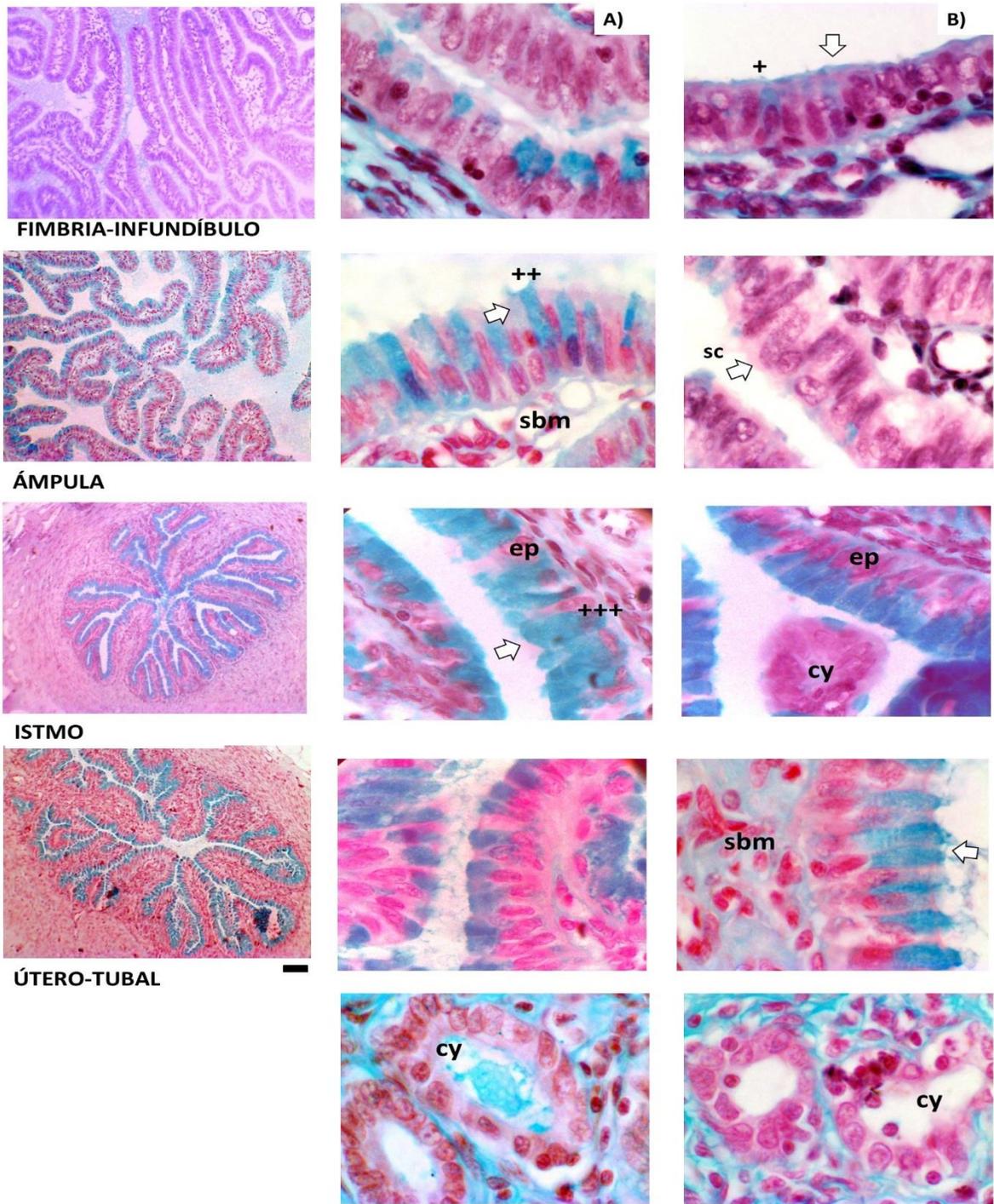


Figura 8. Localización y comparación del contenido de las sulfomucinas en el oviducto de conejas control (letra A) e hipotiroideas (letra B), teñidas con azul-alción y contra-teñidas con colorante rojo (núcleos rojos-rosados). Las imágenes muestran el contenido diferencial de sulfomucinas (color azul) dentro del epitelio (ep), submucosa (sbm) y criptas (cy) del oviducto. El contenido fue cuantificado considerando cuatro categorías; contenido apical (flecha blanca; +), a la mitad de la célula (flecha blanca; ++), completamente (flecha blanca; +++), y sin contenido (flecha blanca; SC). Podemos observar un mayor contenido en la parte apical del epitelio en las regiones fimbria-infundíbulo y ámpula, y menor en istmo y útero-tubal en el grupo hipotiroideo. Escala= 20µm.

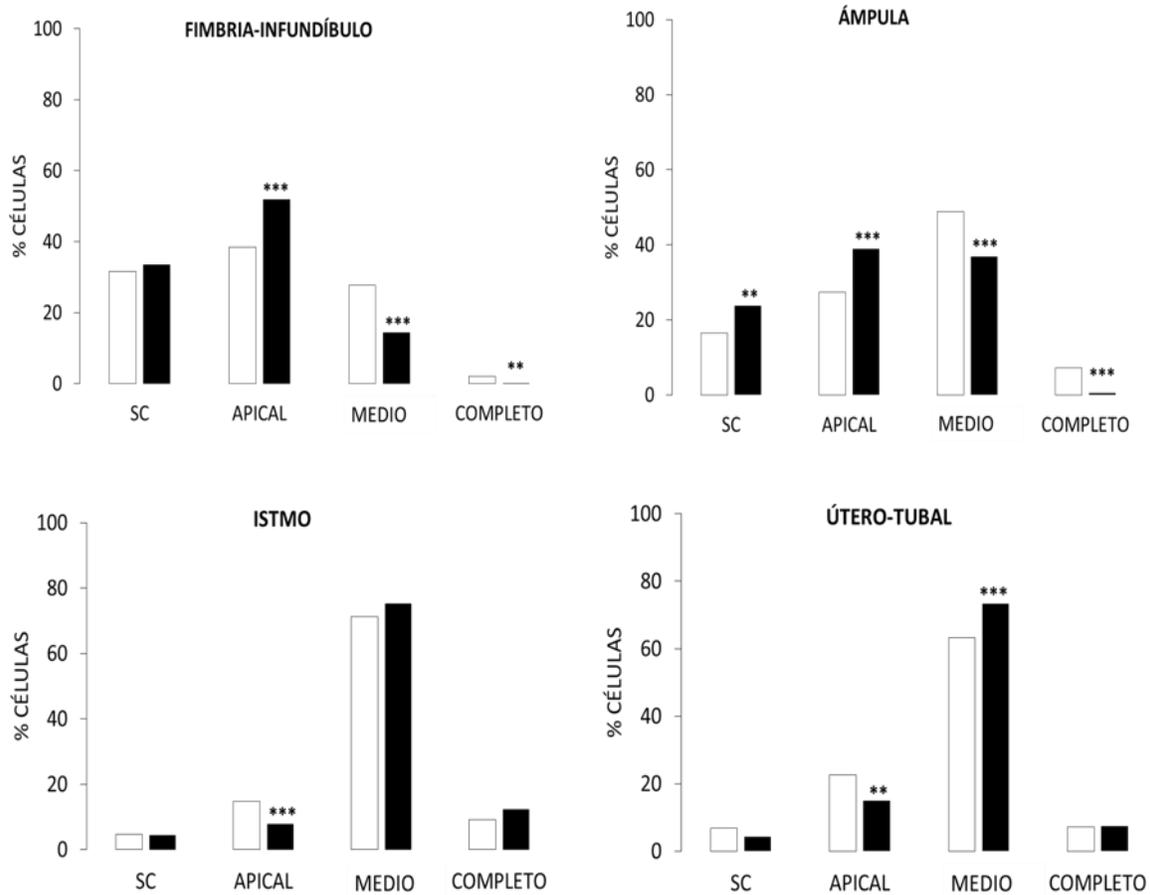


Figura 9. Contenido de las sulfomucinas dentro del epitelio de cada de una de las regiones del oviducto entre conejas control (barras blancas) e hipotiroides (barras negras). Se indican el porcentaje de células sin contenido (SC), con contenido apical, a la mitad y completamente dentro de la célula. En el grupo hipotiroides observamos que hay un aumento del contenido apical en fimbria-infundíbulo y ámpula. Mientras que la proporción de células con contenido completo fue menor en fimbria-infundíbulo y ámpula, pero mayor en útero-tubal. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre grupo control e hipotiroides * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

7.1.3 Contenido de sialomucinas en epitelio del oviducto

El contenido de las sialomucinas se muestra dentro de las células epiteliales en cada una de las regiones del oviducto, encontrándose un mayor porcentaje de células con contenido apical en las regiones fimbria-infundíbulo y un mayor porcentaje de células con contenido medio o completo en las regiones de ámpula-istmo-útero tubal. También se localizó la presencia de sialomucinas en la submucosa y criptas del oviducto (Figura 10). Cuando se cuantificó la proporción de células dependiendo de la localización del contenido, encontramos que el hipotiroidismo favoreció el contenido de las sialomucinas en la parte apical disminuyendo en fimbria-infundíbulo, istmo y útero-tubal. Mientras que el contenido en la célula completa aumentó en ámpula, istmo y útero-tubal del grupo hipotiroideo (Figura 11).

