



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del hipotiroidismo en el contenido de glucógeno y la presencia de lactato deshidrogenasa en el endometrio de conejas gestantes

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Marlenne Castillo Romano

Comité Tutorial

Directora de tesis: Dra. Estela Cuevas Romero

Tlaxcala, Tlax.

Octubre 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del hipotiroidismo en el contenido de
glucógeno y la presencia de lactato deshidrogenasa
en el endometrio de conejas gestantes

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Marlenne Castillo Romano

Comité Tutorial

Directora de tesis: Dra. Estela Cuevas Romero

Tutora: Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tutor: Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Tlaxcala, Tlax.

Octubre 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas “Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta “(CTBC).

A CONACYT por la beca otorgada que me ha permitido culminar con mis estudios (Número de proyecto 780775).

A mi directora de tesis la Dra. Estela Cuevas Romero por su valioso apoyo para la culminación de este proyecto.

A mi Comité tutorial conformado por la Dra. Leticia Nicolás Toledo y el Dr. Pablo Pacheco Cabrera por sus importantes aportaciones a lo largo de la maestría.

A mis compañeros del laboratorio de Endocrinología por su motivación y colaboración.

RESUMEN

Las acciones de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo de la glucosa son diversas. El hipotiroidismo está relacionado con Diabetes Mellitus Gestacional (DMG). Parte de los efectos que el hipotiroidismo tiene como inductor de DMG podrían estar relacionados con sus acciones a nivel del metabolismo de la glucosa, el almacenamiento del glucógeno y la conversión de la glucosa a otros metabolitos como el piruvato o el lactato. En este estudio, evaluamos el efecto del hipotiroidismo en el contenido de glucógeno y la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el útero de conejas no gestantes y gestantes. Se tuvieron 48 conejas de la raza Chinchilla las cuales fueron divididas en no gestantes (n=12, NG) y gestantes durante la implantación (n=12, día 5; G5), placentación (n=12, día 10; G10) y degeneración de cuerpo lúteo (n=12, día 20; G20). En cada grupo se tuvieron hembras controles (n=6) e hipotiroideas (n=6; tratadas con metimazol al 0.02% en agua potable durante 30 días). Después del tratamiento y los tiempos de embarazo, las conejas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico. Se extrajo suero sanguíneo para medir la concentración de glucosa mediante kit enzimático. Se realizó la cesárea postmortem para obtener tejido uterino de sitios con y sin implante del útero medial y una muestra de hígado. Se cuantificó el contenido de glucógeno en útero e hígado. El útero también fue procesado histológicamente para determinar el contenido de glucógeno mediante la tinción ácido periódico de Schiff (PAS) y realizar inmunohistoquímica para la detección de LDH. Los datos fueron analizados con pruebas de Student-t, U de Mann-Whitney o ANOVA de dos vías según fue necesario. No se encontraron diferencias en los niveles de glucosa en ninguno de los grupos. La reserva de glucógeno en el hígado fue mayor en el G20 de los animales controles. El hipotiroidismo aumenta la reserva de glucógeno en el hígado en el grupo NG y el contenido de glucógeno en el útero en G20 en los sitios sin implante. Tanto en G10 como en G20, el hipotiroidismo aumentó el contenido de glucógeno en el útero de sitios con implante. El hipotiroidismo aumenta la expresión de LDH en los animales NG y modifica la presencia de LDH en algunos tipos celulares de los sitios de implante. Nuestros resultados sugieren que el hipotiroidismo podría modificar el metabolismo de glucosa en el útero y con ello modificar el desarrollo de la placenta o del embrión.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1.INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| 1.1 Generalidades de hormonas tiroideas..... | 7 |
| 1.1.1 Disfunciones tiroideas..... | 8 |
| 1.1.2 Hipotiroidismo y útero..... | 10 |
| 1.2 Importancia de los carbohidratos en el útero gestante..... | 10 |
| 1.3 Diabetes gestacional (DMG)..... | 18 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 19 |
| 2.1 Hipotiroidismo y diabetes gestacional (DMG)..... | 19 |
| 2.2 Hipotiroidismo y embarazo..... | 20 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 21 |
| 5. OBJETIVOS..... | 21 |
| 5.1 Objetivo general..... | 21 |
| 5.2. Objetivos particulares..... | 21 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 22 |
| 6.1 Animales..... | 22 |
| 6.2 Hipotiroidismo..... | 22 |
| 6.3 Determinación de glucosa en suero..... | 23 |
| 6.4 Cuantificación de glucógeno en útero..... | 23 |
| 6.5 Tinción de glucógeno en útero..... | 23 |
| 6.6 Inmunohistoquímica de lactato deshidrogenasa (LDH) en útero..... | 24 |
| 6.7 Estadística..... | 24 |
| 7. RESULTADOS..... | 25 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 34 |
| 9. CONCLUSIÓN..... | 37 |
| 10. PERSPECTIVAS..... | 37 |
| 11. REFERENCIAS..... | 39 |
| 11. GLOSARIO DE TÉRMINOS..... | 49 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas, triyodotironina (T3) y tetrayodotironina o tiroxina (T4), son secretadas por la glándula tiroides. Estas participan en diversos procesos fisiológicos como termorregulación, reproducción, desarrollo de tejidos y órganos, metabolismo, consumo de oxígeno, crecimiento, diferenciación y proliferación celular. La síntesis de hormonas tiroideas requiere de la enzima tiroperoxidasa (TPO) que incorpora iones yodo a la molécula de tiroglobulina para producir monoyodotirosinas y diyodotirosinas. El nivel de hormonas tiroideas es controlado por una retroalimentación negativa del hipotálamo y la hipófisis. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que estimula a la adenohipófisis para la secreción de tirotropina (TSH) que, a su vez, estimula a la glándula tiroides para que secrete hormonas tiroideas (Figura 1; Pascual y Aranda 2013).

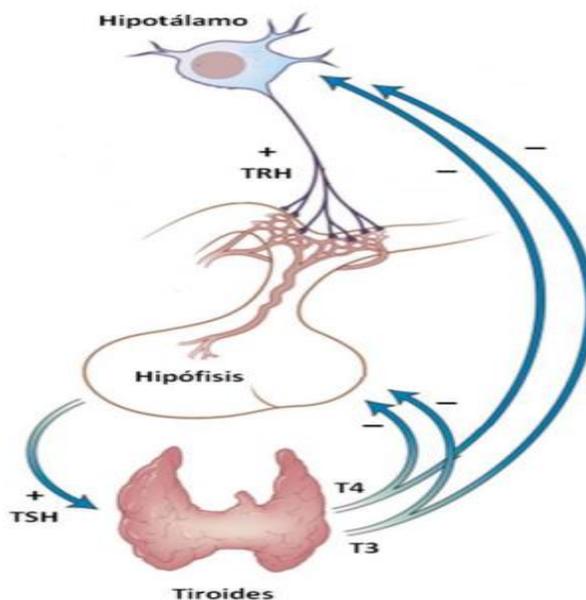


Figura 1. Mecanismo de retroalimentación de síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. Tomado de Bassett y Williams 2008.

Aunque la glándula tiroides secreta predominantemente T4, la T3 es la hormona más activa ya que tiene una mayor afinidad por receptores nucleares de hormona tiroidea que median la mayoría de las acciones de estas hormonas. Las hormonas tiroideas son liberadas por la glándula tiroides a la circulación donde se efectúan uniones a proteínas tales como la globulina fijadora de tiroxina, transtirrenina o suero de albumina. Un mecanismo importante que regula la acción de las hormonas tiroideas es la expresión en la membrana celular de proteínas transportadoras que median su captación, involucrando a los transportadores de monocarboxilato (MCT) 8 y 10, y a las proteínas transportadoras de aniones orgánicos (Visser y cols. 2011).

El metabolismo de las hormonas tiroideas se lleva a cabo por medio de las desyodasas, enzimas que eliminan iones yodo de las moléculas de T3 y T4. Así, las desyodasas tipo I y II (D1 y D2) que eliminan un ion yoduro de la posición 5' del anillo fenólico de la molécula T4 para formar T3, o bien para formar T3 reversa, y la desyodasa tipo III (D3) que cataliza un ion yoduro de la posición 3 del anillo tirosil generando diyodotirosina a partir de T3. Las acciones de las hormonas tiroideas se llevan a cabo por la activación de sus receptores nucleares (TR) α y β (Bianco y Kim 2006; Pascual y Aranda 2013; Figura 2).

1.1.1 Disfunciones tiroideas

El término hipertiroidismo se refiere a cualquier condición en la que hay demasiada hormona tiroidea producida en el cuerpo y una actividad hiperactiva de la glándula tiroides. Otro término que se puede escuchar para este problema es la tirotoxicosis que se refiere a los niveles altos de hormonas tiroideas en el torrente sanguíneo. El diagnóstico es confirmado por pruebas de laboratorio que resulten con niveles de hormonas tiroideas T3 y T4 altas y un nivel bajo de TSH (American Thyroid Association 2014). El hipotiroidismo es un trastorno que se caracteriza por una disminución de hormonas tiroideas y concentraciones elevadas de TSH. Esta disfunción tiroidea se produce por la aparición de anticuerpos anti-TSH, el déficit en la ingesta de yodo, compuestos químicos como algunos herbicidas, radiaciones y fármacos (Colicchia y cols. 2014). Se clasifica como hipotiroidismo clínico cuando los niveles de TSH se encuentran elevados y reducidos los niveles de T4, y como hipotiroidismo subclínico cuando los niveles de TSH

séricos se encuentran elevados pero la T4 se muestra normal (Nygaard 2015). El hipotiroidismo clínico es diagnosticado en base a características clínicas como déficit mental, depresión, demencia, ganancia de peso, estreñimiento, sequedad de la piel, pérdida de cabello, intolerancia al frío, voz ronca, irregularidad menstrual, rigidez muscular y dolor e hipercolesterolemia (Nygaard 2015). El hipotiroidismo se considera un trastorno metabólico común en la población general, es más común en las mujeres y su prevalencia aumenta con la edad (Colicchia y cols. 2014). El hipotiroidismo no tratado puede contribuir a la hipertensión, dislipidemias, infertilidad, deterioro cognitivo y disfunción neuromuscular (Gaitonde y cols. 2012).

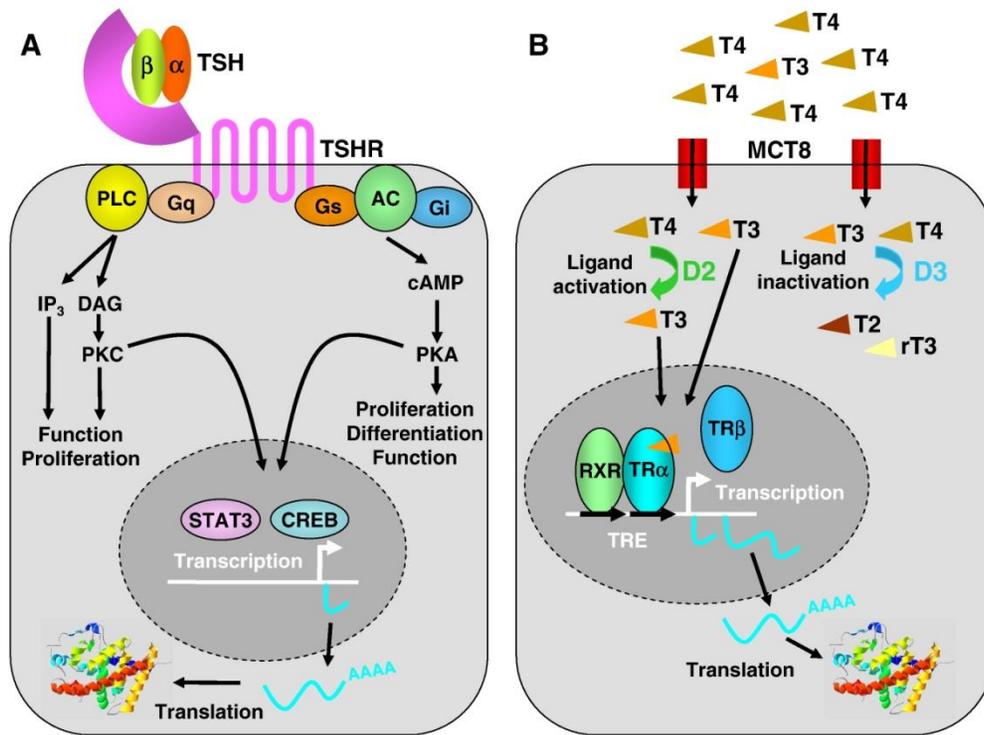


Figura 2. Panel A: la acción de TSH. La unión de TSH al ectodominio TSHR conduce a la activación del dominio de serpentina. Las parejas de TSHR a diferentes proteínas G incluyendo G_s, G_{αq} and G_{αi} para activar las vías de señalización corriente abajo tales como la adenilato ciclasa y el AMPc y la proteína quinasa A o la fosfolipasa C e inositol trifosfato o la proteína quinasa C, que dan lugar a la regulación del crecimiento de células foliculares tiroideas, la diferenciación y la síntesis de hormonas. Panel B: acción de la hormona tiroidea. Las T4 y T3 entran en la célula a través de MCT8. La enzima D2 que convierte T4 a T3 mientras que D3 inactiva T4 y T3. Acción T3 está mediada por TRs, que se heterodimerizan con los receptores de retinoides X (RXR) y regulan la transcripción de genes de T3-diana. Tomado de Bassett y Williams 2008.

