



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del hipotiroidismo en la infiltración de
macrófagos (CD163) y natural killer (CD94) en el útero
de conejas gestantes

Tesis

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

L.N. Laura Ilhuicatzí Netzahualcóyotl

Directora de tesis: Dra. Estela Cuevas Romero

Tutora: Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tutor: Dr. Pablo Pacheco Cabrera



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del hipotiroidismo en la infiltración de
macrófagos (CD163) y natural killer (CD94) en el útero
de conejas gestantes

Tesis

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

L.N. Laura Ilhuicatzí Netzahualcóyotl

Directora de tesis: Dra. Estela Cuevas Romero

Tutora: Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tutor: Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Financiamiento

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Endocrinología del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Posgrado de Maestría en Ciencias Biológicas, adscrito al Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional Padrón Nacional de Posgrado (PNPC) en el nivel consolidado.

Para su desarrollo se contó con el financiamiento de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACy, proyecto de Ciencia Básica 257549 a Estela Cuevas Romero).

**COORDINACIÓN POSGRADO 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 **Laura Ihuicatzí Netzahualcóyotl** 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 en la infiltración de macrófagos (CD163) y natural killer (CD94) en el útero de las conejas gestantes".

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., ENERO 25 DE 2021



DR. MARGARITA MARTÍNEZ GÓMEZ



DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



DR. FRANCISCO CASTELÁN



DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO



DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ


**COMITÉ ACADÉMICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por la estudiante **Laura Ilhuicatzí Netzahualcóyotl** titulada “**Efecto del hipotiroidismo en la infiltración de macrófagos (CD163) y natural killer (CD94) en el útero de conejas gestantes**” para optar por su grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de Laura Ilhuicatzí Netzahualcóyotl fue revisado por mí como directora de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. A inicios de enero, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando poco texto con similitudes (2%). Los textos detectados con similitud fueron corregidos por la estudiante. Se volvió a procesar el documento y volvió a marcar 2%, sin embargo, examinando los detalles de la búsqueda se observó que las similitudes están marcadas en algunos pies de figuras, pero dicho texto contiene las respectivas citas que indican de donde fue tomada la información. Otras similitudes se observaron en la sección del índice y la metodología, correspondiendo a lenguaje común por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio. Por lo anterior, confirmo que **la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable** en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE
Tlaxcala, Tlax., a 23 de enero de 2021



Dra. Estela Cuevas Romero
Directora de tesis



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



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

A mi directora de tesis la Dra. Estela Cuevas Romero por su valioso apoyo, la comprensión y la paciencia 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.

A mi esposo Rubén y a mi hija Iris Cecilia que fue la motivación de mi día a día.

RESUMEN

El efecto del hipotiroidismo sobre la expresión de células inmunes durante la gestación se ha relacionado con diversas alteraciones entre la madre y el feto, incluyendo los abortos espontáneos, parto prematuro, patologías como preeclamsia, diabetes gestacional y placenta acreta. En hijos de mujeres con hipotiroidismo, se asocian con el alto peso al nacimiento o macrosomía fetal y bajo coeficiente intelectual. En otros estudios, describen que en mujeres con hipotiroidismo hay una alta probabilidad de tener fetos macrosómicos. En modelo de la coneja virgen, el hipotiroidismo está relacionado con un proceso inflamatorio donde el número de células inmunes se encuentra aumentada y durante la gestación promueven macrosomía fetal. En este estudio, evaluamos el efecto del hipotiroidismo sobre la infiltración de macrófagos (CD163) y células natural killer (CD94) en el útero de conejas no gestantes y gestantes. Se tuvieron 48 conejas de la raza Chinchilla las cuales fueron divididas en dos grupos 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 gestación, las conejas se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico. Se extrajo el tejido uterino de sitios con y sin implante del útero de la región medial. El útero fue procesado histológicamente para evaluar la presencia de CD163 y CD94 mediante inmunohistoquímica. Los datos fueron analizados con una ANOVA de 2 vías. Se encontró inmunomarcaje de CD163+ y CD94+ en diferentes en regiones del tejido (epitelio, glándulas uterinas, estroma y capa muscular) en localizando moderada expresión en el grupo hipotiroideo y menor en el grupo control. Para el conteo de células CD163+ y CD94+ se tomaron fotos en vasos de la región subepitelial y de la capa muscular. Se encontró que el hipotiroidismo aumento el número de macrófagos CD163+ en el sitio con implante al día 20 de gestación en la región subepitelial. En la capa muscular no se encontró diferencias. Con respecto al marcador CD94+ se encontró una disminución en el grupo hipotiroideo al día 10 de la gestación en el sitio sin implante en la región subepitelial. En región del musculo no se observaron diferencias. Con estos resultados sugerimos que el hipotiroidismo podría promover alteraciones en la infiltración de macrófagos y natural killer y con ello afectar el desarrollo placentario y el crecimiento embrionario.