7.1.4 Inmunoreactividad del FXR α en el epitelio del oviducto

En conejas hipotiroideas fue evidente una menor inmunoreactividad especialmente en la región útero-tubal tanto en epitelio, criptas oviductales y submucosa (Figura 12). En el grupo hipotiroideo encontramos una menor inmunoreactividad del FXR α en las células secretoras de la región útero-tubal (Figura 13A). Mientras que en las células ciliadas no hubo diferencias significativas (Figura 13B).

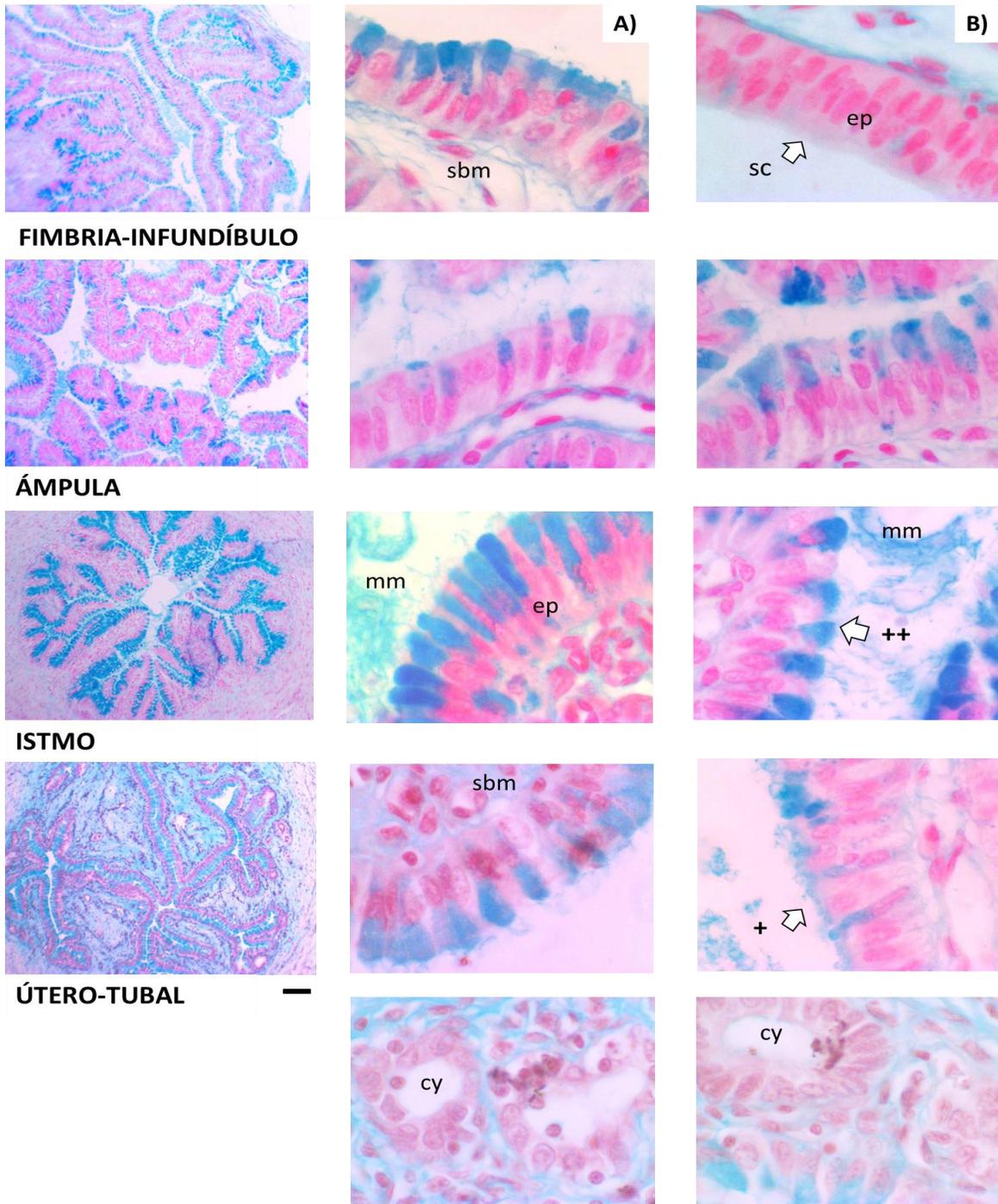


Figura 10. Localización y comparación del contenido de sialomucinas en el oviducto de conejas control (letra A) e hipotiroideas (letra B), teñidas con azul-alcián (color azul). Las imágenes muestran el contenido de las sialomucinas dentro del epitelio (ep), submucosa (sbm) y criptas (cy) del oviducto. También se localizó un contenido en el exterior de la célula (mm; indica presencia de moco fuera de la célula). El contenido de las sialomucinas dentro del epitelio fue cuantificado considerando cuatro categorías; contenido apical (flecha blanca; +), a la mitad de la célula (flecha blanca; ++), completamente (+++) y sin contenido (flecha blanca; SC). En el grupo hipotiroideo se localizó un menor contenido apical en las regiones fimbria-infundíbulo, istmo y útero-tubal. Escala= 20µm.

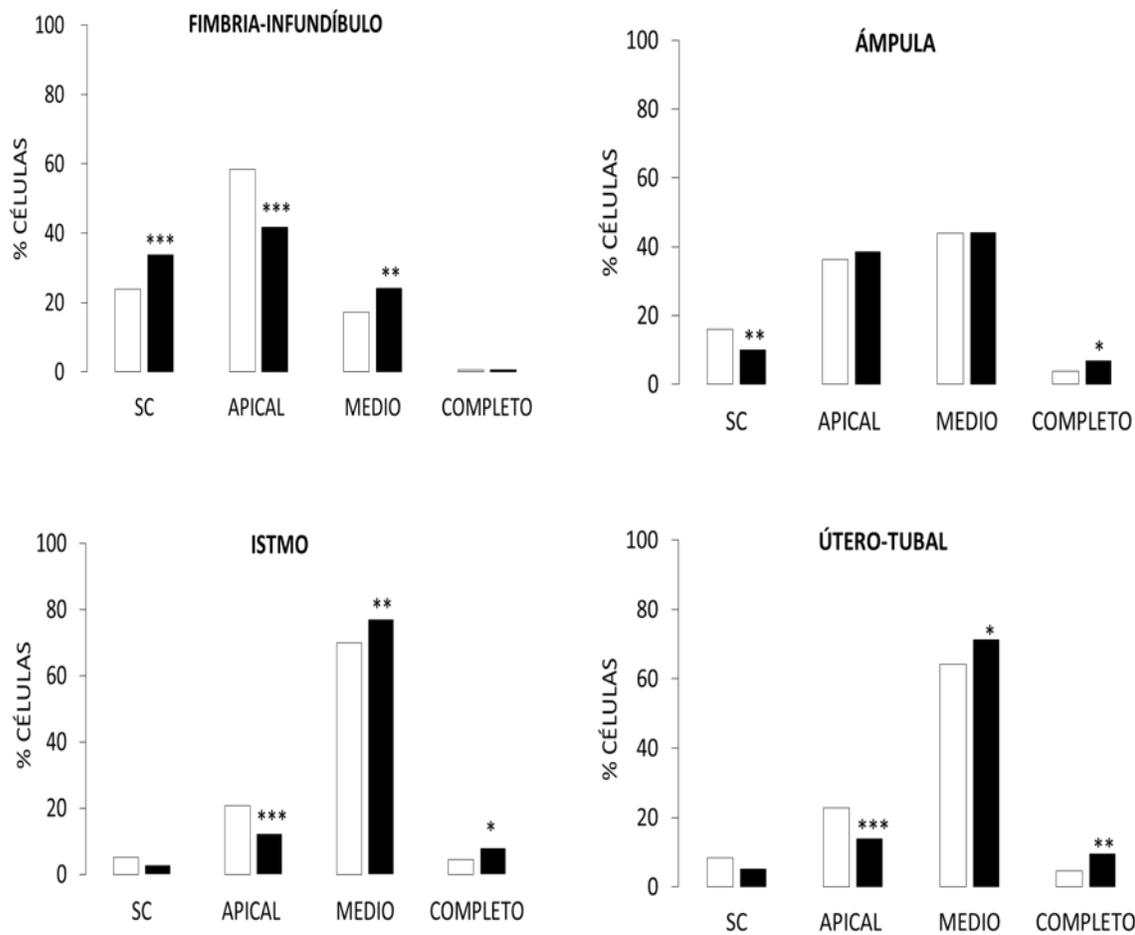


Figura 11. Contenido de sialomucinas dentro del epitelio de cada una de las regiones el oviducto de conejas control (barras blancas) e hipotiroides (barras negras). Se indican el porcentaje de células sin contenido (SC), contenido apical, a la mitad y completamente dentro de la célula. En el grupo hipotiroides observamos que hay menos contenido en fimbria-infundíbulo, istmo y útero-tubal. Mientras que el contenido completo aumenta en ámpula, istmo y útero-tubal. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre grupos control e hipotiroides. * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