1.1.2 Hipotiroidismo y útero

El hipotiroidismo afecta del 5-10% de la población femenina en edad fértil y se ha asociado con alteraciones reproductivas como irregularidades menstruales, especialmente oligomenorrea. Este también se relaciona con una alta prevalencia de abortos (Laurberg y cols. 2013; Carney y cols. 2014). En modelos animales, el hipotiroidismo, inducido mediante tiroidectomía o farmacológicamente, inhibe las contracciones rítmicas uterinas mediante la reducción de Ca^{2+} en el miometrio y altera el ciclo estral en la rata (Parija y cols. 2006; Inuwa y Williams 1996). En conejas, el hipotiroidismo induce hiperplasia uterina, lipoperoxidación e infiltración de linfocitos en el epitelio uterino (Rodríguez-Castelán y cols. en escritura). Además, los animales hipotiroideos muestran una menor expresión de receptores de progesterona y estradiol en el útero, así como una mayor expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (Rodríguez-Castelán y cols. en escritura).

El endometrio y miometrio de mujeres y conejas expresan receptores de hormonas tiroideas ($TR\alpha 1$, $TR\alpha 2$ y $TR\beta 1$), así como receptores de tirotropina (TSHR) (Aghajanova y cols. 2011; Rodríguez-Castelán y cols. 2017). Además, el endometrio cuenta con enzimas desyodasas (D2 y D3) que participan en la conversión de T4 a T3 o la degradación de T3 (Deng y cols. 2014). La síntesis de hormonas tiroideas en el útero y la presencia de sus receptores sugieren que dichas hormonas podrían tener acciones relevantes para la función uterina.

1.2 Importancia de los carbohidratos en el útero gestante

El útero en la mujer es un órgano en forma de pera, compuesto de un fondo, cuerpo, istmo y cérvix. El papel del útero es nutrir al feto hasta el parto. Funcionalmente se compone de un cuello uterino inferior que actúa en diferentes momentos como una vía de paso, barrera, depósito y una parte superior del cuerpo en el que se desarrolla el feto. Tiene tres capas: serosa, miometrio y endometrio. La serosa está formada por el peritoneo. El miometrio es la capa media y se compone de músculo liso con tejido areolar vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. El endometrio o capa interna del útero está revestida por epitelio cúbico. Este contiene muchas glándulas que se abren en la cavidad uterina y secretan moco (Abbas y cols. 2010; Figura 3).

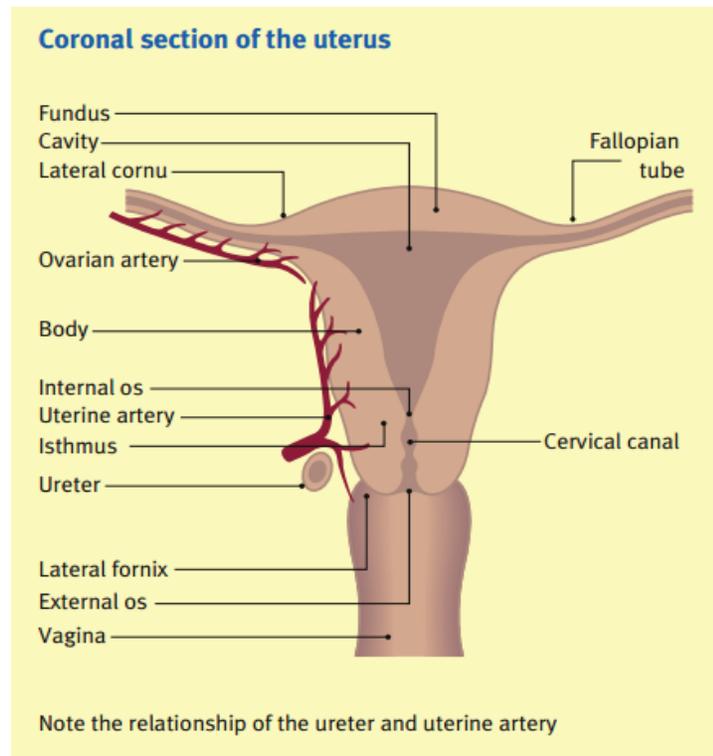


Figura 3. Componentes del útero. Los tubos uterinos (Falopio) entran en cada ángulo superior lateral, denominado cornu, por encima de la cual se encuentra el fondo. El cuerpo uterino se estrecha a una cintura (el istmo), el cuál continúa como el cérvix. Este último es sujetado por la vagina conformándose la parte supravaginal y vaginal del cérvix. Modificado de Ellis 2008.

La implantación y el desarrollo del embrión en el útero requieren que células del estroma endometrial pasen por el proceso de decidualización (reorganización del endometrio). Ésta reorganización es promovida por la penetración del trofoblasto al epitelio luminal. Así, en los seres humanos y roedores, la implantación implica la llegada del blastocisto y la adhesión del mismo al epitelio luminal, seguido por la penetración y el crecimiento del trofoectodermo en el estroma decidualizado (Dey y cols. 2004). La implantación del trofoblasto requiere de la participación de mucinas, selectinas y galectinas, así como de proteoglicanos y cadherinas contenidas en el epitelio luminal (Brayman y cols. 2004). El resultado final de la decidualización es la formación de un tejido morfológico y funcional distinto que produce hormonas, evita el rechazo del embrión, nutre al feto y regula la placentación. Así, la decidua constituye el lado materno de la interfaz materno-fetal que participa en el intercambio de moléculas entre los tejidos necesarios para la gestación. Otras estructuras importantes en la implantación y

conservación de la gestación son las glándulas uterinas y sus secreciones (Filant y cols. 2012; 2013). La falta de glándulas uterinas o la reducción de su tamaño subyacen a fallas en la implantación del blastocisto (Jeong y cols. 2010). Bajo la influencia de las hormonas gonadales (estradiol y progesterona) el epitelio luminal, el epitelio glandular y el estroma expresan genes importantes para la implantación de blastocisto, incluyendo la secreción de citoquinas, factores de crecimiento, prostaglandinas, factores de transcripción y mediadores del metabolismo (Wang y Dey 2006).

El crecimiento y desarrollo embrionario-fetal requiere de aminoácidos, glucosa, ácidos grasos, vitaminas y minerales. Los ácidos grasos y la glucosa son las principales fuentes de energía para el embrión/feto. Antes de la placentación, estos nutrientes son aportados por el epitelio luminal y glandular; y, posteriormente, son suministrados por la sangre materna a través de los vasos sanguíneos presentes en el endometrio en conexión con la circulación umbilical (Wu y cols. 2009). Así, el endometrio requiere de la glucosa para el proceso de decidualización y el desarrollo embrionario; mientras que el trofoblasto logra fijarse a la vasculatura materna. Las células del endometrio expresan enzimas que participan en la glucólisis como la piruvato cinasa, la cual participa en la formación de piruvato durante la glucólisis; la glucosa-6-fosfato isomerasa, la cual convierte a la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato; la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que participa en la ruta de las pentosas; y la lactato deshidrogenasa que convierte el lactato a piruvato. Estas enzimas aumentan con la gestación y su bloqueo inhibe el proceso de decidualización (Schulz y Bahr 2004; Frolova y cols. 2011).

El endometrio tiene transportadores de glucosa GLUT1, GLUT4, GLUT8 y GLUT9b, los cuales son aumentados en el estroma decidualizado; mientras que el GLUT12 es disminuido (Frolova y cols. 2008; McKinnon y cols. 2014). La expresión de GLUT1 es menor en el sitio del estroma entre implantes, lo que sugiere una función asociada con la implantación (Frolova y cols. 2008). La glucólisis en el endometrio es regulada por estradiol (Salama y cols. 2014). La progesterona aumenta la expresión GLUT1 favoreciendo la captura de glucosa por las células deciduales; mientras que el estradiol la reduce (Frolova y cols. 2008). La glucosa puede ser metabolizada a través de la vía de las pentosas fosfato para producir ribosa con una liberación concomitante de carbono en forma de CO₂. Cuando la glucosa se metaboliza a través de la ruta

de Embden-Meyerhof vía anaeróbica, cada molécula de glucosa produce dos moléculas de piruvato. El piruvato puede ser transformado a lactato, o bien, ser convertido en oxalacetato y entrar al ciclo de Krebs (Larrabee 1989; Figuras 4A y B).

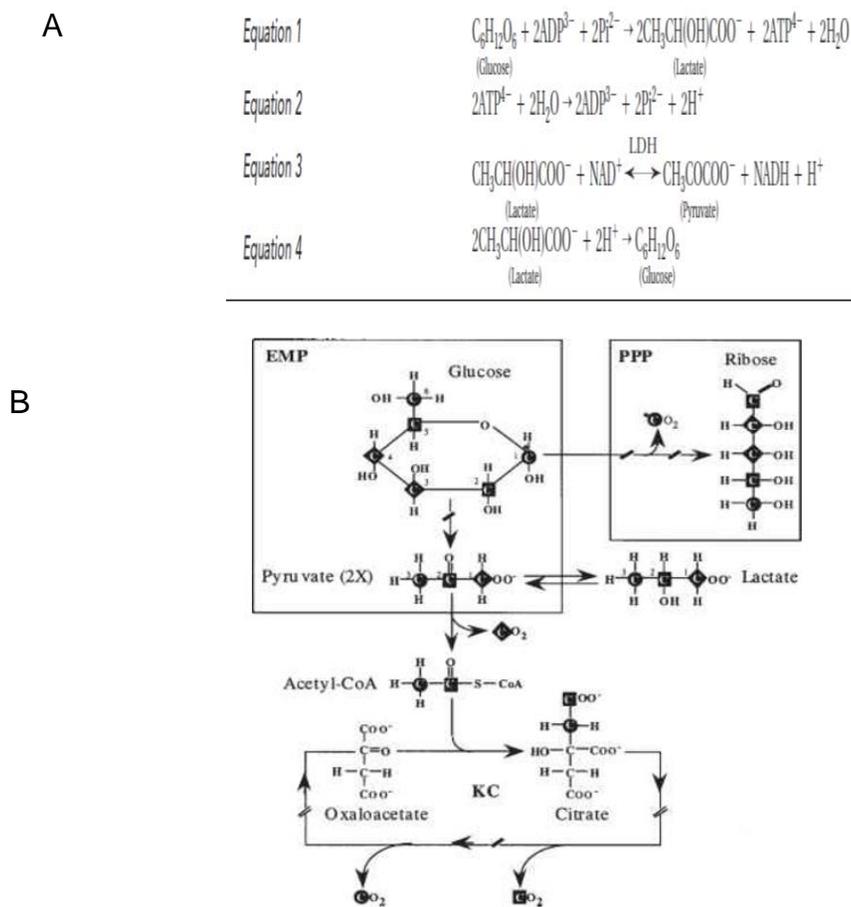


Figura 4. (A) Conversión de la glucosa a lactato, generándose 2 moléculas de ATP. La reacción de conversión de piruvato a lactato es reversible a través de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). El lactato oxida a la nicotinamida adenina dinucleotido (NAD) para formar piruvato, nicotinamida adenina dinucleotido reducido (NADH) y un protón. La gluconeogénesis a partir del lactato se lleva a cabo en el hígado y riñón. Tomado de Sun y cols. 2017. (B) El destino de los átomos de carbono de glucosa, piruvato y lactato metabolizados a través de la ruta de Embden-Meyerhof (EMP), la vía de pentosa-fosfato (PPP) y el ciclo de Krebs (KC). Las líneas discontinuas indican dos o más reacciones. Tomado de Larrabee 1989.

El endometrio es capaz de almacenar la glucosa en forma de glucógeno, el cual usa como reserva para su uso en caso de que la gestación ocurra (Dean y cols. 2014). Así, el epitelio glandular contiene más glucógeno que el epitelio luminal (Rose 2011). El contenido de glucógeno en el endometrio depende de estradiol, mediante la regulación de la glucógeno sintetasa; mientras que la progesterona promueve su catabolismo (Bowman y Rose 2016). Así, el contenido de glucógeno en el endometrio es mayor durante el proestro y se moviliza durante la implantación y el embarazo (Dean y cols. 2014). El contenido de glucógeno uterino de mujeres estériles o aquellas que presenten abortos espontáneos es menor que aquellas mujeres sin problemas en la gestación (Zawar y cols. 2003). Las mujeres diabéticas pueden tener problemas de abortos debido a que hay resistencia a la insulina y la glucosa no entra en cantidades suficientes al endometrio. Además, la hiperglucemia se asocia con menor vascularización del endometrio (Zabrodina y cols. 2014) y mayor estrés oxidativo (Karja y cols. 2006).

En caso de que la glucosa no se almacene en forma de glucógeno y continúe su ruta de glucólisis se formará piruvato. Este es transferido desde el citosol hasta la matriz mitocondrial mediante proteínas transportadoras de piruvato mitocondrial (Bricker 2012). Para seguir la ruta oxidativa, la piruvato deshidrogenasa transforma al piruvato en acetil-coenzima A, permitiendo la entrada de etilo en el ciclo del ácido tricarboxílico (figura 4B). Para iniciar la vía de la gluconeogénesis, la piruvato carboxilasa enzima cataliza la conversión de piruvato en oxaloacetato (Kreisberg 1980). El oxaloacetato por oxidación mitocondrial es convertido en dióxido de carbono y agua (Steingrimsdottir y cols. 1993). En ratones y humanos, el 50% de la glucosa consumida por el blastocisto no se oxida, sino que se convierte en lactato (Gardner y Leese 1987; Gott y cols. 1990). El cigoto no puede utilizar la glucosa como fuente única de energía, sino que requiere piruvato o suficiente aspartato y lactato para obtener la primera división de la segmentación (Leese y cols. 1984). Durante las primeras 48 horas de vida, el blastocisto depende más del lactato (Gardner y Wale 2013) y conforme avanza el proceso en la implantación se hace más dependiente de la glucólisis (Clough y Whittingham, 1983).

El lactato es producido o eliminado por una reacción de óxido-reducción reversible catalizada por la enzima (LDH) que se encuentra principalmente en el citosol. En la etapa tardía del blastocisto y durante las primeras fases de la implantación hay un interruptor en las isoformas del LDH-B a LDH-A, lo que favorece la formación de piruvato (Auerbach y Brinster 1967). El estrógeno inhibe la actividad de LDH en el moco cervical, mientras que la progesterona la promueve (Takehisa 1980). Conforme avanza el desarrollo, la cantidad de lactato producido por el blastocisto se incrementa significativamente (Clough y Whittingham 1983). Este ambiente ácido favorece la angiogénesis y la inmunoregulación facilitando así la implantación exitosa (Gardner 2015).

Los MCT facilitan el movimiento de lactato dentro y fuera de las células (Halestrap y Wilson 2012). Se han reportado cuatro isoformas de MCT (1, 2, 3 y 4; Dimmer y cols. 2000). El MCT4 es inducido en células deciduales recién formadas, mientras que el MCT1 y el marcador de proliferación Ki-67 son localizados complementariamente rodeando las células indiferenciadas suponiendo consumo de lactato para la proliferación (Zuo y cols. 2015). Por su parte, el receptor de lactato GPR81 se expresa en el útero y su expresión aumenta durante el embarazo (Madaan y cols. 2017). Dicho receptor también es conocido como receptor de ácidos tricarboxílicos (HTAR), o bien, GPR81/HTA1, que junto con otros receptores de ácidos grasos (FFAR) modula la síntesis de metaloproteinasas, lactoferrina, formación de radicales libres, angiogénesis, producción de mediadores pro-inflamatorios y quimiotaxis de las células inmunes (Sun y cols. 2017; Alarcon y cols. 2018; Ranganathan y cols. 2018). El GPR81/HTA1 también ha sido involucrado en proliferación, supervivencia de células pancreáticas y mamarias, así como en el cáncer cervicouterino (Wagner y cols. 2017; figura 5).

El endometrio también puede almacenar la glucosa en forma de glucosaminoglicanos, como la glucosamina, el ácido glucurónico y el ácido idurónico. Un metabolito intermediario de la conversión de glucosa a glucosamina es la fructosa. La fructosa es capaz de regular la proliferación del trofoblasto (Vallet y cols. 2014). La fructuosa es transportada pasivamente a través de membranas por el GLUT 5 y el GLUT2 (Douard and Ferraris 2008; figura 6).

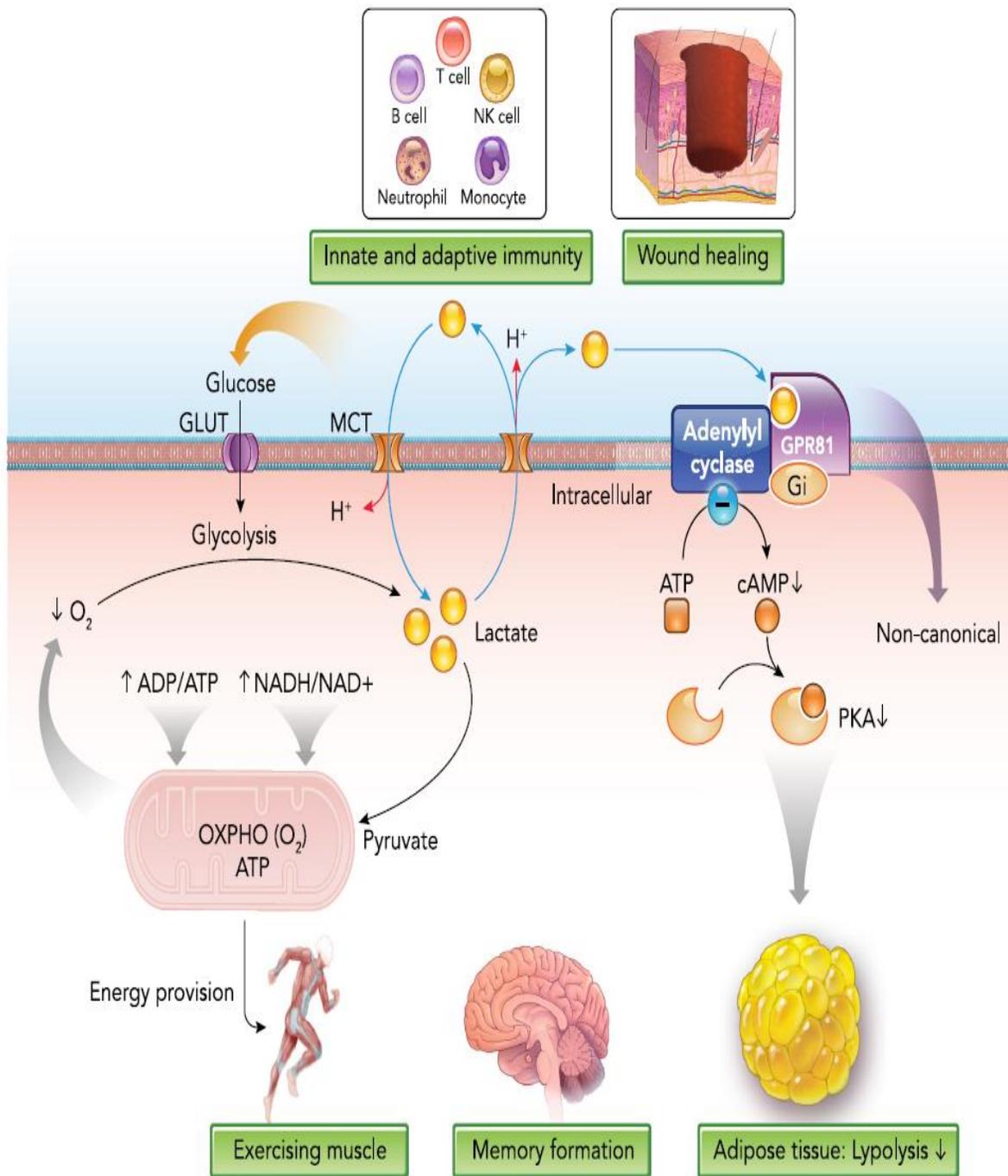


Figura 5. El ácido láctico, MCTs y GPR81 participan en la lipólisis del tejido adiposo, la formación de NADH/NAD y ADP/ATP en el músculo esquelético y la posterior generación de ATP mediante la fosforilación oxidativa. El ácido láctico participa en la cicatrización de heridas, tolerancia inmunitaria, anti-inflamación y formación de la memoria a largo plazo en el cerebro. Muchas de estas acciones son mediadas a través de su receptor GPR81. Tomado de Sun y cols. 2017.

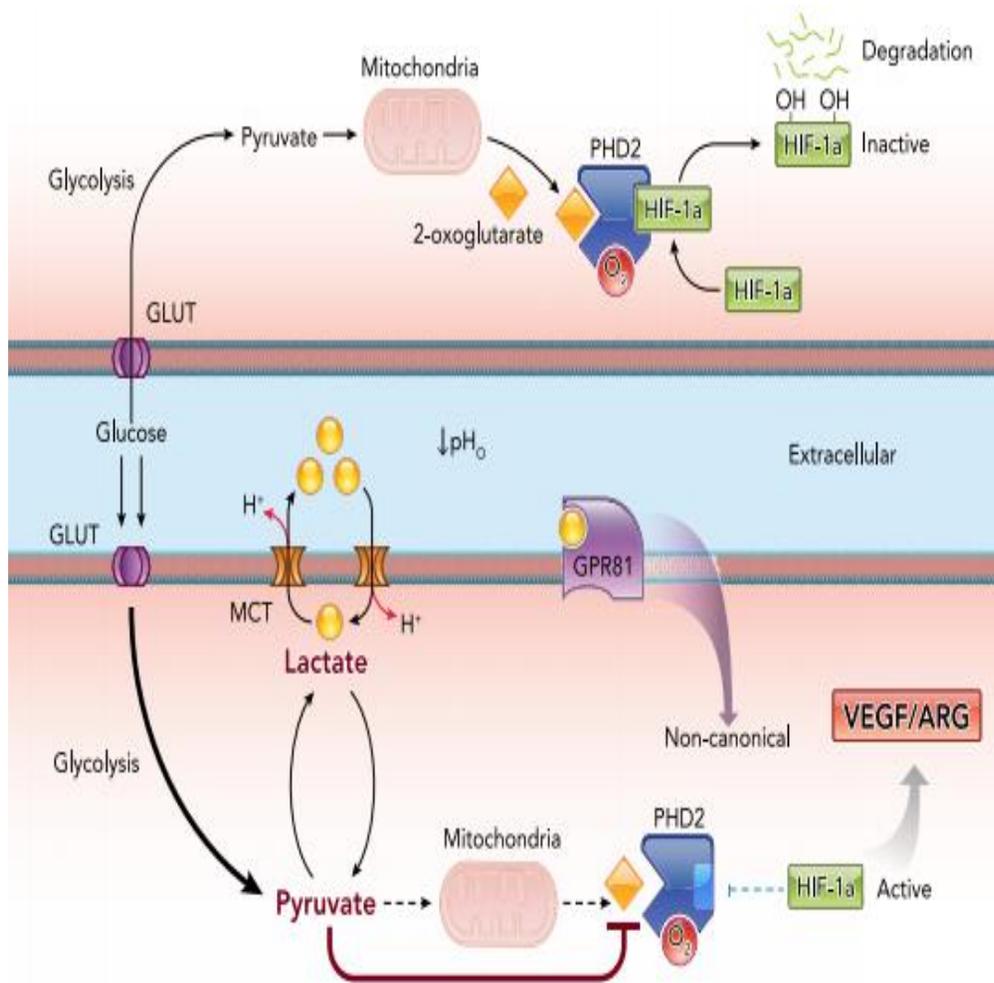


Figura 6. Acciones del ácido láctico en células normales y cancerosas. En las células cancerosas el lactato después de la conversión a piruvato se une a prolil hidroxilasa y activa HIF-1 α en la presencia de O₂ induciendo angiogénesis. Tomado de Sun y cols. 2017.

Una tasa alta de glucólisis es un sello metabólico de cáncer, mientras que la glucólisis anaeróbica promueve la producción de energía bajo condiciones de hipoxia, la glucólisis aeróbica, el efecto Warburg ofrece una ventaja proliferativa al redirigir los flujos de carbohidratos desde la producción de energía a las vías biosintéticas (Dhup y cols. 2012). Para cumplir con las necesidades de células tumorales, el interruptor glucolítico se asocia con una elevada captación de glucosa y liberación de ácido láctico, los MCT1 y MCT4 se han confirmado como facilitadores prominentes de los intercambios de lactato entre las células

cancerosas con diferentes comportamientos metabólicos entre el cáncer y las células del estroma (Dhup y cols 2012). Las células cancerosas usan los MCT para transportar ácido láctico. Así, los MCT1 y MCT4 se expresan fuertemente en varios tipos de cáncer, el flujo del ácido láctico a través de los MCT contribuye a la reversión característica del gradiente de pH. Un pH extracelular ácido y un pH intracelular neutro o alcalino en los tumores (Sun y cols. 2017).

1.3 Diabetes gestacional (DMG)

La gran mayoría de mujeres con diabetes mellitus pre-gestacional, ya sea de tipo 1 o 2, conocen la existencia de su padecimiento antes del embarazo. Sin embargo, entre el 4-14% de mujeres son detectadas con hiperglucemia por primera vez durante el embarazo, lo cual por definición correspondería a una Diabetes Mellitus Gestacional (DMG). Según el origen étnico, la incidencia de DMG en mujeres caucásicas es de 0.4%, en mujeres negras de 1.5%, en mujeres asiáticas de 3.5%-7.3%, en mujeres de India subcontinental de 4.4% y en mujeres nativas de América de 16%, siendo mayor en mujeres con más de 25 años de edad. En México, la prevalencia de DMG es de 8.7 a 17.7% (IMSS 2016).

Más de 90% de los casos de diabetes que complican a un embarazo son casos de DMG. En la última década se ha visto un aumento significativo en mujeres en edad fértil. Los cambios fisiológicos que impone el embarazo dificultan el control de la misma. Las pacientes que cursan con DMG presentan mayor riesgo de complicaciones maternas y fetales (Araya 2009), presentando un estado inflamatorio exagerado y generando alteraciones a nivel de arterias espirales uterinas lo que conlleva a preeclampsia. Todo ello es consecuencia de un mayor número y activación de los macrófagos a nivel uterino (Marijke y cols. 2014). Lo anterior también se asocia con malformaciones congénitas (4 a 10 veces más), macrosomía, prematuridad, hipoglucemia, hipocalcemia, ictericia, síndrome de estrés respiratorio y muerte fetal, y, por consecuencia, incremento de la mortalidad neonatal hasta 15 veces más (Negrato 2012). La diabetes pre-existente o pre-gestacional expone al feto a concentraciones elevadas de glucosa, durante el primer trimestre del embarazo, incrementando el riesgo de malformaciones congénitas a nivel de sistema nervioso central, cardiovascular, renal y músculo esqueléticas,

entre otras, con alta probabilidad de abortos espontáneos (Araya 2009). Además, los hijos de madres diabéticas podrían tener consecuencias a largo plazo como enfermedad coronaria, hipertensión arterial crónica, dislipidemia, obesidad y diabetes mellitus tipo 2, todo como resultado de los cambios en el desarrollo de tejidos y órganos clave en condiciones intrauterinas adversas (Clausen 2008; Amair 2012). Los efectos adversos de la hiperglucemia en el feto son diversos no solo en la morbilidad sino también en la mortalidad perinatal. La probabilidad de malformaciones y abortos tiene una relación lineal con la concentración de glucosa plasmática de la madre, expresada en la concentración de hemoglobina glucosilada (HbA1c) y este riesgo excesivo se puede reducir cuando la madre mantiene un buen control glucémico en el primer trimestre del embarazo (Management of Diabetes 2013). Las mujeres con DMG tienen un bajo contenido de oxígeno a nivel uterino y umbilical, lo que genera sufrimiento fetal. La hipoxia induce un aumento de lactato uterino para combatir el proceso inflamatorio (Akerud y cols. 2009; Nagalakshmi y cols. 2016). Este aumento de lactato también ha sido observado en otras alteraciones uterinas asociadas con inflamación como lo es la infección uterina (metritis; Dervishi y cols. 2016a) o retención placentaria (Dervishi y cols. 2016). En todos los casos, el aumento de lactato se observa un aumento en las concentraciones de citocinas (interleucina 6, IL6; y factor de necrosis tumoral, TNF) y amilina (Gardner y cols. 2015).