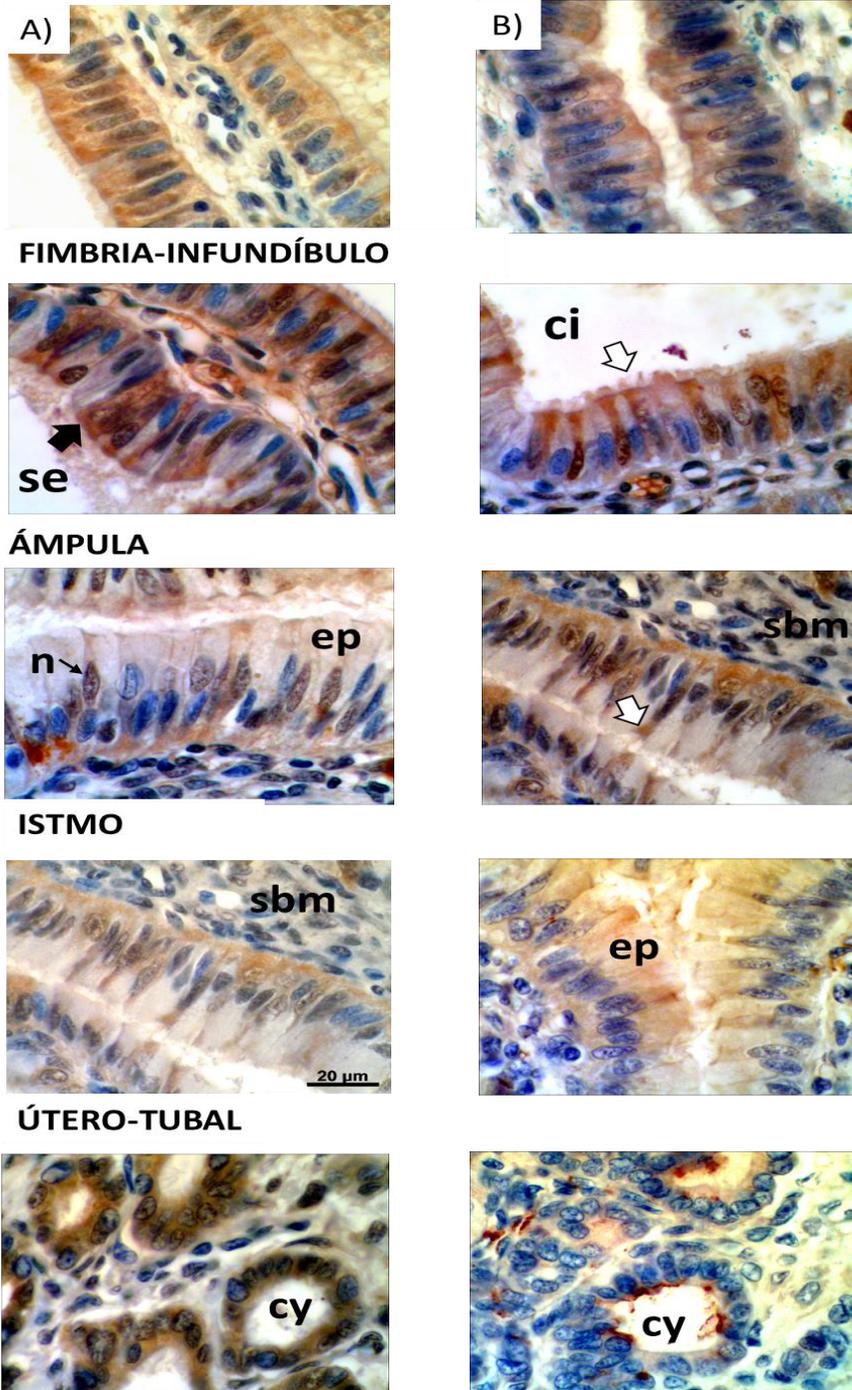


Figura 12. Inmunoreactividad del FXR α en el epitelio del oviducto de conejas control e hipotiroideas. Comparación de la inmunoreactividad del FXR α en epitelio (ep) y submucosa (sbm) de cada una de las regiones del oviducto en conejas controles (letra A) e hipotiroideas (letra B). Se muestra la inmunoreactividad del receptor en células ciliadas (ci; flecha blanca) y secretoras (se; flecha negra). En las células se localizaron los núcleos inmunoreactivos (café) y no inmunoreactivos (azules) al receptor. Las imágenes muestran una menor inmunoreactividad en la región útero-tubal tanto en el epitelio como en las criptas oviductales (cy) de conejas hipotiroideas. Mientras que en el epitelio y la submucosa de infundíbulo-fimbria, ámpula e istmo se encontró una inmunoreactividad similar. Escala= 20 μ m.

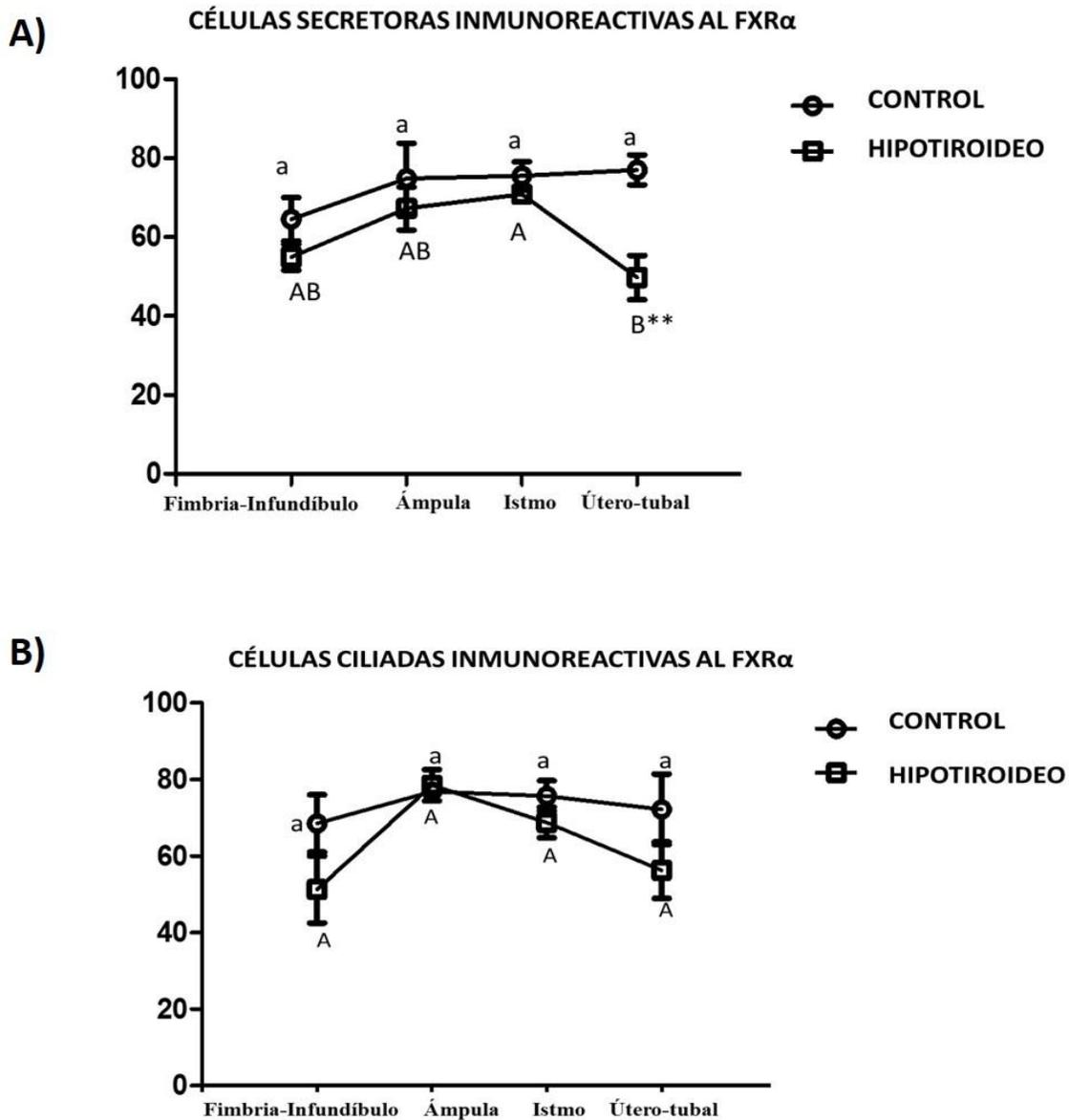


Figura 13. Gráficas que muestran la inmunoreactividad del receptor FXR α en las células secretoras y ciliadas de cada una de las regiones (fimbria-infundíbulo, ámpula, istmo y útero-tubal) del oviducto, en el grupo control (línea con círculos y letras minúsculas) e hipotiroideo (línea con cuadros y letras mayúsculas). A) El hipotiroidismo disminuyó la inmunoreactividad del FXR α únicamente en las células secretoras de la región útero-tubal (**). Factor tratamiento (F= 0.6895, P= 0.4288), factor regiones (F= 4.38556, P= 0.0093) e intersección (F= 4.10373, P=0.0125). B) El hipotiroidismo no modificó la inmunoreactividad del receptor en las células ciliadas entre las regiones del oviducto. Factor tratamiento (F=0.00694, P=0.934), factor regiones (F=1.98724, P=0.1313) e intersección (F=3.58829, P= 0.0218).