2. ANTECEDENTES

2.1 Hipotiroidismo y diabetes gestacional (DMG)

Las acciones de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo de la glucosa son diversas. Las hormonas tiroideas son mediadores importantes de la homeostasis de la glucosa. Las hormonas tiroideas regulan la secreción y los niveles circulantes de insulina, la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepática, así como la captación de glucosa intestinal. Las hormonas tiroideas también regulan la transcripción de varios genes implicados en el metabolismo de la glucosa (McAninch y Bianco 2014). Durante la gestación se incrementan los niveles séricos de glucosa aumentando significativamente en el tercer trimestre del embarazo. Esto predispone a las mujeres a la hiperglucemia del embarazo o a la DMG (Zannat y cols. 2006).

Las mujeres embarazadas con hipotiroidismo tienen resistencia a la insulina y, por lo tanto, tienen un mayor riesgo de presentar DMG (Gong y cols. 2016). Parte de los efectos que el hipotiroidismo tiene como inductor de DMG podrían estar relacionados con sus acciones a nivel del metabolismo de la glucosa, el almacenamiento del glucógeno y la conversión de la glucosa a otros metabolitos como el piruvato o el lactato. A este respecto, el hipotiroidismo genera diversas alteraciones en el metabolismo de la glucosa y el almacenamiento del glucógeno en diversos tejidos. Ésta disfunción tiroidea afecta la expresión de enzimas como la glucocinasa y GLUT1, GLUT2 y GLUT4 en órganos como el páncreas, corazón y tejido adiposo marrón (Castello y cols. 1994). La influencia del hipotiroidismo sobre los niveles circulantes de glucosa e insulina son controversiales, algunos autores muestran una disminución de estos indicadores (Diaz y cols. 1993; Mazaki-Tovi y cols. 2010) y otros no (Rodríguez-Castelán y cols. 2015). Como podemos apreciar las hormonas tiroideas tienen una participación importante en la regulación de la glucólisis y la entrada de la glucosa a las células uterinas.

2.2 Hipotiroidismo y embarazo

El hipotiroidismo también afecta el número y la fuerza de las contracciones uterinas en perras (Panciera y cols. 2007). En hembras gestantes (rata y conejas), el hipotiroidismo inducido aumenta la concentración de los receptores de estrógenos (Keeping y cols. 1982). El hipotiroidismo disminuye la talla de los fetos, el desarrollo de los vasos sanguíneos, células

inmunes y la apoptosis de las células de la placenta (Silva y cols. 2012; Rodríguez-Castelán y cols. enviado). A pesar de estas observaciones, poco se ha indagado sobre los mecanismos que subyacen al efecto del hipotiroidismo en el útero durante la gestación. A pesar de ello, no existen modelos animales que analicen la relación entre hipotiroidismo y DMG.

3. JUSTIFICACIÓN

El hipotiroidismo afecta a la población femenina relacionada con una alta prevalencia de abortos (Laurberg y cols. 2013; Carney y cols. 2014; Colicchia y cols. 2014), afecta a la decidualización e implantación del embrión (Banovac y cols. 1986; Kennedy y Doktorcik 1988). Se desconocen los mecanismos involucrados en dichos efectos. Considerando que el hipotiroidismo se asocia con DMG en humanos (Gong y cols. 2016) y genera diversas alteraciones en el metabolismo de la glucosa y el almacenamiento del glucógeno en diversos tejidos (Castello y cols. 1994), y que el contenido de glucógeno uterino se asocia con abortos espontáneos (Zawar y cols. 2003), y alteraciones de la decidualización y desarrollo embrionario (Zuo y cols. 2015), es posible suponer que el hipotiroidismo podría afectar los niveles de glucosa en sangre, así como el metabolismo de la glucosa en el útero de conejas gestantes.

4. HIPÓTESIS

El hipotiroidismo induce DMG afectando la concentración de glucosa en suero sanguíneo, el contenido de glucógeno y la expresión de LDH en el útero de conejas no gestantes y gestantes de la raza Chinchilla Europea.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si el hipotiroidismo afecta los niveles de glucosa en sangre, así como el contenido de glucógeno y lactato en el útero de conejas de la raza Chinchilla Europea no gestantes y gestantes primíparas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En conejas de la raza Chinchilla Europea no gestantes y gestantes (días 5, 10 y 20) controles e hipotiroideas:

1. Medir la concentración de glucosa en suero sanguíneo de conejas.
2. Cuantificar el contenido de glucógeno en μg de glucosa oxidada/g de tejido.
3. Analizar el contenido de glucógeno en las células uterinas mediante tinción de ácido peryódico de Schiff.
4. Analizar la expresión de la LDH en el útero mediante inmunohistoquímica.

6. METODOLOGÍA

Animales. Se utilizaron conejas de la raza chinchilla-Europea de 8-10 meses de edad con un peso de 3.8-5.0 kg. Éstas fueron alojadas individualmente en jaulas de acero inoxidable a 20 ± 2 °C de temperatura bajo condiciones de luz artificial (16:8 h luz: oscuridad, luces encendidas a las 06: 00), alimento (120 g de pellets Chow Conejina Purina, previo a la gestación y 300 g en el embarazo) y agua ad libitum. Para el análisis de útero, se tuvieron animales vírgenes y gestantes (día 5, 10 y 20), divididos en dos grupos controles (n=6) e hipotiroideos (n=6) (Figura 7).

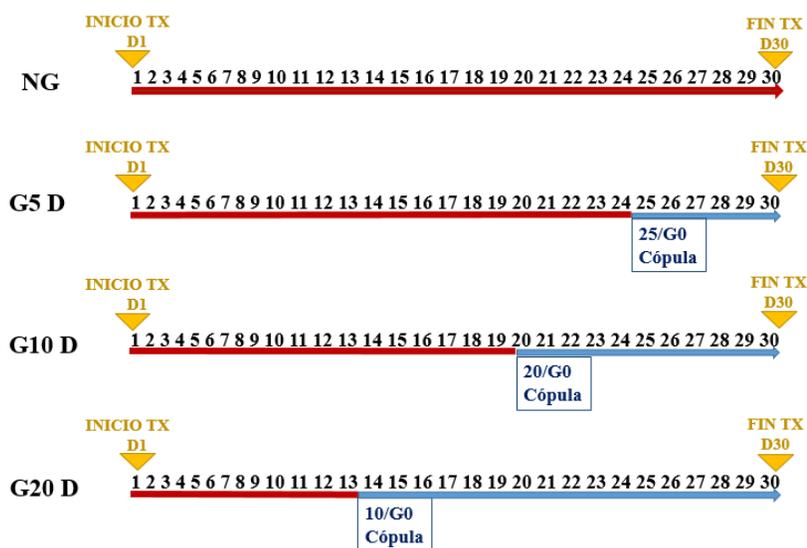


Figura 7. Tratamiento de animales. Tratamiento de 30 días en conejas controles (consumo de agua potable) e hipotiroideas (consumo de agua potable con una concentración de 0.02% metimazol) no gestantes (NG) y gestantes durante la implantación (G5 D), placentación (G10 D) y degeneración de cuerpo lúteo (G20 D).

Hipotiroidismo. Se indujo mediante tratamiento con el fármaco anti-tiroideo metimazol, el cual fue administrado en agua potable bebida durante treinta días a una concentración de 0.02% (dosificación aproximada 10 mg/kg; Anaya y cols. 2015). Los animales gestantes hipotiroideos tuvieron un mes de tratamiento con metimazol, ajustando los días previos a la cópula y de gestación, según cada grupo. Al final de este tratamiento las conejas fueron anestesiadas con sodio pentobarbital (90 mg/kg) y posteriormente eutanzadas con una sobredosis del mismo anestésico. El Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Tlaxcala,

según las directrices del Derecho mexicano para la Producción, el Cuidado y Animales de Laboratorio de Empleo, aprobó este diseño experimental.

Determinación de glucosa en suero. Se obtuvo sangre por medio de punción cardiaca, se separó el suero y se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso. Se colocaron $3\text{ }\mu\text{l}$ de suero de muestra de suero sanguíneo y se agregó un volumen de $300\text{ }\mu\text{l}$ del Kit (Glucosa, ELITech Clinical Systems). Se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro y se calculó la concentración de glucosa en mg/dL .

Cuantificación de glucógeno en útero. Se utilizó un trozo de útero derecho (interimplante o sin implante; aproximadamente de 0.5 cm) congelado. El tejido se mantuvo en hielo seco y con ayuda de un bisturí se cortó en trozos pequeños. En un tubo pesado con $300\text{ }\mu\text{l}$ de ácido clorhídrico ($\text{HCl } 2\text{M}$), se echó el tejido y se trituró. El tubo se volvió a pesar y se puso a hervir por 1 h , agitando el tubo cada 10 min . Este procedimiento fue repetido usando hidróxido de sodio ($\text{NaOH } 2\text{N}$). El contenido se centrifugó a 10 rpm por durante 5 min . El sobrenadante de la muestra fue utilizado para medir el contenido de glucosa oxidada. Se consideró un volumen de $300\text{ }\mu\text{l}$ del Kit (Glucosa PAP SL, ELITech Clinical Systems), agregando $3\text{ }\mu\text{l}$ de agua (muestra blanco) o $3\text{ }\mu\text{l}$ de la muestra. Se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro 5 minutos después de haber realizado la combinación. Las muestras se hicieron por duplicado. El contenido de glucosa fue determinado usando la fórmula:
$$\frac{[\text{absorbancia de la muestra} / \text{absorbancia estándar}] [5.5\text{ nM}] [\text{volumen estándar}] [\text{volumen total}]}{[\text{volumen total} / \text{volumen de la muestra}] / \text{peso del tejido}} * 100$$

Tinción de glucógeno en útero. Una vez que los cortes fueron desparafinados y rehidratados se enjuagaron con agua destilada. Se colocaron sobre el corte 10 gotas de ácido peryódico y reaccionaron durante 10 min . Los cortes fueron lavados con agua destilada. Posteriormente se añadieron a cada corte 10 gotas de reactivo de Schiff y se dejó reaccionar durante 20 minutos . El colorante fue retirado y lavado con agua destilada. Se cubrió el corte con 10 gotas de solución de potasio metabisulfito y se dejó reaccionar durante 2 min . Se dejó escurrir el portaobjetos y fueron depositadas sobre el corte 10 gotas de solución fijadora, dejando reaccionar durante 2 minutos . Se lavó con agua destilada. Fueron depositados sobre el corte 10

gotas de Hematoxilina de Mayer dejando reaccionar durante 3 min y virando en agua corriente durante 5 min. Se contaron analizaron 12 campos (+: poco, ++: moderado, +++: abundante).

Inmunohistoquímica de LDH en útero. Los úteros medios izquierdos de conejas controles e hipotiroideas vírgenes y grávidas (implantación) fueron fijados en una solución de Bouin-Duboscq por 12 h. Los tejidos fueron deshidratados con alcoholes en concentración ascendente (60-100%) e incluidos en parafina. Con un micrótopo se realizaron cortes de útero transversales a 5 μ m y se colocaron 6 cortes en una laminilla. Los cortes de útero fueron observados con un microscopio para el posterior análisis histológico. Una laminilla de útero de una coneja fue utilizada para realizar la técnica de inmunohistoquímica en base al método avidina-biotina-peroxidasa (ABC), donde los cortes, 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-LDH (ab55433; abcam; 1:50) en una cámara húmeda a 4°C durante tres noches. Seguido de ello, los cortes fueron incubados con un anticuerpo secundario Goat anti mouse biotinilado (1:250; SANTA CRUZ, BIOTECHNOLOGY) durante 2 h a temperatura ambiente. Después, los cortes se lavaron con una solución buffer de fosfatos (PBS; pH= 7.2) y fueron incubados con el ABC durante 1 h. Para luego realizar el revelado con una solución de diaminobenzidina (DAB) al 0.05% y H₂O₂ al 3% en PBS hasta localizar el marcaje en el útero (capa epitelial, submucosa, músculo y células inmunes). Los cortes se deshidrataron en alcoholes a concentraciones ascendentes y fueron cubiertos con Cytoseal TM 60 y un cubreobjetos. Para determinar la inmunolocalización y descripción de la presencia de LDH en el útero, se observó el tejido con un microscopio de luz visible (Nikon ECLIPSE E600), se realizó una semi-cuantificación de células positivas y negativas por campo.

Estadística. Los valores obtenidos de las diferentes variables utilizadas fueron analizados mediante una prueba ANOVA de 2 vías usando el programa GBstat. Los valores de glucógeno en los sitios de implante fueron analizados con pruebas t de Student.

7. RESULTADOS

Glucosa en suero y glucógeno en hígado y útero. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de glucosa en suero a lo largo de la gestación ni por efecto del hipotiroidismo (figura 8A). En el grupo control, el contenido de glucógeno en el hígado fue mayor en el grupo G20 en comparación con el resto de los grupos. Para los animales hipotiroideos, el contenido de glucógeno en el hígado fue mayor en los animales NG y en el G20 en comparación con los días G5 y G10. No se encontraron diferencias entre los tratamientos en ningunos de los grupos (figura 8B). En el útero sin implante, la gestación redujo el contenido de glucógeno solo en el grupo G5 (figura 8C). Sin embargo, el hipotiroidismo mostró valores de glucógeno significativamente altos en los grupos G10 y G20. El hipotiroidismo aumentó la concentración en G20 respecto al grupo control (figura 8C). En los sitios con implante, el hipotiroidismo aumentó la concentración de glucógeno en G10 y G20 respecto a los controles (figura 8D).