8. DISCUSIÓN

8.1 Contenido de mucopolisacáridos en el epitelio oviductal

El glucógeno y los mucopolisacáridos son importantes para el crecimiento y motilidad de los cilios de diversos epitelios (Lindenbaum y cols. 1983; Hugentobler y cols. 2008). Fallas en su síntesis afecta la función epitelial. Así tenemos que la alteración de la síntesis de glicoconjugados provoca una degeneración de las células epiteliales del endometrio de la yegua (Walter y cols. 2001). El contenido de glucógeno en el oviducto ha sido escasamente analizado. En la cabra, el contenido de glucógeno apicalmente dentro de las células epiteliales de la región del ámpula ha sido reportado (Sharma y cols. 2015). Mientras que en la cerda, el ámpula libera casi totalmente los gránulos de glucógeno que están contenidos en el epitelio luminal durante la ovulación. Esta molécula es utilizada como fuente de energía para el ovocito. En el istmo, los polisacáridos podrían ser la principal fuente de energía para la realización de los procesos reproductivos (Gregoraszczyk y cols. 2000). Las células epiteliales del oviducto tienen enzimas que participan en el metabolismo de carbohidratos como la hexoquinasa, 6-fosfofructoquinasa y glucógeno fosforilasa, las cuales participan activamente en el metabolismo de la glucosa (Brewis y cols. 1992).

En la presente investigación nosotros localizamos la presencia de mucopolisacáridos dentro de la célula en todas las regiones oviductales, siendo diferente entre células y entre regiones. Las células de la fimbria-infundíbulo mostraron un mayor contenido apical; mientras que, el resto de las regiones lo tuvo en la mayor parte de la célula. Aunque desconocemos las razones de la distribución de mucopolisacáridos en las diferentes partes de las células y en las diferentes regiones oviductales, es posible que pudieran tener funciones metabólicas y energéticas. Por ejemplo la región fimbria-infundíbulo cuenta con un mayor número de células ciliadas (Pedrero-Badillo y cols. 2013), las cuales realizan un gran gasto energético para el movimiento ciliar. Mientras que las regiones de ámpula, istmo y útero-tubal requerirán almacenar energía para los procesos de capacitación espermática y fertilización. Particularmente, el ámpula es una de las regiones con una mayor actividad metabólica, sus células secretan hasta un 80% de la glucosa que será utilizada como sustrato

para la proporción de energía y movimiento de los cilios, así como para la nutrición espermática (Gregoraszcuk y cols. 2000).

8.2 Contenido de sulfomucinas dentro del epitelio oviductal

Las sulfomucinas se asocian con mucopolisacáridos neutros y sulfatados que varían a lo largo del oviducto en anfibios (Tan y cols. 1994). En las regiones de ampulla e istmo se secretan principalmente glicosaminoglicanos sulfatados, moléculas carbonatadas que se unen a las mucinas para formar sulfomucinas. Aunque la estructura y significado biológico de los glicoconjugados no ha sido bien definida, se reporta que la sulfatación de las glicoproteínas es importante para la diferenciación de las células epiteliales, la interacción del ovocito con el espermatozoide y la adhesión celular (Gabrielli y cols. 2004).

En el presente estudio, localizamos sulfomucinas en el epitelio, submucosa y criptas del oviducto en la coneja. No reportamos la existencia de células especializadas en secretar un tipo de sulfomucinas, pero si localizamos un contenido diferencial entre las regiones del oviducto (fimbria-infundíbulo, ampulla, istmo y útero-tubal). Las células de la región fimbria-infundíbulo mostraron una alta proporción de células con contenido apical, mientras que el resto de las regiones tuvo una alta proporción de células con contenido en la mitad de la célula. A este respecto, se sabe que estas moléculas son indispensables para la fertilización del ovocito, modulando la activación del espermatozoide (Gabrielli y cols. 2004; Mullins y Saacke 1989).

8.3 Contenido de sialomucinas dentro del epitelio

Estudios en diversas especies animales han determinado que las sialomucinas son las glicoproteínas involucradas en diversos procesos reproductivos. En el epitelio del oviducto, las sialomucinas sirven como moléculas de orientación para los espermatozoides en bovinos (Mullins y Saacke 1989). Las sialomucinas participan con la unión del espermatozoide al epitelio y su penetración a la zona pelúcida del ovocito. Modulan el transporte de los espermatozoides a través del cuello uterino (Strous y cols.1992). El ácido siálico, un monosacárido que además de formar parte de las sialomucinas es importante para la fertilización, abunda especialmente en el istmo y une a los espermatozoides con el epitelio del oviducto para su capacitación en la coneja (Gabrielli y cols. 2004). Además, el ácido

siálico es abundante en el moco del oviducto (Menghi y cols. 1995). Las sialomucinas son glicoproteínas formadoras de moco. En la fimbria y ámpula está presente una glicoproteína altamente glicosilada con hidratos de carbono típico de las sialomucinas, que participa en la formación del moco (Strous y Dekker 1992). A este grupo de moléculas pertenece la oviductina, una mucina sintetizada por las células secretoras del oviducto, la cual influye en los primeros pasos del proceso reproductivo uniéndose a la zona pelúcida del ovocito (Malette y Bleau 1993). Por su parte, la zona pelúcida del ovocito contiene oligosacáridos del tipo O-ligados, y la mayoría de los hidratos de carbono se une a proteínas para formar las glicoproteínas del oviducto. Las enzimas glicosiltransferasas están presentes en el interior de las células epiteliales del oviducto. Estas enzimas adhieren residuos azúcar a los glicoconjugados y oligosacáridos, para que se unan a residuos de serina o treonina y entonces formen a las mucinas (McBride y cols. 2005).

Nosotros encontramos un mayor contenido apical de sialomucinas en fimbria-infundíbulo, mientras que en ámpula, istmo y útero-tubal el contenido dentro de las células fue mayoritariamente medio. En la coneja, la actividad secretora del ácido siálico-galactosa y ácido siálico N-acetilgalactosamina se localizan únicamente en gránulos secretores del istmo y ámpula (Menghi y cols. 1995).

8.4 Hipotiroidismo y contenido de mucopolisacáridos y mucinas en el epitelio oviductal

En la presente investigación el hipotiroidismo aumentó el contenido apical de mucopolisacáridos en ámpula y lo disminuyó en el istmo. Por su parte, el contenido apical de sulfomucinas fue aumentado en la fimbria-infundíbulo y en el ámpula, pero disminuido en las regiones istmo y útero-tubal. Mientras que el contenido apical de sialomucinas fue disminuido en todas las regiones oviductales, excepto en el ámpula donde permaneció sin cambios. Como ya describimos anteriormente, los mucopolisacáridos funcionan como fuentes de energía, mientras que las mucinas actúan como señalizadores y moduladores de diversos eventos reproductivos (capacitación, hiperactivación espermática, maduración del ovocito).

Así, el hipotiroidismo, al favorecer la presencia de mucopolisacáridos en la parte más interna de las células epiteliales del oviducto en vez de la parte apical y la posible falta de

secreción de los mismos, podría estar afectando la nutrición de los gametos y el cigoto, al mismo tiempo que podría afectar la correcta ejecución de la fertilización. Una disminución de los polisacáridos en la parte apical de las células del istmo también podría modificar la principal fuente de energía para la embriogénesis durante la etapa de desarrollo temprana, así como la capacitación de los espermatozoides que necesitan de los carbohidratos para su unión al epitelio. Igualmente, el aumento de los mucopolisacáridos en la parte apical de las células del ámpula podría causar una degeneración de las células epiteliales del oviducto (Walter y cols. 2001). Se sabe que las hormonas tiroideas influyen con el metabolismo de los mucopolisacáridos ácidos y glicoproteínas, ya que el hipotiroidismo disminuye la actividad de diversas glicosidasas y fosfatasas en tejido urinario (Tokoro y Eto 1985) e incrementa la acumulación de glicosaminoglicanos en tejido conectivo del corazón (Drobnik y cols. 2009) y páncreas (Rodríguez-Castelán y cols. 2015). Por otro lado, se sabe que los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT3), presentes en la membrana basolateral y apical de las células secretoras de diversos epitelios, son regulados por el hipotiroidismo (Carosa 2005; Lim y cols. 2012). También se ha descrito que el hipotiroidismo afecta el contenido de glucógeno y metabolismo de la glucosa, aumentando la acción de la enzima hexoquinasa y la glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa en los glóbulos rojos (Nehal y Baquer 1989). De manera que ya sea como fuente de energía o como componente del moco oviductal, los cambios en el contenido apical de mucopolisacáridos promovidos por el hipotiroidismo podrían tener una fuerte repercusión en la función del oviducto.