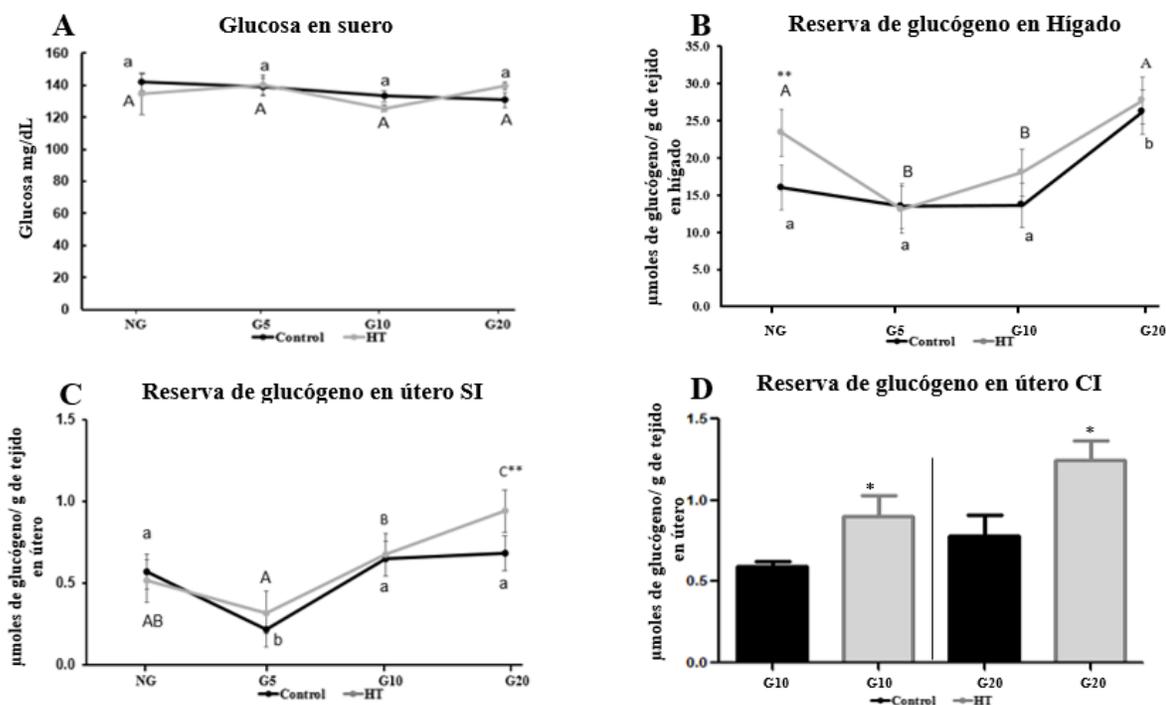


Figura 8. Concentración de glucosa y glucógeno en conejas no gestantes (NG) y gestantes durante la implantación (día 5), placentación (día 10) y degeneración de cuerpo lúteo (día 20). En grupos controles (negro) e hipotiroideas (gris) se midió la glucosa en suero sanguíneo (A), y la concentración de glucógeno en hígado (B), en útero sin implante (C) y con implante (D).

La tinción de PAS mostró una distribución de glucógeno en el epitelio luminal, glandular y en la musculatura uterina en los animales no gestantes y gestantes. En los grupos no gestantes el hipotiroidismo parece disminuir la secreción de carbohidratos neutros tanto en el epitelio luminal como glandular (figura 9). Un efecto similar es observado en los grupos G20. Con la tinción de PAS no fue posible distinguir grandes cambios en la cantidad de glucógeno entre controles e hipotiroideos (tabla 1). La tinción de glucógeno en los sitios de implante también mostró un aumento en el contenido de este compuestos en diferentes tipos celulares, particularmente en el día 10 de gestación (figura 10; tabla 2).

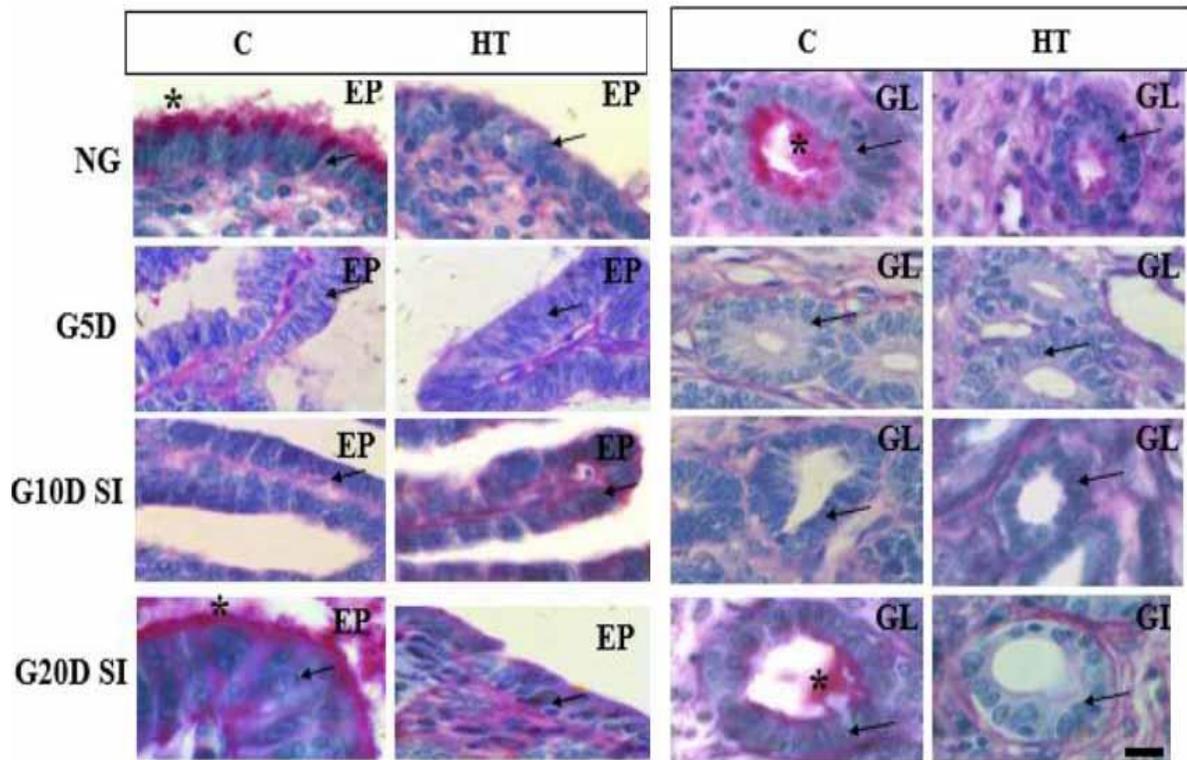


Figura 9. Tinción de glucógeno en útero (epitelio luminal, EP y glandular, EG) de conejas no gestantes (NG) y gestantes durante la implantación (G5D), placentación sin implante (G10D SI) y degeneración de cuerpo lúteo sin implante (G20D SI) controles (C) e hipotiroideas (H).

| | | NG | G5 | G10 | G20 |
|--------------------|---------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| Epitelio Luminal | Control | +++ | + | + | +++ |
| | Hipotiroideo | + | + | + | + |
| Epitelio Glandular | Control | +++ | + | + | ++ |
| | Hipotiroideo | + | + | + | + |
| Tejido Conectivo | Control | + | + | + | + |
| | Hipotiroideo | + | + | ++ | ++ |
| Músculo | Control | + | + | + | + |
| | Hipotiroideo | + | + | + | + |
| Musculo Circular | Control | + | + | + | + |
| | Hipotiroideo | + | + | ++ | ++ |

Tabla 1. Semicuantificación de glucógeno en útero sin implante de conejas no gestantes (NG) y gestantes durante la implantación (G5D), placentación sin implante (G10D SI) y degeneración de cuerpo lúteo sin implante (G20D SI) de controles e hipotiroideas.

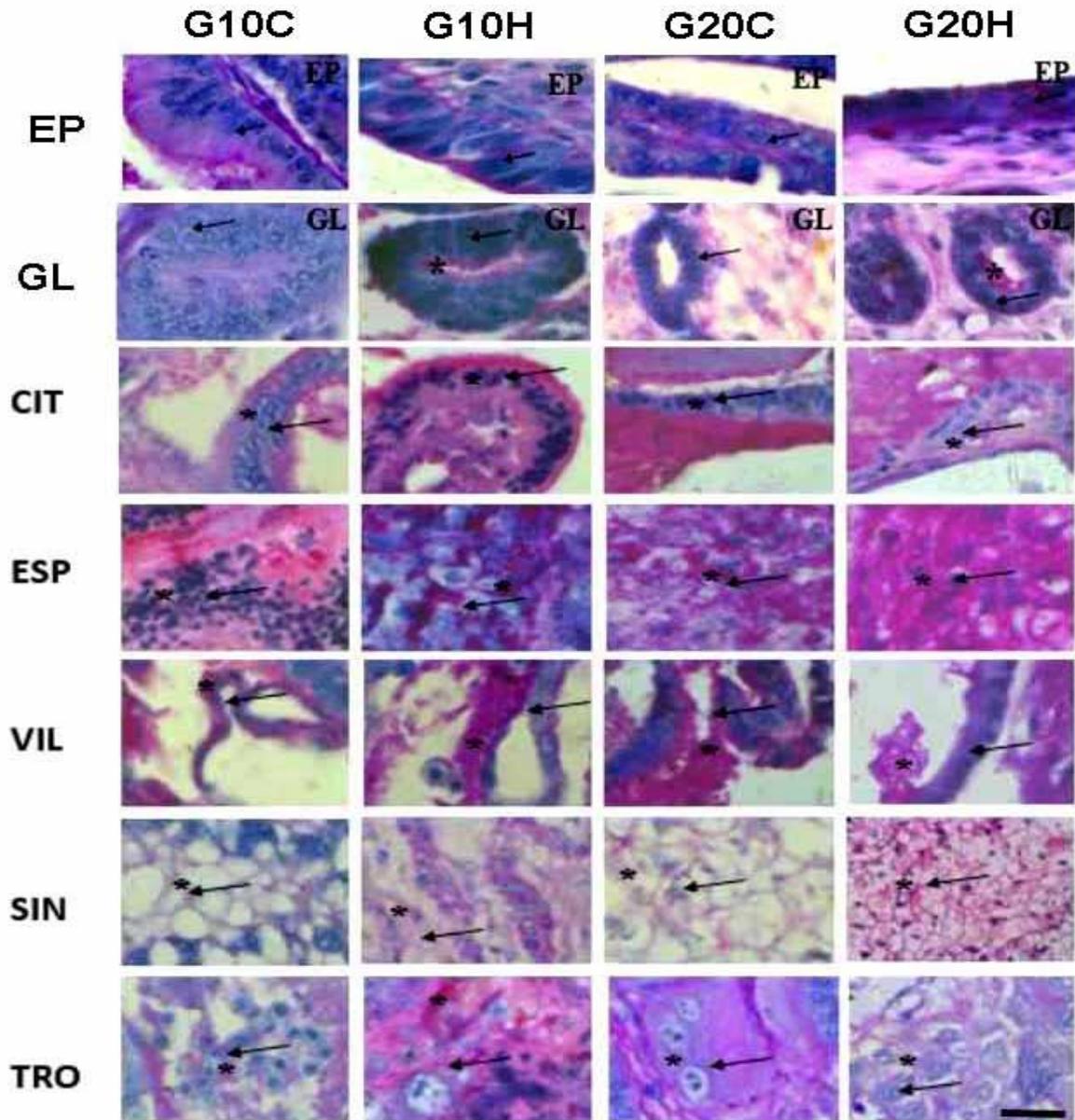


Figura 10. Tinción de PAS en útero con implante de coneja gestantes de 10 y 20 días controles e hipotiroides. Tinción de PAS (ácido peryódico de Schiff), color rosa pálido indica contenido de polisacáridos neutros, núcleos azules teñidos con hematoxilina de Meyer. **GLA**=Glándula, **PLA**=Placenta, **EMB**=Embrión, **ESP**=Espongiotrofoblasto, **TRO**=Trofoblasto, **CGT**=Célula gigantes del trofoblasto, **CIT**=Citotrofoblasto. n=1. (*: Indica presencia de glucógeno).

| | CONTROL | HIPOTIROIDEO |
|--|---------|--------------|
| GESTANTE 10 DÍAS PLACENTACIÓN | | |
| Epitelio Luminal | + | ++ |
| Epitelio Glandular | + | +++ |
| Tejido Conectivo | + | ++ |
| Músculo | + | + |
| Musculo Circular | + | ++ |
| Citotrofoblasto | + | ++ |
| Espongiotrofoblasto | ++ | ++ |
| Villus | ++ | +++ |
| Sincitiotrofoblasto | ++ | +++ |
| Trofoblasto | + | ++ |
| GESTANTE CONTROL 20 DÍAS PLACENTACIÓN | | |
| Epitelio Luminal | + | + |
| Epitelio Glándular | + | + |
| Tejido Conectivo | + | + |
| Músculo | + | + |
| Musculo Circular | + | + |
| Citotrofoblasto | ++ | + |
| Espongiotrofoblasto | ++ | ++ |
| Villus | +++ | ++ |
| Sincitiotrofoblasto | +++ | +++ |
| Trofoblasto | + | + |

Tabla 2. Semicuantificación de glucógeno en útero con implante de conejas durante la placentación (G10D CI) y degeneración de cuerpo lúteo con implante (G20D CI) controles e hipotiroideas. (+) **poco**, (++) **moderado**, (+++) **abundante**.