El hipotiroidismo aumentó el contenido apical de sulfomucinas en fimbria-infundíbulo y ámpula, mientras que en istmo y útero-tubal lo disminuyó. Es posible que el mayor contenido de sulfomucinas dentro del epitelio de fimbria-infundíbulo-ámpula pueda afectar la expansión del *cumulus* o mucificación del ovocito, que sintetiza una larga cadena de hialuronano unido a oligosacáridos y proteoglicanos en la superficie celular (Russell y Salustri 2006). Mientras que la disminución de estas moléculas en istmo y útero tubal podría relacionarse con alteraciones en la capacitación espermática (Coy y cols. 2012). En general, es posible que la modificación del contenido de las sulfomucinas dentro del epitelio se deba a una alteración en el contenido de los mucopolisacáridos sulfatados. Pues curiosamente, también encontramos que el hipotiroidismo modificó el contenido de mucopolisacáridos en ámpula e istmo. Esto nos permite suponer que la modificación de los mucopolisacáridos

sulfatados podría afectar la formación de las sulfomucinas en el oviducto, debido a que las mucinas se asocian con los mucopolisacáridos para la formación del moco oviductal.

El hipotiroidismo podría afectar la glicosilación de las glicoproteínas reduciendo la formación de las sialomucinas en fimbria-infundíbulo, istmo y útero-tubal donde localizamos un menor contenido apicalmente. Esta propuesta la basamos en los resultados obtenidos en ratas hipotiroideas, en las cuales se observa un aumento en la sialilación¹⁸ acelerando la síntesis de las glicoproteínas, así como un aumento en la síntesis de ácido siálico causando un incremento en su despolimerización y síntesis en vasos sanguíneos, provocando incluso una disrupción de sus membranas (Uniyal y cols. 1998). También se ha descrito que el hipotiroidismo aumenta el RNAm de las galactosiltransferasas en las células tirotropas de ratas, provocando una alteración en la concentración de oligosacáridos (Helton y cols. 1994). Esto nos lleva a suponer que el contenido menor de las sialomucinas en la parte apical de las células epiteliales del oviducto puede deberse a una alteración de las glicosiltransferasas. De manera que el hipotiroidismo pudiera estar inhibiendo la expresión de la enzima y afectando la glicosilación de las proteínas que forman a las sialomucinas. El menor contenido de las sialomucinas en la fimbria-infundíbulo podría afectar la sobrevivencia del ovocito en el oviducto de conejas hipotiroideas, ya que estas regiones tienen el primer contacto con el ovocito y lo protegen hasta su llegada al ámpula.

8.5 Expresión del FXR α en el epitelio del oviducto

La protección, secreción, así como un aumento en la expresión de los genes que codifican para proteínas unidas a la membrana y que participan en la secreción de las células epiteliales son acciones directamente controladas por el FXR α (Savkur y cols. 2005; Cao y cols. 2010). En el presente estudio reportamos una menor inmunoreactividad del FXR α en las células secretoras de la región útero-tubal del oviducto en el grupo hipotiroideo. La relación entre FXR α y la secreción oviductal parece ser confusa, pues el contenido de mucopolisacáridos, sulfomucinas y sialomucinas fue afectado en todas las regiones del oviducto. Aunque valdría la pena explorar detalles más finos de la secreción, como podría ser la presencia de ciertas moléculas específicas como la oviductina o uteroglobina (González y cols. 1996; Saccary y cols. 2013), las cuales se encuentran en la secreción mezcladas con

18

otras moléculas, y participan directamente en el proceso de fertilización. Además, el FXR α podría participar con el control del agua, necesaria para la formación del moco oviductal. Así tenemos que en el oviducto se expresa la acuaporina¹⁹ 8 (Brañes y cols. 2005); y el FXR α disminuye la expresión de acuaporina 8 en el epitelio de la vesícula biliar (van y cols. 2006). De manera que, una menor inmunoreactividad del FXR α en las células secretoras de la región útero-tubal podría afectar indirectamente la absorción de agua y la formación de fluidos luminales en el oviducto.

El FXR α participa en el metabolismo de lípidos y carbohidratos en muchos tejidos (Kalaany y Mangelsdorf 2006). En el oviducto, la acción de las enzimas y transportadores es importante para el metabolismo de los carbohidratos y lípidos. El oviducto se somete a cambios metabólicos para promover al embrión la disponibilidad de los sustratos. En la región del ámpula e istmo la concentración de piruvato aumenta debido a la acción del enzima lactato deshidrogenasa. El complejo piruvato deshidrogenasa es importante para producir los metabolitos piruvato y lactato requeridos para el crecimiento de los embriones (Hugentobler y cols. 2008). En hígado, la expresión de esta enzima es altamente regulada por el FXR α y suprime la glucólisis a través de su inactivación (Savkur y cols. 2005). De acuerdo con estos reportes, podemos sugerir que el FXR α no necesariamente está involucrado con el metabolismo de la glucosa, pues en ámpula e istmo, donde está presente esta enzima, no encontramos diferencias significativas en la inmunoreactividad del FXR α . Sin embargo desconocemos si otras proteínas relacionadas con la síntesis de glucosa o la absorción de la misma (transportadores de glucosa, GLUT) pudieran estar relacionadas con la expresión de FXR α en el oviducto. A este respecto, se sabe que un aumento de GLUT4 y GLUT8 propician un aumento en la motilidad del espermatozoide en el oviducto (Roy y Krishna. 2013). El FXR α induce la expresión del sitio promotor del GLUT4 a través del FXRE, favoreciendo así el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en células hepáticas (Shen y cols. 2008). Mientras que la T3 regula el GLUT1 en las células de Sertoli (Ulisse y cols. 1992).

En lo que se refiere al metabolismo de lípidos, la expresión del transportador de carnitina (OCTN2), localizado en las células epiteliales luminales de la región útero-tubal, está asociado con el metabolismo de los ácidos grasos, favoreciendo el almacenamiento de los espermatozoides en murciélagos (Roy y Krishna 2012), mientras que en bovinos está

19

implicado con el desarrollo de los ovocitos (Reader y cols. 2015). El FXR α regula de manera específica la transcripción OCTN1 en testículo y del OCTN2 en epitelio intestinal de ratas (Maeda y cols. 2004). De acuerdo con estos reportes, inferimos que el FXR α podría regular el transportador de carnitina, específicamente el OCTN2 en la región útero-tubal asociándose con el metabolismo lipídico. La menor presencia de FXR α en útero tubal podría afectar el almacenamiento y la capacitación de los espermatozoides, pues estos necesitan de moléculas como el glicerol para su movimiento a través del moco oviductal (Henault y Killian 1993). Además, el glucógeno y los lípidos son importantes para la ciliogénesis. Las células ciliadas presentan grandes gotas de lípidos y rosetas de glucógeno que utilizan como fuente de energía durante el transporte ciliar (Lindenbaum y cols. 1983). El movimiento ciliar es importante para el transporte de gametos y del huevo (Suarez 2008). El contenido de glicerol en el epitelio parece estar regulada por FXR α . Se ha determinado una disminución en la concentración del glicerol asociado con una menor expresión del FXR α en el íleo (Ngo y cols. 2014).

9. CONCLUSIONES

El hipotiroidismo provoca cambios en el contenido de mucopolisacáridos y mucinas en el epitelio de las diferentes regiones oviductales. Esto podría estar relacionado con cambios en la actividad metabólica y secretora de las células epiteliales del oviducto, así como en la función de señalización que estas moléculas ejercen.

El hipotiroidismo reduce la inmunoreactividad del FXR α en las células secretoras de la región útero-tubal, lo cual podría estar relacionada con una modificación en el metabolismo lipídico o de carbohidratos, además de afectar la formación del moco oviductal.

10. MODELO

Nuestros hallazgos son resumidos en un modelo gráfico. La función del epitelio del oviducto es importante para la realización de cada uno de los procesos reproductivos, y es necesario que las funciones de las células epiteliales y musculares de esta estructura sean adecuadas. Cualquier alteración histológica y funcional que ocurra puede afectar la función de cada una de las regiones del oviducto. Por ejemplo, la captura y transporte del ovocito (fimbria-infundíbulo; FIM-INF), la capacitación de los espermatozoides (istmo y útero-tubal; IST-UT-T), fertilización del ovocito (ámpula; AMP) y el desarrollo del embrión en sus primeras etapas (Coy y cols. 2012). La formación y secreción de moco (mucopolisacáridos, sialomucinas y sulfomucinas) por las células secretoras es importante para la lubricación, aporte de nutrientes a los gametos y huevos, así como para la señalización celular. Mientras que las células ciliadas participan en el transporte de los gametos y embriones, e incluso del moco secretado que rodea, protege y orienta a dichas células (Tan y cols. 1994; Suarez SS. 2008) (Figura 14A).

Creemos que el hipotiroidismo modifica la organización histológica del epitelio, lo que podría afectar la función de dichas células. El hipotiroidismo modifica el contenido de los mucopolisacáridos, sialo y sulfomucinas dentro de la célula. Esto podría afectar la motilidad ciliar, ya sea por una acumulación de tapones de moco y/o por la disminución de los gránulos de glucógeno que utilizan las células ciliadas como fuente de energía (Sharma y cols. 2015). Una alteración de las mucinas también podría afectar la orientación del embrión hacia el útero, generando implantaciones ectópicas o la muerte de los embriones. Mientras que un mayor contenido de sialomucinas o sulfomucinas dentro de la célula, quizá debido a un aumento de su tamaño, podría provocar la degeneración de dicha célula. Así, la célula podría estar almacenando mayoritariamente glicoproteínas de tipo mucina como la oviductina (OVD) o útero-globina (UTG), afectando la señalización celular (Walter y cols. 2001). La localización de los mucopolisacáridos y mucinas en la parte más interna de las células epiteliales, en lugar de la parte apical, y la posible falta de su secreción también podría afectar la nutrición de los gametos y cigoto, capacitación y fertilización (Figura 14B).

La relación que podría tener las alteraciones de la secreción con la inmunoreactividad de FXR es difícil de establecer, ya que no existe una correlación entre los cambios en la

secreción y la presencia de dicho receptor. Sin embargo, al menos en la región UT-T, si podemos establecer una posible relación entre la presencia del FXR y los cambios en la secreción. A este respecto podemos decir que, aunque nosotros no lo evaluamos, se sabe que el FXR regula los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT4), canal de acuaporina 8 (AQP8) y la mucina (MUC1) (Carosa 2005; Lim y cols. 2012; Brayman y cols. 2004; Lapensée y cols. 1997), de manera que los cambios en la secreción podría ser regulada por FXR de manera indirecta. Al mismo tiempo, es conocido que las hormonas tiroideas regulan estas mismas moléculas, incluyendo al FXR. Es decir, el hipotiroidismo podría afectar de manera directa o indirecta (FXR) a las moléculas relacionadas con la secreción oviductal.

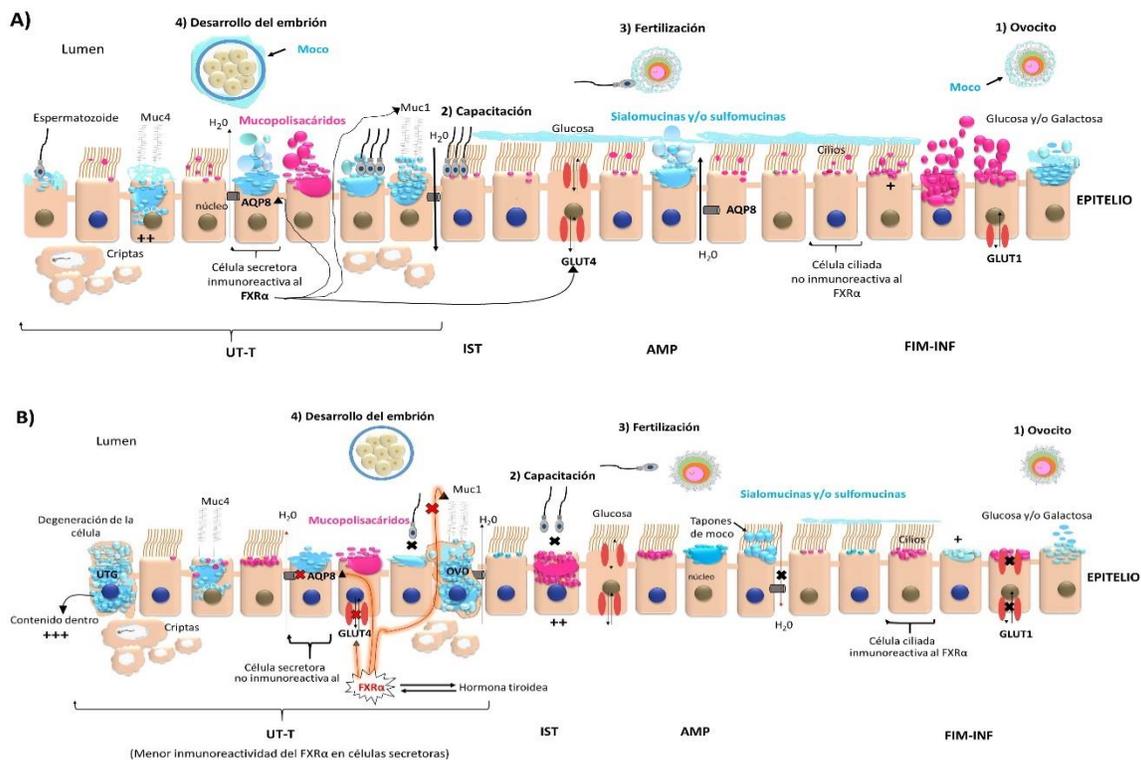


Figura 14. Secreción epitelial y eventos reproductivos realizados en el oviducto A) Durante los procesos reproductivos las células secretoras sintetizan y secretan mucopolisacáridos, sialo y sulfomucinas (moléculas formadoras de moco). Mientras que las células ciliadas utilizan dichas moléculas como fuente de energía durante el transporte y protección de gametos y embriones. La formación del moco requiere de la función correcta de la acuaporina (AQP8) y transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT4). B) El hipotiroidismo modifica el contenido de los mucopolisacáridos, sialo y sulfomucinas dentro de la célula. La menor inmunoreactividad del FXRα en las células secretoras de la región útero-tubal podría afectar la función directa o indirecta de la AQP8, GLUT4 y MUC1. Pues la secreción del moco es importante para la protección de gametos y embriones, así como la ejecución correcta de los eventos reproductivos (Figura original de Méndez-Tepepa M).

11. PERSPECTIVAS

Tanto en conejas controles como hipotiroideas:

Inmunolocalización de la oviductina o uteroglobina. Debido a que nuestros resultados muestran que el hipotiroidismo modifica de manera diferencial el contenido de sialomucinas y sulfomucinas dentro del epitelio del oviducto, consideramos importante un estudio más específico de estas glicoproteínas. La oviductina y uteroglobina son glicoproteínas del tipo mucinas que forman parte del moco oviductal. Estas glicoproteínas se encuentran asociadas con una gran cantidad de oligosacáridos, protegen al óvulo durante su transporte, tienen una capacidad de almacenamiento y menor rango de secreción (González y cols. 1996; Saccary y cols. 2013). Por lo que, un análisis del efecto del hipotiroidismo en la inmunolocalización de dichas glicoproteínas nos permitirá determinar de manera específica cuales son las glicoproteínas que se están afectando dentro del epitelio.

Inmunolocalización de MUC1 y MUC2. Si bien reportamos que el hipotiroidismo modifica el contenido de mucinas secretoras (sialomucinas y sulfomucinas), no descartamos la posibilidad de un efecto en la expresión de las mucinas señalizadoras localizadas en la membrana celular (Brayman y cols. 2004; Lapensée y cols. 1997). Pues el FXR α regula mucinas en otros tejidos afectando la señalización celular, y nosotros reportamos que el hipotiroidismo modifica la inmunoreactividad del FXR α en las células secretoras de la región útero-tubal. Por lo que, creemos que el análisis de su inmunolocalización en el epitelio del oviducto podría ayudar a explicar la función de las mucinas en la orientación e implantación del embrión hacia el útero.

Expresión o Inmunolocalización de la acuaporina 8 (AQP8). La menor inmunoreactividad del FXR α en las células secretoras de la región útero-tubal podría afectar la formación y el contenido de moco, pues el FXR α y las hormonas tiroideas modulan a la AQP8 en otros epitelios. Debido a ello creemos que el FXR α también podría regular la AQP8 en el epitelio, y una menor inmunoreactividad del receptor podría modificar el contenido o secreción del moco en el oviducto. Pues la AQP8 controla el agua que ingresa a la célula durante la formación de moco. Por ello, consideramos que el análisis de la

immunolocalización de la AQP8 a lo largo del epitelio del oviducto permitirá conocer una posible función del FXR α en el epitelio oviductal.

Expresión del GLUT1 en el epitelio del oviducto. Considerando que el FXR α participa con el metabolismo de carbohidratos en otros tejidos, que el hipotiroidismo provoca daños en el metabolismo de diversos epitelios (Eyigor y cols. 2012; Pergialiotis y cols. 2015; Rodríguez-Castelán y cols. 2015), y que nosotros determinamos que el hipotiroidismo disminuye la inmunoreactividad del FXR α en las células secretoras de la región útero-tubal, y además modifica el contenido de mucopolisacáridos dentro de la célula, favoreciendo un contenido apical en las regiones fimbria-infundíbulo, ampulla y útero-tubal. Creemos importante el análisis del GLUT1 o GLUT4 a lo largo del epitelio del oviducto, pues estos transportadores introducen glucosa o galactosa a la célula (Lindenbaum y cols. 1983), moléculas indispensables para la formación de los polisacáridos o glucógeno.