Immunodetección de lactato deshidrogenasa (LDH) en útero

La gestación parece disminuir la expresión de la enzima LDH en los sitios sin implante (figura 11, tabla 3). El hipotiroidismo incrementa la expresión de la enzima en el grupo NG, así como en ciertos tejidos de los grupos G5 y G10 del sitio de no implante y del sitio de implante. En G10 y G20 (figura 12, tabla 4).

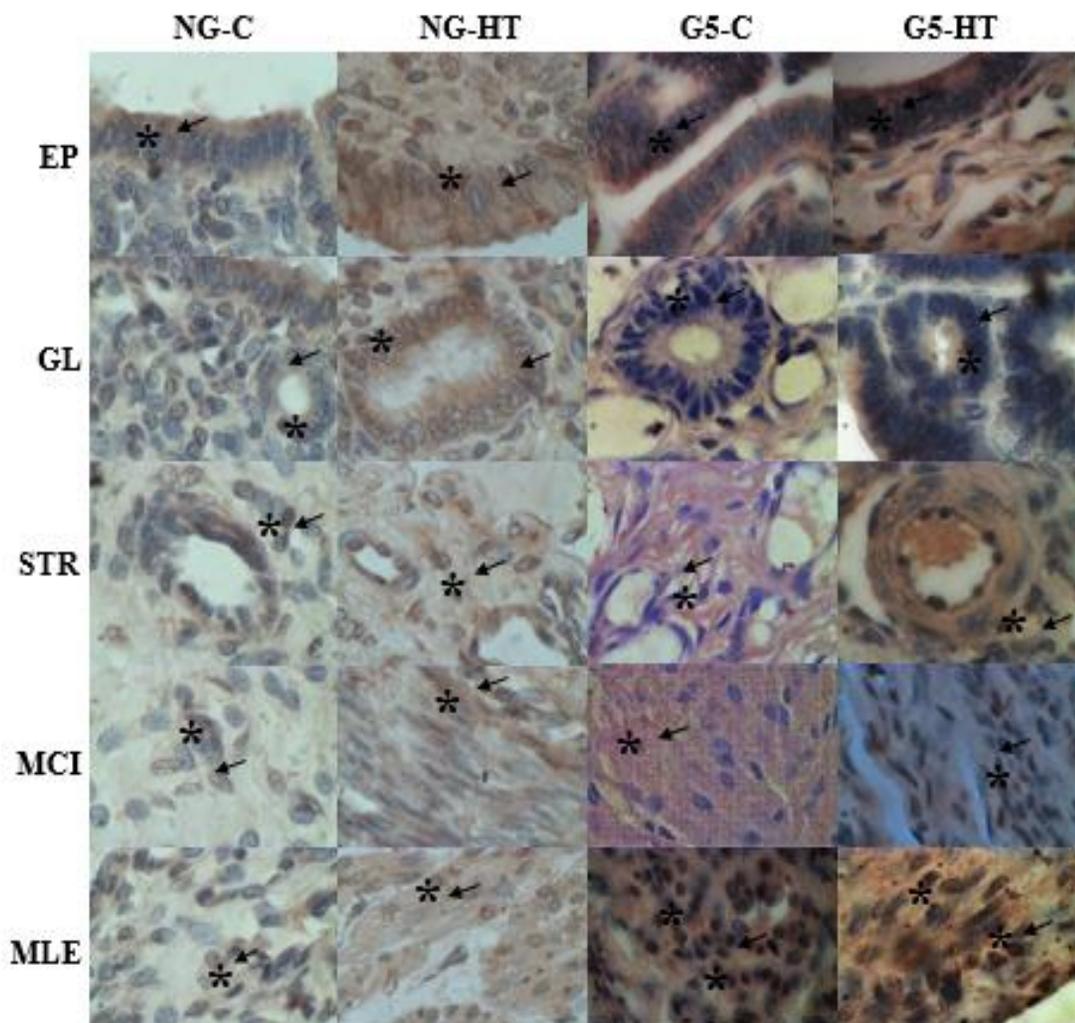


Figura 11. Inmunotinción de lactato deshidrogenasa (LDH) en útero de coneja virgen y gestante control e hipotiroidea en la implantación. NG-C. No gestante control, NG-HT. No gestante hipotiroideo, G5-C. Gestante Control en Implantación, G5-HT Gestante Hipotiroideo en la implantación. EP: Epitelio, GL: Epitelio glandular, STR: Estroma, MCI: Músculo circular interno, MLE: Músculo longitudinal externo. (*: Indica presencia de la enzima).

| GRUPOS | CONTROL HIPOTIROIDEO | |
|---|-----------------------------|-----|
| NO GESTANTE | | |
| Epitelio luminal | +++ | +++ |
| Epitelio glandular | ++ | +++ |
| Tejido conectivo | ++ | +++ |
| Músculo | ++ | +++ |
| Musculo circular | +++ | +++ |
| GESTANTE 5 DÍAS IMPLANTACIÓN | | |
| Epitelio luminal | +++ | +++ |
| Epitelio glandular | +++ | +++ |
| Tejido conectivo | +++ | +++ |
| Músculo | ++ | +++ |
| Musculo circular | +++ | +++ |
| GESTANTE 10 DÍAS PLACENTACIÓN SIN IMPLANTE | | |
| Epitelio luminal | + | ++ |
| Epitelio glandular | ++ | + |
| Tejido conectivo | ++ | + |
| Músculo | ++ | ++ |
| Musculo circular | +++ | +++ |
| GESTANTE 20 DÍAS PLACENTACIÓN SIN IMPLANTE | | |
| Epitelio luminal | + | + |
| Epitelio glandular | + | + |
| Tejido conectivo | + | + |
| Músculo | + | + |
| Musculo circular | ++ | + |

Tabla 3. Semicuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa en útero sin implante de conejas no gestantes y gestantes controles e hipotiroideas. (+) 1-3 células positivas, (++) 4-7 células positivas, (+++) 8-10 células positivas.

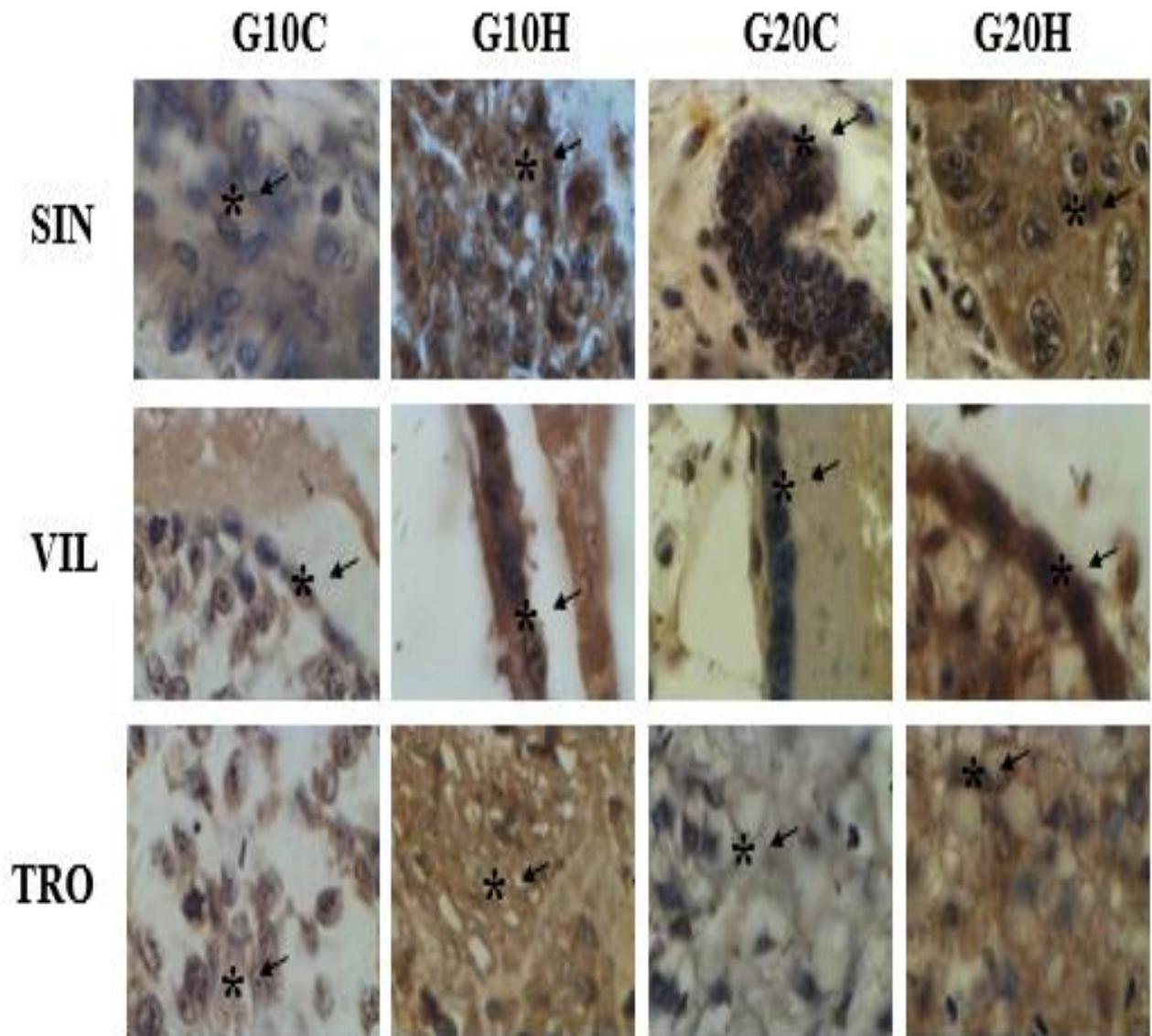


Figura 12. Inmunotinción de lactato deshidrogenasa (LDH) en útero con implante de coneja gestante control e hipotiroidea (G10 y G20), **SIN**= Sincitiotrofoblasto **VIL**= Villus, **TRO**=Trofoblasto. n=1. (*: Indica presencia de glucógeno).

| GESTANTE 10 DÍAS PLACENTACIÓN CON IMPLANTE | CONTROL | HIPOTIROIDEO |
|---|----------------|---------------------|
| Epitelio luminal | ++ | +++ |
| Epitelio glandular | + | +++ |
| Tejido conectivo | + | + |
| Músculo | ++ | ++ |
| Musculo circular | +++ | +++ |
| Espongiotrofoblasto | - | - |
| Citotrofoblasto | +++ | ++ |
| Villus | +++ | - |

| GESTANTE 20 DÍAS PLACENTACIÓN CON IMPLANTE | CONTROL | HIPOTIROIDEO |
|---|----------------|---------------------|
| Epitelio luminal | + | + |
| Epitelio glandular | + | + |
| Tejido conectivo | + | + |
| Músculo | + | + |
| Musculo circular | ++ | ++ |
| Espongiotrofoblasto | + | + |
| Citotrofoblasto | + | + |
| Villus | + | +++ |

Tabla 4. Semicuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa en útero con implante de conejas no gestantes y gestantes controles e hipotiroideas. (+) 1-3 células positivas, (++) 4-7 células positivas, (+++) 8-10 células positivas.

8. DISCUSIÓN

Hipotiroidismo y DMG

Si bien en las mujeres embarazadas con hipotiroidismo presentan resistencia a la insulina, por lo tanto tienen un mayor riesgo de DMG (Gong y cols. 2016). En modelos animales, la influencia del hipotiroidismo sobre los niveles circulantes de glucosa e insulina son controversiales, algunos autores muestran una disminución de estos indicadores (Diaz y cols. 1993; Mazaki-Tovi y cols. 2010) y otros no (Rodríguez-Castelán y cols. 2015). Esto podría depender de la especie animal rata vs. coneja, o bien, del método de inducción del hipotiroidismo. Lo que sí parece claro es el efecto del hipotiroidismo sobre la acumulación de glucógeno en el hígado. En apoyo a nuestros resultados, ya se ha reportado que el hipotiroidismo aumenta el contenido de triglicéridos en el hígado de ratas no gestantes porque aumenta la enzima glicógeno sintetasa (Yao y cols. 2014). El embarazo reduce el contenido de glucógeno en el hígado al inicio y lo aumenta al final. Esto ya ha sido reportado en perros, en los cuales, tanto la oxidación como la formación de glucógeno, es alta en el tercer trimestre de la gestación (Moore y cols. 2012). Lo anterior tiene relación con una menor concentración de insulina circulante y una menor respuesta a la insulina por parte del músculo esquelético, es decir, la gestación se asocia con resistencia a la insulina (Connolly et al. 2007). Esto es acompañado por una disminución de la actividad de la noradrenalina hepática favoreciéndose la acumulación del glucógeno, además de existir una disminución del glucagón y un aumento de glicerol aumentándose la gluconeogénesis (Connolly y cols. 2004).