12. REFERENCIAS

1. Abalovich M, Mitelberg L, Allami C, Gutierrez S, Alcaraz G, Otero P y Levalle O. 2007. Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in women with infertility. *Gynecol Endocrinol.* 23: 279-283.
2. Aghajanova L, Lindeberg M, Carlsson, Stavreus-Evers A, Zhang P, Scott J.E, Hovatta, O y Skjöldebrand-Sparre L. 2009. Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online.* 18: 337-347.
3. Anaya-Hernández A, Méndez-Tepepa M, Hernández-Aragón LG, Pacheco P, Martínez-Gómez M, Castelán F y Cuevas E. 2014. Farnesoid X receptor immunolocalization in reproductive tissues of adult female rabbits. *Acta Histochem.* 116: 1068-1074.
4. Anaya-Hernández A1, Rodríguez-Castelán J, Nicolás L, Martínez-Gómez M, Jiménez-Estrada I, Castelán F y Cuevas E. 2015. Hypothyroidism affects differentially the cell size of epithelial cells among oviductal regions of rabbits. *Reprod Domest Anim.* 50: 104-111.
5. Bianco AC1 y Kim BW. 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 116: 2571-2579
6. Bizhanova A y Kopp P. 2009. Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology.* 150: 1084-109.
7. Brañes MC, Morales B, Ríos M y Villalón MJ. 2005. Regulation of the immunoexpression of aquaporin 9 by ovarian hormones in the rat oviductal epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288: 1048-105.
8. Brayman M, Thathiah A y Carson DD. 2004. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol.* 7: 2:4.
9. Brewis IA, Winston RM y Leese HJ. 1992. Energy metabolism of the human fallopian tube. *J Reprod Fertil.* 95: 257-262.
10. Cao R, Cronk ZX, Zha W, Sun L, Wang X, Fang Y, Studer E, Zhou H, Pandak WM, Dent P, Gil G y Hylemon PB. 2010. Bile acids regulate hepatic gluconeogenic genes

- and farnesoid X receptor via G (alpha) i-protein-coupled receptors and the AKT pathway. *J Lipid Res.* 51: 2234-2244.
11. Carosa E, Radico C, Giansante N, Rossi S, D'Adamo F, Di Stasi SM, Lenzi A y Jannini EA. 2005. Ontogenetic profile and thyroid hormone regulation of type-1 and type-8 glucose transporters in rat Sertoli cells. *Int J Androl.* 28: 99-106.
 12. Clark GF, Oehninger S y Seppälä M. 1996. Role for glycoconjugates in cellular communication in the human reproductive system. *Mol Hum Reprod.* 2: 513-517.
 13. Cuevas E, Martínez-Gómez M y Castelán F. 2015. Farnesoid receptor and reproduction. *Receptors & Clinical Investigation:* 2: e463.
 14. Dijkstra G, de Rooij DG, de Jong FH y van den Hurk R. 1996. Effect of hypothyroidism on ovarian follicular development, granulosa cell proliferation and peripheral hormone levels in the prepubertal rat. *Eur J Endocrinol.* 134: 649-654.
 15. Drobnik J, Ciosek J, Slotwinska D, Stempniak B, Zukowska D, Marczynski A, Tosik D, Bartel H, Dabrowski R y Szczepanowska A. 2009. Experimental hypothyroidism increases content of collagen and glycosaminoglycans in the heart. *J Physiol Pharmacol.* 60: 57-62.
 16. Duncan RE y Archer MC. 2006. Farnesol induces thyroid hormone receptor (THR) beta1 but inhibits THR-mediated signaling in MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 343: 239-243.
 17. Eyigor H, Basak S, Kozaci D, Culhaci N, Dost T y Ulutas P. 2012. Pathogenesis of rhinitis in rats with experimentally induced hypothyroidism. *Clin Lab.* 58: 1263-1268.
 18. Gabrielli MG, Bondi AM, Materazzi G y Menghi G. 2004. Differential location and structural specificities of sialic acid-beta-D-Gal sequences belonging to sialoderivatives of rabbit oviduct under hormonal treatment. *Histol Histopathol.* 19: 1175-1186.
 19. González M, García C y Nieto A. 1996. Regional differences in uteroglobin biosynthesis along the rabbit oviduct: immunohistochemical and biochemical studies. *Histochem J.* 28: 209-215.
 20. Gregoraszczyk EL, Cala M y Witkowska E. 2000. Glycogen distribution in porcine fallopian tube epithelium during the estrus cycle. *Folia Biol.* 48: 85-90.

21. Helton TE y Magner JA. 1994. Beta-1-4-galactosyltransferase and alpha-mannosidase-II messenger ribonucleic acid levels increase with different kinetics in thyrotrophs of hypothyroid mice. *Endocrinology*. 135: 1980-1985.
22. Henault MA y Killian GJ. 1993. Synthesis and secretion of lipids by bovine oviduct mucosal explants. *J Reprod Fertil*. 98: 431-438.
23. Horne AW, Brown JK, Nio-Kobayashi J, Abidin HB, Adin ZE, Boswel L, Burgess S, Lee KF y Duncan WC. 2014. The association between smoking and ectopic pregnancy: why nicotine is BAD for your fallopian tube. *PLoS One*. 20: e89400.
24. Hugentobler SA, Humpherson PG, Leese HJ, Sreenan JM y Morris DG. 2008. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Mol Reprod Dev*. 75: 496-503.
25. Hulchiy, M, Zhang H, Cline J.M, Hirschberg A.L y Sahlin L. 2012. Receptors for thyrotropin-releasing hormone, thyroid-stimulating hormone, and thyroid hormones in the macaque uterus: effects of long-term sex hormone. *Menopause*. 19: 1253-1259.
26. Idris N y Carraway KL. 1999. Sialomucin complex (Muc4) expression in the rat female reproductive tract. *Biol Reprod*. 61: 1431-1438.
27. Inuwa I y Williams MA. 1996. Morphometric study on the uterine horn and thyroid gland in hypothyroid, and thyroxine treated hypothyroid rats. *J Anat*. 188: 383-393.
28. Kadirvel G, Machado SA, Korneli C, Collins E, Miller P, Bess KN, Aoki K, Tiemeyer M, Bovin N, y Miller DJ. 2012. Porcine sperm bind to specific 6-sialylated biantennary glycans to form the oviduct reservoir. *Biol Reprod*. 27: 87-147.
29. Kalaany NY y Mangelsdorf DJ. 2006. LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu Rev Physiol*. 68: 159-191.
30. Lapensée L, Paquette Y y Bleau G. 1997. Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). *Fertil Steril*. 68: 702-708.
31. Lim CH, Jeong W, Lim W, Kim J, Song G y Bazer FW. 2012. Differential expression of select members of the SLC family of genes and regulation of expression by microRNAs in the chicken oviduct. *Biol Reprod*. 21: 87-145.
32. Lindenbaum ES, Peretz BA y Beach D. 1983. Menstrual-cycle-dependent and-independent features of the human Fallopian tube fimbrial epithelium: an ultrastructural and cytochemical study. *Gynecol Obstet Invest*. 16: 76-85.

33. Lindsay TJ y Vitrikas KR. 2015. Evaluation and treatment of infertility. *Am Fam Physician*. 91: 308-314.
34. Macha MA, Rachagani S, Gupta S, Pai P, Ponnusamy MP, Batra SK y Jain M. 2013. Guggulsterone decreases proliferation and metastatic behavior of pancreatic cancer cells by modulating JAK/STAT and Src/FAK signaling. *Cancer Lett*. Dec 341: 166-177.
35. Maeda T, Miyata M, Yotsumoto T, Kobayashi D, Nozawa T, Toyama K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y y Tamai I. 2004. Regulation of drug transporters by the farnesoid X receptor in mice. *Mol Pharm*. 1: 281-289.
36. Malette B y Bleau G. 1993. Biochemical characterization of hamster oviductin as a sulphated zona pellucida-binding glycoprotein. *Biochem J*. 295: 437-445
37. McBride DS, Brockhausen I y Kan FW. 2005. Detection of glycosyltransferases in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviduct and evidence for the regulation of O-glycan biosynthesis during the estrous cycle. *Acta. Biochim Biophys*. 1721:107-115.
38. Menghi G, Scocco P y Materazzi G. 1995. Lectin binding and identification of sialic acid acceptor sugars in rabbit oviduct under hormone administration. *Microsc Res Tech*. 31: 488-496.
39. Mullins KJ y Saacke RG. 1989. Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *Anat Rec*. 225: 106-117.
40. Nancarrow CD y Hill JL. 1995. Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. *J Reprod Fertil Suppl*. 49: 3-13.
41. Nehal M y Baquer NZ. 1989. Changes in hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in red cells during hypo and hyperthyroidism. *Biochem Int*. 19: 193-199.
42. Ngo Sock ET, Farahnak Z y Lavoie JM. 2014. Exercise training decreases gene expression of endo- and xeno-sensors in rat small intestine. *Appl Physiol Nutr Metab*. 39: 1098-1113.
43. Pascual A y Aranda A. 2012. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1830: 3908-3916.