El endometrio secreta y almacena glucosa en los diferentes estadios de la vida (ciclo estral o menstrual y gestación). En la gestación, el endometrio requiere de la glucosa para el proceso de decidualización y el desarrollo embrionario, mientras el trofoblasto logra fijarse a la vasculatura materna. Así, las células del endometrio expresan enzimas que participan en la glucólisis como la piruvato cinasa, la cual participa en la formación de piruvato durante la glucólisis (Salama y cols. 2014). Aunque no es significativo, en nuestros resultados se ve más glucógeno en conejas no gestantes controles pues el contenido de glucógeno en endometrio es mayor durante el proestro y se moviliza durante la implantación y el embarazo (Dean y cols. de usa como reserva para su uso en caso de que la gestación ocurra (Dean y cols. 2014). Así, el

epitelio glandular contiene más glucógeno que el epitelio luminal (Rose 2011). El contenido de glucógeno en el endometrio es dependiente de estradiol, mediante la regulación de la glucógeno sintetasa; mientras que, la progesterona promueve el catabolismo del mismo (Bowman y Rose 2016). Ello podría explicar alguna falla en la señalización hormonal hacia el día G20, donde los animales hipotiroideos tuvieron un mayor contenido de glucógeno en G20. Curiosamente, el hipotiroidismo también promovió un mayor contenido de glucógeno en los sitios de implante en los días G10 y G20, confirmando nuestra propuesta de cambios en la señalización de receptores de estrógenos y progesterona en el útero, como ya lo hemos observado en animales vírgenes (Roríguez-Castelán y cols. Otra posible explicación la posible regulación de las hormonas tiroideas sobre la adiponectina (Atici y cols. 2017), la cual incrementa la expresión de GLUT1 e inhibe el catabolismo de la glucosa disminuyendo la producción de lactato y ATP, e incrementando la producción de glucógeno y la acumulación del mismo en células endometriales (Duval y cols. 2018). Es posible que un aumento de dicha adipocina, tanto en tejido uterino como en tejido embrionario en el sitio de implante, promoviera una mayor concentración de glucógeno, ya que participa en la adaptación metabólica en la interfase materno-fetal (Dobrzyn y cols. 2018).

Hipotiroidismo y producción de lactato

En ratones y humanos, el 50% de la glucosa consumida por el blastocisto no se oxida, sino que se convierte en lactato (Gardner y Leese 1987; Gott y cols. 1990). En la etapa tardía del blastocisto y durante las primeras fases de la implantación hay un interruptor en las isoformas del LDH-B a LDH-A, lo que favorece la formación de piruvato (Auerbach y Brinster 1967). El estrógeno inhibe la actividad de LDH en el moco cervical, mientras que la progesterona la promueve (Takehisa 1980). Conforme avanza el desarrollo, la cantidad de lactato producido por el blastocisto se incrementa significativamente (Clough y Whittingham 1983). Este ambiente ácido favorece la angiogénesis y la inmunoregulación, facilitando así la implantación exitosa (Gardner 2015). Ello explicaría lo que encontramos en el útero, tanto de animales hipotiroideos como controles, donde la LDH fue menor en G5 y mayor en G20. Los MCT también facilitan el movimiento de lactato dentro y fuera de las células (Halestrap y

Wilson 2012). Se han reportado cuatro isoformas de MCT (1, 2, 3 y 4) (Dimmer y cols. 2000). El MCT4 es inducido en células deciduales recién formadas, mientras que el MCT1 y el marcador de proliferación Ki-67 son localizados complementariamente rodeando las células indiferenciadas suponiendo consumo de lactato para la proliferación (Zuo y cols. 2015). Por su parte, el receptor de lactato GPR81 se expresa en el útero y su expresión aumenta durante el embarazo (Madaan y cols. 2017). Es decir, al aumentar los niveles de lactato se favorece la presencia de su receptor.

El aumento de LDH en el sitio de implante, como lo encontramos en el presente estudio en animales hipotiroideos en G10, podría indicar un posible entorno oxidante que favorece la conversión glucosa a lactato en el tejido embrionario. Considerando que el 90% de la glucosa que consume el blastocisto lo hace en forma de lactato, un aumento en su producción podría en G10 indicar un acelerado desarrollo de la placenta, modificando el arreglo vascular en la interfase materno-fetal y favoreciendo la invasión del trofoblasto en el endometrio e incluso en el miometrio lo que conlleva a desarrollar placentas acreta e increta. El parto por cesárea y la placenta previa son factores de riesgo independientes para la placenta acreta, un embarazo después de esta complicación tiene mayor riesgo de resultados adversos en la madre como hemorragia grave debido a ruptura uterina e histerectomía peri-parto, sin embargo no se han demostrado resultados perinatales adversos siendo desconocida la patogenia (Eshkoli y cols. 2013). Esto se ha relacionado con la generación de un ambiente pro-inflamatorio que genera la expresión de metaloproteasas, citocinas inflamatorias como el factor de crecimiento transformante (TGF), y el VEGF para favorecer la angiogénesis (Gardner y cols. 2015).

Las alteraciones en el suministro de sangre uterino se asocian con una mayor morbilidad y mortalidad perinatal causadas por el parto prematuro, la preeclamsia o la restricción del crecimiento intrauterino. La adaptación de la vasculatura uterina a las crecientes necesidades del feto se produce a través de la vasodilatación y el desarrollo de nuevos vasos (Zygmunt y cols. 2003). La angiogénesis es el proceso de neovascularización de vasos sanguíneos preexistentes en respuesta a la hipoxia o a las demandas del sustrato de los tejidos, aunque hay similitudes, por un lado la invasión tumoral y la vascularización inducida por tumor y por otro la invasión del trofoblasto y el desarrollo placentario, nuestra comprensión de estos dos procesos diferentes en particular la autolimitación de la invasión trofoblástica y la formación de nuevos

vasos durante la gestación podría permitir el establecimiento de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la patologías relacionadas con tumor y embarazo (Zygmunt y cols. 2003).

9. CONCLUSIÓN

El hipotiroidismo no modificó la concentración de glucosa en suero sanguíneo. En conejas hipotiroideas no gestantes y G20 el glucógeno en hígado tiende a aumentar, el hipotiroidismo está asociado con el desarrollo esteatohepatitis no alcohólica en pacientes con DM2 y es considerado como un trastorno. En el sitio de implante la concentración de glucógeno uterino fue favorecido por el hipotiroidismo, considerando que la adiponectina incrementa la expresión de GLUT 1, inhibe el catabolismo de la glucosa disminuyendo la producción de lactato y ATP, incrementa la producción de glucógeno y la acumulación del mismo en células endometriales. Un aumento en su producción podría en G10 indicar un acelerado desarrollo de la placenta, modificando el arreglo vascular en la interfase materno-fetal y favoreciendo la invasión del trofoblasto en el endometrio e incluso en el miometrio lo que conlleva a desarrollar placentas acreta e increta.

10. PERSPECTIVAS

En la coneja, si bien el hipotiroidismo no afecta el tamaño, peso y longitud de los fetos, si se observa un aumento en la invasión trofoblástica incluso en la capa muscular, lo que podríamos considerar como placenta increta (Castillo-Romano, tesis de Maestría en proceso). Otros datos que nos permiten proponer la posibilidad de que el hipotiroidismo pueda generar una placenta acreta en la coneja es el aumento del contenido de glucógeno a los 10 y 20 días de gestación en el útero con implante, lo que sugiere la presencia de un mayor número de células productoras de glucógeno en el trofoblasto. También hemos observado una mayor presencia de lactato deshidrogenasa en las células en el sitio y de implante al día 10 de gestación (Castillo-Romano, tesis de Maestría en proceso). Además, el hipotiroidismo aumenta el contenido de glucógeno en un sitio Inter implante en el día 20 de gestación como si hubiera también infiltración de trofoblasto fuera del sitio de implantación (Castillo-Romano, tesis de Maestría en proceso). Otros resultados que hemos obtenido en animales no gestantes es que el hipotiroidismo genera un aumento en la expresión del gen y de la proteína de VEGF, así como un aumento en la infiltración de linfocitos en el epitelio uterino y una mayor lipoperoxidación en el útero (Rodríguez-Castelán y cols. En escritura). Ello nos sugiere que el hipotiroidismo podría incluso predisponer a las hembras a desarrollar placenta previa al inducir un estado de hipoxia e inflamación.

De acuerdo con estos resultados en el presente proyecto sería interesante comprobar el desarrollo de placenta acreta en las conejas hipotiroideas, para ello se pretendería detectar algunos indicadores como son la presencia de macrófagos M1 positivos a CD68 o células Hofbauer, así como la expresión de CD68 en el útero, la síntesis de LP y la presencia de vasos determinados a través de GPR30. Este último receptor ha sido involucrado en la regulación de metaloproteasas, las cuales son necesarias para la invasión trofoblásticas (Burnet y cols. 2012), así como la regulación de HIF1 y VEGF asociados con el cáncer de mama (De Francesco y cols. 2014).

En el útero de conejas de la raza Chinchilla Europea no gestantes y gestantes (días 5, 10 y 20) controles e hipotiroideas se podría analizar el número y distribución de macrófagos CD68, el HIF-1 y el GPR30, pensando en un proceso de tipo hipóxico.

11. REFERENCIAS

- Aghajanova L, Lindeberg M, Carlsson IB, Stavreus-Evers A, Zhang P, Scott JE, 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.
- Akerud H Ronquist G y Wiberq-Itzel E. 2009. Lactate distribution in culture medium of human myometrial biopsies incubated under different conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 297(6): E1414-9.
- Alarcon P, Manosalva C, Carretta MD, Hidalgo AI, Figueroa CD, Taubert A, Hermosilla C, y Burgos RA. 2018. Fatty and hydroxycarboxylic acid receptors: The missing link of immune response and metabolism in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 201:77-87.
- Atici E, Mogulkoc R, Baltaci AK, Menevse E. 2017. The effect of thyroid dysfunction on nesfatin-1 and adiponectin levels in rats. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 10;32(3).
- Auerbach S y Brinster R. 1967. Lactate dehydrogenase isozymes in the early mouse embryo. *Exp Cell Res*. 46: 89–92.
- Anaya H, Rodríguez C, Nicolás L, Martínez G, Jiménez E, Castelán F y Cuevas E. 2015. Hypothyroidism affects differentially the cell size of epithelial cells among oviductal regions of rabbits. *Reprod Domest Anim*. 1:104-11
- Bassett JH y Williams GR. 2008. Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone. *Bone*. 43(3):418-26.
- Bianco A y Kim B. 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 116: 2571-2579.
- Bowman K y Rose J. 2016. Estradiol stimulates glycogen synthesis whereas progesterone promotes glycogen catabolism in the uterus of the American mink *Neovison vison*. *Anim Sci J*. 10.1111
- Brayman M, Thathiah A y Carson D. 2004. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol*. 2:4.

- Bricker D, Taylor E, Schell J, Orsak T, Boutron, A, Chen Y, Cox J, Cardon C, Van Vranken J, Dephoure N, Redin C, Boudina S, Gygi S, Brivet M, Thummel C y Rutter J. 2012. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science*. 6090: 96–100.
- Castelló A, Rodríguez-Manzaneque J, Camps M, Pérez-Castillo A, Testar X, Palacín M, Santos A. y Zorzano A. 1994. Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone. *The Journal of biological chemistry*. 25; 269: 5905.
- Chinetti-Gbaguidi G y Staels B. 2017. PPARb in macrophages and atherosclerosis. *Biochimie*. 136: 59-64
- Clough J y Whittingham D. 1983. Metabolism of glucose by postimplantation mouse embryos in vitro. *J Embryol Exp Morphol*. 74: 133–42
- Carney L, Quinlan J y West J. 2014. Thyroid disease in pregnancy. *Am Fam Physician*. 15; 89 (4): 273-8.
- Connolly CC, Papa T, Lacy DB, Williams PE y Moore MC. 2006. Hepatic and muscle insulin action during late pregnancy in the dog. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292(1):R447-52.
- Connolly CC, Aglione LN, Smith MS, Lacy DB y Moore MC. Pregnancy impairs the counterregulatory response to insulin-induced hypoglycemia in the dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 287(3):E480-8.
- Baldini E y Moretti C. 2014. Molecular basis of thyrotropin and thyroid hormone action during implantation and early development. *Hum reprod update*. 20:884-904.
- Davidenko LM, Zaichenko IV, Kononenko VIa y Popova LI. 1989. Lactate dehydrogenase activity and its isoenzyme spectrum in the human pancreas in the prenatal period. *Fiziol Zh*. 35(4):106-9.
- Dean M, Hunt J, McDougall L y Rose J. 2014. Uterine glycogen metabolism in mink during estrus, embryonic diapause and pregnancy. *J Reprod Dev*. 6:438-46.

- Dervishi E, Zhang G, Hailemariam D, Goldansaz SA, Deng Q, Dunn SM y Ametaj BN. 2016. Occurrence of retained placenta is preceded by an inflammatory state and alterations of energy metabolism in transition dairy cows. *J Anim Sci Biotechnol.* 7: 26.
- Dey S, Lim H, Das S, Reese J, Paria B, Daikoku T y Wang H. 2004. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 25:341–373.
- Dhup S, Dadhich RK, Porporato PE y Sonveaux P. 2012. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des* 18: 1319-1330.
- Diaz GB, Paladini AA , Garcia ME, y J Gagliardino JJ.1993. Changes induced by hypothyroidism in insulin secretion and in the properties of islet plasma membranes. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique.* 101(5)263–269.
- Dimmer K, Friedrich B, Lang F y Deitmer J. 2000. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J.* 350: 219–27.
- Dimitriadis G y Raptis S. 2001. Thyroid hormone excess and glucose intolerance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2:S225-39.
- Dobrzyn K, Smolinska N, Kiezun M, Szeszko K, Rytelawska E, Kisieleska K, Gudelska M y Kaminski T. 2018. Adiponectin: A New Regulator of Female Reproductive System. *Int J Endocrinol.* 29; 2018: 7965071
- Douard V and Ferraris RP. 2008. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(2):E227-37.
- Duval F, Dos Santos E, Maury B, Serazin V, Fathallah K, Vialard F y Dieudonné MN. 2018. Adiponectin regulates glycogen metabolism at the human fetal-maternal interface. *J Mol Endocrinol.* JME-18-0013.
- Ellis H. 2008. Uterine physiology. *Anaesthesia and intensive care medicine.* 12:3.

- Eshkoli T, Weintraub AY, Sergienko R y Sheiner E. 2013. Placenta accreta: risk factors, perinatal outcomes, and consequences for subsequent birth. *Am J Obstet Gynecol.* 208 (3):219
- Faas MM , Spaans F y De Vos P .2014. Monocytes and Macrophages in Pregnancy and Pre-Eclampsia. *Front Immunol.* 5: 298.
- Filant J, Zhou H y Spencer T. 2012. Progesterone inhibits uterine gland development in the neonatal mouse uterus. *Biol Reprod.* 86: 141–149.
- Faas MM , Spaans F y De Vos P . 2014. Monocytes and Macrophages in Pregnancy and Pre-Eclampsia. *Front Immunol.* 5: 298.
- Filant J y Spencer T. 2013. Endometrial glands are essential for blastocyst implantation and decidualization in the mouse uterus. *Biology of reproduction.* 88:93, 1–9.
- Forhead A y Fowden A. 2014. Thyroid hormones in fetal growth and prepartum maturation. *J Endocrinol.* 221(3):R87-R103
- Forsbach, González. 2003. Impacto del nuevo criterio para el diagnóstico de Diabetes Gestacional en la estimación de su prevalencia. *Rev Invest Clín.* 55: 507-10.
- Frolova A, Flessner L, Chi M, Kim S, Foyouzi Y y Moley K. 2008. Facilitative glucose transporter type 1 is differentially regulated by progesterone and estrogen in murine and human endometrial stromal cells. *Endocrinology.* 150: 1512-20.
- Frolova AL, Neill K y Moley K. 2011. Dehydroepiandrosterone inhibits glucose flux through the pentose phosphate pathway in human and mouse endometrial stromal cells, preventing decidualization and implantation. *Mol Endocrinol.* 8:1444-55.
- Gaitonde D, Rowley K y Sweeney L. 2012. Hypothyroidism: an update. *American Family Physician.* 3:244-51.
- Gardner D y Leese H. 1987. Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. *J Exp Zool.* 242: 103–5.
- Gardner D y Wale P. 2013. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril.* 99:1062–72.

- Gardner D. 2015. Lactate production by the mammalian blastocyst: manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion? *Bioessays*. 37, 364-371
- Gong LL, Liu H y Liu LH. 2016. Relationship between hypothyroidism and the incidence of gestational diabetes: A meta-analysis. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 55(2):171-5.
- Gott A, Hardy K, Winston R y Leese H. 1990. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 1:104-8.
- Halestrap A y Wilson M. 2012. The monocarboxylate transporter family-role and regulation. *IUBMB Life*. 64: 109–19.
- Huang M y Lardy H. 1981. Effects of thyroid states on the Cori cycle, glucose-alanine cycle, and futile cycling of glucose metabolism in rats. *Arch Biochem Biophys*. 1:41-51.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo. 2016. México.
- Inuwa I y Williams M. 2006. A morphometric study on the endometrium of rat uterus in hypothyroid and thyroxine treated hypothyroid rats. *Ups J Med Sci*. 111: 215-225.
- Jara EL, Muñoz- Durango N, Llanos C, Fardella C, Gonzáles PA, Bueno SM, Kalergis AM y Riedel CA. 2017. Modulating the function of the immune system by thyroid hormones and thyrotropin. *Immunol Lett*. 184:76-83.
- Jeong J, Kwak L, Lee K, Kim T, Large M, Stewart C, Kaestner K, Lydon J y Demayo F. 2010. Foxa2 is essential for mouse endometrial gland development and fertility. *Biol Reprod*. 83:396–403.
- Karja NW, Kikuchi K, Fahrudin M, Ozawa M, Somfai T, Ohnuma K, Noguchi J, Kaneko H y Nagai T. 2006. Development to the blastocyst stage, the oxidative state, and the quality of early developmental stage of porcine embryos cultured in alteration of glucose concentrations in vitro under different oxygen tensions. *Reprod Biol Endocrinol*. 6; 4:54.

- Keeping H, Newcombe A y Jellinck P. 1982. Modulation of estrogen-induced peroxidase activity in the rat uterus by thyroid hormones. *J Steroid Biochem.* 16: 45-49.
- Kreisberg RA. 1980. Lactate homeostasis and lactic acidosis. *Ann. Intern. Med.* 92: 227–237.
- Larrabee MG. 1989. The pentose cycle (hexose monophosphate shunt). Rigorous evaluation of limits to the flux from glucose using $^{14}\text{CO}_2$ data, with applications to peripheral ganglia of chicken embryos. *J Biol Chem.* 264(27):15875-9.
- Laurberg P, Andersen S, Pedersen I, Andersen S y Carlé A. 2013. Screening for overt thyroid disease in early pregnancy may be preferable to searching for small aberrations in thyroid function tests. *Clin Endocrinol (Oxf).* 79(3):297-304.
- Leese H, Biggers J, Mroz E y Lechene C. 1984. Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. *Anal Biochem.* 140: 443–8.
- Madaan A, Nadeau Vallée M, Rivera JC, Obari D, Hou X, Sierra EM, Girard S, Olson DM y Chemtob S. 2017. Lactate produced during labor modulates uterine inflammation via GPR81 (HCA1). *Am J Obstet Gynecol.* 216(1):60
- Mazaki-Tovi M, Feuermann Y y Segev G. 2010. Increased serum leptin and insulin concentrations in canine hypothyroidism, *Veterinary Journal*, 183.1.109–114.
- McKinnon B, Bertschi D, Wotzkow, Bersinger N, Evers J y Mueller D. 2014. Glucose transporter expression in eutopic endometrial tissue and ectopic endometriotic lesions. *Journal of molecular Endocrinology.* 24; 52:169-79.
- McAninch E y Bianco A. 2014. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 1311:77-87.
- McGrowder D, Fraser Y, Gordan L, Crawford T y Rawlins J. 2011. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase activities in patients with thyroid disorders. *Niger. J. Clin. Pract.* 4: 454-459.
- Moore MC, Smith MS y Connolly CC. Pregnancy augments hepatic glucose storage in response to a mixed meal. *Br J Nutr.* 107(4):493-503.

- Nagalakshmi CS, Santhosh NU, Krishnamurthy N, Chethan C y Shilpashree MK. 2016. Role of Altered Venous Blood Lactate and HbA1c in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Diagn Res.* 10(12):BC18-BC20.
- Neal JL, Lowe NK y Corwin EJ. 2013. Serum lactate dehydrogenase profile as a retrospective indicator of uterine preparedness for labor: a prospective, observational study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 8; 13:128.
- Nygaard B. 2015. Primary Hypothyroidism *Am Fam Physician.* 6:359-360.
- Parija S, Mishra S. y Raviprakash V. 2006. Hypothyroid state reduces calcium channel function in 18-day pregnant rat uterus. *Indian J Exp Biol.* 44:19-27.
- Panciera D, Purswell B y Kolster K. 2007. Effect of short-term hypothyroidism on reproduction in the bitch. *Theriogenology.* 68: 316-332.
- Pascual A y Aranda A. 2013. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1830: 3908-3916.
- Ranganathan P, Shanmugam A, Swafford D, Suryawanshi A, Bhattacharjee P, Hussein MS, Koni PA, Prasad PD, Kurago ZB, Thangaraju M, Ganapathy V y Manicassamy S. 2018. GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis. *J Immunol.* 1;200(5):1781-1789.
- Rodríguez-Castelán J, Corona-Pérez A, Nicolás-Toledo L, Martínez-Gómez M, Castelán F, y Cuevas-Romero E. 2016. Hypothyroidism induces a moderate steatohepatitis accompanied by liver regeneration, mast cells infiltration, and changes in the expression of the farnesoid X receptor. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 125(3):183-190.
- 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.* 2015:917806.
- Rodríguez-Castelán J, Nicolás L, Morimoto S y Cuevas E. 2015. The Langerhans islet cells of female rabbits are differentially affected by hypothyroidism depending on the islet size. *Endocrine.* 48(3):811-7.

- Rodríguez-Castelán Julia, Aylin Del Moral-Morales, Gabriela Piña-Medina, Dafne Zepeda-Pérez, Marlenne Castillo-Romano, Marlen Espíndola-Lozano, Ignacio Camacho-Arroyo y Estela Cuevas-Romero. Hypothyroidism modifies the morphometry, vascularization and lipid storage in uterus through progesterone receptor and estrogen receptor α . *Journal of molecular endocrinology*.
- Rose J, Hunt J, Shelton J, Wyler S y Mecham D. 2011. The effects of estradiol and catecholestrogens on uterine glycogen metabolism in mink (*Neovison vison*). *Theriogenology*. 15; 75:857-66.
- Sacks G, Sargent I y Redman C. 1999. An innate view of human pregnancy. *Immunol Today*. 20(3):114-8.
- Salama S y cols 2014. Estradiol- 17β upregulates pyruvate kinase M2 expression to active estrogen receptor- α and to integrate metabolic reprogramming with the mitogenic response in endometrial cells. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. 99:3790-9.
- Schulz LC y Bahr JM 2004. Potential endocrine function of the glycolytic enzyme glucose-6-phosphate isomerase during implantation. *General Comparative Endocrinology*. 137 283-287
- Silva J, Vidigal P, Galvão D, Boeloni J, Nunes P, Ocarino N, Nascimento E y Serakides R. 2012. Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. *Reprod Fertil Dev*. 24: 923-931.
- Sun S, Li H, Chen J y Qian Q. 2017. Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis. *Physiology (Bethesda)*. 32(6):453-463.
- Steingrimsdottir T, Ronquist G y Ulmsten U. 1993. Energy economy in the pregnant human uterus at term: studies on arteriovenous differences in metabolites of carbohydrate, fat and nucleotides. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 51: 209 –215.
- Takehisa T. 1980. Lactate dehydrogenase in human cervical mucus: correlation with ovulation, influence of ovarian steroid hormones, and isozyme pattern. *Fertil Steril* 33(2):135-40.

- Vallet J, McNeel A, Miles J y Freking B. 2014. Placental accommodations for transport and metabolism during intra-uterine crowding in pigs. *J Anim Sci Biotechnol.* 5:55.
- Visser WE, Friesema EC y Visser TJ. 2011. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol.* 25(1):1-14.
- Wagner W, Kania KD, Blauz A y Ciszewski WM. 2017. The lactate receptor (HCAR1/GPR81) contributes to doxorubicin chemoresistance via ABCB1 transporter up-regulation in human cervical cancer HeLa cells. *J Physiol Pharmacol.* 68(4):555-564.
- Wang H y Dey S. 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 7:185–199.
- Wiersinga W. 2012. Adult Hypothyroidism. *Thyroid disease manager.* 5:71
- Wu G, Bazer F, Davis T, Kim S, Li P, Rhoads J, Satterfield M, Smith S, Spencer T y Yin Y. 2009. Impacts of amino acid nutrition on pregnancy outcome in pigs: Mechanisms and implications for swine production. *Amino Acids.* 37:153–168.
- Yao X, Hou S, Zhang D, Xia H, Wang YC, Jiang J, Yin H y Ying H. 2014. Regulation of fatty acid composition and lipid storage by thyroid hormone in mouse liver. *Cell Biosci.* 30;4:38.
- Zabrodina VV, Shreder ED, Shreder OV, Durnev AD y Seredenin SB. 2014. Impaired prenatal development and glycemic status in the offspring of rats with experimental streptozotocin-induced diabetes and their correction with afobazole. *Bull Exp Biol Med.*158:16-20
- Zannat MR, Nessa A, Hossain MM, Das RK, Asrin M, Sufrin S, Islam MT y Taikia T, Nasreen S. 2016. Serum glucose level in first and third trimester of pregnancy. *Mymensingh Med J.* 25(2):211-4.
- Zawar M, Deshpande N, Gadgil P y Mahanta A. 2003. Histopathological study of endometrium in infertility. *Indian Journal of Pathology and Microbiology.* 46,630–633.
- Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, Lang U y Liang OD. 2003. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 22:110.

10. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Placenta hemochorial. Una placenta en la cual la sangre maternal está en el contacto directo con el corión (la placenta humana es de este tipo).

Metaloproteinasa de matriz (MMP) Miembro de un grupo de enzimas que pueden descomponer las proteínas, como el colágeno, que se encuentran normalmente en los espacios entre las células de los tejidos (es decir, proteínas de la matriz extracelular). Dado que estas enzimas necesitan cinco átomos de calcio para trabajar adecuadamente, se llaman metaloproteasas. Las metaloproteasas de matriz participan en la curación de heridas, la angiogénesis y la metástasis de las células tumorales.

Transportador de monocarboxilato (MCT). Son transportadores de moléculas transmembranales. co-transportan aniones de ácido monocarboxílico (típicamente lactato) y protones (H^+) a través de membranas celulares, notablemente de fibras de músculo esquelético y cardíaco. Se considera que es responsable de la mayor parte del transporte de lactato a bajas concentraciones pero, a medida que la saturación del portador se aproxima, la difusión simple (que es principalmente del ácido láctico no disociado) adquiere mayor importancia.

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La interacción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), con sus receptores de membrana; VEGFR1 y VEGFR2, se reconoce como el principal estimulador de la angiogénesis (proliferación, migración y sobrevivencia de las células endoteliales), tanto en el ovario como en otros tejidos.

Factor de transcripción NF- κ B. Los factores de transcripción son proteínas muy especializadas que reconocen secuencias específicas de DNA en la región reguladora de todos los genes.

Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). Una familia de proteínas secretadas de inhibidores de proteasa que regulan la actividad de las metaloproteinasas de la matriz secretadas. Tienen un papel importante en la modulación de la proteólisis de la matriz extracelular, especialmente durante la remodelación de tejidos y procesos inflamatorios.

Trofoectodermo. Capa externa de células en la vesícula blastodérmica de mamífero, que entrará en contacto con el endometrio y participará en el establecimiento de los medios de recibir la nutrición del embrión; La capa celular de la que se diferencia el trofoblasto.

Catepsina. Clase de enzimas proteolíticas intracelulares, se localiza en tejidos animales especialmente el hígado, el bazo, los riñones y el intestino, cataliza la hidrólisis de proteínas a polipéptidos.