44. Pedrero-Badillo F, Anaya-Hernández A, Corona-Quintanilla DL, Castelán F, Pacheco P, Martínez-Gómez M y Cuevas E. 2013. Morphohistological characteristics of rabbit oviduct: a proposal for a single regionalization. *Anim Reprod Sci* 143: 102-111.
45. Pergialiotis V, Agrogiannis G, Gkioka E, Vlachos GD, Perrea D y Kontzoglou K. 2015. Mammary gland epithelial changes in thyroidectomized female rats. *J Boun* 20: 57-61.
46. Priya DM, Akhtar N y Ahmad J. 2015. Prevalence of hypothyroidism in infertile women and evaluation of response of treatment for hypothyroidism on infertility. *Indian J Endocrinol Metab.* 19: 504-506.
47. Reader KL, Cox NR, Stanton JA y Juengel JL. 2015. Effects of acetyl-L-carnitine on lamb oocyte blastocyst rate, ultrastructure, and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology.* 83: 1484-1492.
48. Rodríguez-Castelán J, Arely Anaya-Hernández, Maribel Méndez-Tepepa, Margarita Martínez-Gómez, Francisco Castelán y Estela Cuevas. Immunoreactivity for thyroid hormone and thyrotropin receptors in reproductive tissues of adult female rabbits. *Enviado a Endocrine Research.*
49. Rodríguez-Castelán J, Herrera-Flores A, Cuevas E. Hypothyroidism reduce the immunoreactivity of FXR alpha in pancreas and liver of female rabbits. *In process.*
50. Rodríguez-Castelán J, Martínez-Gómez M, Castelán F y Cuevas E. 2015. Hypothyroidism Affects Vascularization and Promotes Immune Cells Infiltration into Pancreatic Islets of Female Rabbits. *Int J Endocrinol.* ID 917806, 8 pages.
51. Rodríguez-Castelán J. Efecto del hipotiroidismo sobre marcadores del metabolismo lipídico en el tracto reproductivo de la coneja. *Tesis de Doctorado en proceso.*
52. Roy VK y Krishna A. 2012. Changes in the expression of HSL and OCTN2 in the female reproductive tract of the bat, *Scotophilus heathii* in relation to sperm storage. *Acta Histochem* 114: 358-362.
53. Roy VK y Krishna A. 2013. Changes in glucose and carnitine levels and their transporters in utero-tubal junction in relation to sperm storage in the vesperilionid bat, *Scotophilus heathi*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 319: 517-526.

54. Ruiz M, Diego AM, Reyes A, Alonso A y Morell M. 1989. Influence of thyroidectomy on serum and pituitary FSH in control and orchidectomized rats. *Res Exp Med*. 189: 85-90.
55. Russell DL y Salustri A. 2006. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin Reprod Med*. 24: 217-227.
56. Saccary L, She YM, Oko R y Kan FW. 2013. Hamster oviductin regulates tyrosine phosphorylation of sperm proteins during in vitro capacitation. *Biol Reprod*. 89: 38.
57. Savkur RS, Bramlett KS, Michael LF y Burris TP. 2005. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by the farnesoid X receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 329: 391-396.
58. Serrano MA, Macias RI, Briz O, Monte MJ, Blazquez AG, Williamson C y Kubitz R, Marin JJ. 2007. Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta*. 28: 107-117.
59. Sharma RK, Singh R y Bhardwaj JK. 2015. Scanning and transmission electron microscopic analysis of ampullary segment of oviduct during estrous cycle in caprines. *Scanning*. 37: 36-41.
60. Shen H, Zhang Y, Ding H, Wang X, Chen L, Jiang H y Shen X. 2008. Farnesoid X receptor induces GLUT4 expression through FXR response element in the GLUT4 promoter. *Cell Physiol Biochem*. 22: 1-14.
61. Strous GJ y Dekker J. 1992. Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 27: 57-92.
62. Suarez SS. 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol*. 52: 455-462.
63. Tan CK1, Chen TW y Gan JM. 1994. Mucopolysaccharide histochemistry of the oviduct of the toad, *Bufo melanostictus*, before and during ovulation. *Histol Histopathol*. 9: 113-118
64. Thoma ME, McLain AC, Louis JF, King RB, Trumble AC, Sundaram R y Buck Louis GM. 2013. Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertil Steril*. 99: 1324-1331.

65. Tokoro T y Eto Y. 1985. Increased urinary excretion of acid mucopolysaccharides and glycopeptides in hypothyroidism following thyroid hormone therapy. *Eur J Pediatr.* 144: 84-86.
66. Ulisse S, Jannini EA, Pepe M, De Matteis S y D'Armiento M. 1992. Thyroid hormone stimulates glucose transport and GLUT1 mRNA in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 87: 131-137.
67. Uniyal BP, Singh LR y Nagpal KK. 1998. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on serum glycoproteins in experimental rats. *Indian J Exp Biol.* 36: 148-151.
68. van Erpecum KJ, Wang DQ, Moschetta A, Ferri D, Svelto M, Portincasa P, Hendrickx JJ y Schipper M, Calamita G. 2006. Gallbladder histopathology during murine gallstone formation: relation to motility and concentrating function. *J Lipid Res.* 47: 32-41.
69. Walter I, Klein M, Handler J, Aurich JE, Reifinger M, Aurich C. 2001. Lectin binding patterns of uterine glands in mares with chronic endometrial degeneration. *Am J Vet Res.* 62: 840- 845.
70. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC y Auwerx J. 2006. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439: 484-489.
71. Xu Y, Watanabe T, Tanigawa T, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N y Arakawa T. 2010. Bile acids induce cdx2 expression through the farnesoid x receptor in gastric epithelial cells. *J Clin Biochem Nutr.* 46: 81-86.

12. GLOSARIO DE TÉRMINOS

1. **Endometriosis:** células del revestimiento del útero crecen en otras áreas del cuerpo. Esto puede causar dolor, sangrado abundante, sangrado entre periodos y problemas para quedar embarazada.
2. **Nicotina:** compuesto orgánico encontrado principalmente en la planta del tabaco. Se une selectivamente a los receptores de acetilcolina, y causa daños severos a diversos órganos.
3. **Proliferación:** incremento del número de células por división celular. Es más activa durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo y es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos. Es característica de cada tipo celular por lo que está controlada de forma muy específica.
4. **Proteoglicanos:** son una clase especial de glicoproteínas que son altamente glicosiladas. Las moléculas se encuentran formadas por un núcleo proteico que se encuentra unido covalentemente a un tipo especial de polisacáridos denominados glicosaminoglicanos.
5. **Homeostasis:** conjunto de fenómenos de autorregulación que llevan al mantenimiento de la constancia en las propiedades y la composición del medio interno de un organismo.
6. **Endometrio:** mucosa que comprende células epiteliales luminales y glandulares. Es rico en tejido conjuntivo y está altamente vascularizado. Su función es la de alojar al cigoto o blastocisto después de la fecundación, permitiendo su implantación.
7. **Oligomenorrea:** Durante la menstruación ocurren sangrados irregulares con periodos comprendidos entre los 35 y los 90 días.
8. **Menorragia:** término médico para los períodos menstruales en la que la hemorragia es anormalmente intensa o prolongada, debido a un desequilibrio hormonal.
9. **Polimenorrea:** mujeres con periodo menstrual de una duración menor a los 21 días, y tiene por lo tanto un ciclo excesivamente breve.
10. **Metimazol:** fármaco de la familia de las tioureas que inhiben la oxidación del yodo y bloquean las enzimas (tiroperoxidasa y desyodasas) involucradas en la formación de las hormonas tiroideas.
11. **Hiperactividad:** proceso en el que el espermatozoide se desplaza con un movimiento oscilante provocado por unos fuertes impulsos de la cabeza hacia derecha e izquierda y mucho más vigoroso que le facilita la penetración y entrada al ovocito.

12. **Citoquinas:** las citoquinas son un conjunto de proteínas que regulan interacciones de las células del sistema inmune. Su función inmunorreguladora es clave en la respuesta inmune, en la inflamación y en la hematopoyesis de distintos tipos celulares
13. **Zona pelúcida:** matriz extracelular que rodea al ovocito. Esta capa separa el oolema de las células foliculares y corona radiada del ovocito. Desempeña un papel de importancia en la fecundación. Pues establece contacto con el espermatozoide y cumple la función de proteger al ovocito contra la polispermia.
14. **Células Nk:** células asesinas tiene la capacidad de diferenciar las células infectadas por un virus, o las células tumorales que han sufrido transformaciones malignas. Son capaces de identificar qué células son propias del hospedador y cuales son foráneas.
15. **Proteólisis:** degradación de proteínas ya sea mediante enzimas específicas, llamadas peptidasas, o por medio de digestión intracelular.
16. **Sales biliares:** son esteroides ácidos que se encuentra principalmente en la bilis. Participan en el metabolismo del colesterol, eliminan catabolitos del hígado, emulsión de lípidos y vitaminas.
17. **Inmunoreactividad:** una medida de la reacción inmune causada por un antígeno que mediante sustancias provoca una reacción o color que indica presencia de la proteína de interés.
18. **Metabolismo:** es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos que ocurren en una célula y en el organismo. El metabolismo tiene principalmente dos finalidades: obtener energía química utilizable por la célula, que se almacena en forma de ATP y fabricar sus propios compuestos a partir de los nutrientes, que serán utilizados para crear sus estructuras o para almacenarlos como reserva.
19. **Ad libitum:** expresión del latín «a placer, a voluntad» y quiere decir «como guste».
20. **Sialilación:** transferencia del ácido siálico hacia un aceptor adecuado (glico o sialoglicoproteína). La sialilación de las glicoproteínas o glicolípidos es cuantificada mediante la actividad de sialiltransferasa.
21. **Acuaporina:** proteína transmembrana, encargada de transportar el agua a través de los compartimientos celulares.