Abreviaturas y acrónimos

D1	Desyodasa 1
E₂	Estradiol
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFN-γ	Interferón-gamma
IGF	Factor de crecimiento insulínico t
IL	Interleucina
NK	Natural Killer
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
M-CSF	Factor estimulante de colônias de Macrófagos
MCT	Transportador de monocarboxilato
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MMP	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
OATP	Proteínas transportadoras de aniones orgánico
P₄	Progesterona
PIGF	Factor de crecimiento placentario
RXR	Receptor X del ácido retinoico
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TBG	Globulina fijadora de tiroxina
TH	Hormonas tiroideas
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
TRα	Receptor tiroideo alfa
TRβ	Receptor tiroideo Beta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Implantación y placentación	1
1.2 Importancia del sistema inmunitario en la gestación	4
1.4 Hormonas tiroideas y gestación	10
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Hormonas tiroideas y sistema inmunitario	16
2.2 El hipotiroidismo como una enfermedad inflamatoria crónica	17
2.3 Consecuencias de un exceso de inflamación del endometrio	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	21
5.1 GENERAL	21
5.2 PARTICULARES	21
6. METODOLOGÍA	22
7. RESULTADOS	25
7.1 Inmunodetección de CD163 en el útero gestante	25
7.2 Macrófagos CD163+ en vasos subepiteliales de útero	25
7.3 Macrófagos CD163+ en la capa muscular de útero	25
7.4 Inmunodetección de CD94 en el útero gestante	30
7.5 Cuantificación de células CD94+ en vasos del estroma uterino	30
7.6 Cuantificación de células CD94+ en vasos de la capa muscular uterina	30
8. DISCUSIÓN	35
8.1 Hipotiroidismo y macrófagos CD163+	35
8.2 Hipotiroidismo y células CD94+	36
9. CONCLUSIONES	39
10. PERSPECTIVAS	40
11. REFERENCIAS	41

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Implantación y placentación

El periodo de gestación, tanto en mamíferos como en humanos, implica cambios endocrinos y metabólicos entre la madre y el feto (Magon y Kumar 2012). La placenta humana está formada por células deciduales y trofoblasto de origen materno y fetal. Las células del trofoblasto forman estructuras vellosas y extravellosas. En roedores, éste es conocido como laberinto placentario. El trofoblasto velloso, formados por la fusión de células de citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos, están involucrados en la producción de hormonas esteroides (progesterona, P_4 y estradiol, E_2), esto para el mantenimiento del embarazo (Noyola-Martínez y cols. 2019). La placenta es el órgano principal que realiza la biosíntesis de esteroides a lo largo de la gestación. Las hormonas esteroides se producen utilizando dos tipos de enzimas: los citocromos P450 y la hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD), involucradas en los procesos de oxidación o reducción de la biosíntesis hormonal (Noyola-Martínez y cols. 2019). En la coneja, como en seres humanos, desde el comienzo hasta el final de la gestación, hormonas esteroides como la P_4 , E_2 , hormona coriónica humana (hCG), entre otras hormonas proteicas (Czyzyk y cols. 2017), son importantes para la gestación.

Progesterona. La P_4 está involucrada en el ciclo menstrual en humanos o el estro en otros mamíferos (Wang y cols. 2017). Esta hormona es importante para el mantenimiento del embarazo al reducir la contractilidad miometrial (Gorviny y cols. 2015; Czyzyk y cols. 2017; Chee y cols. 2018; Figura 1). La P_4 es de función importante para suprimir la respuesta inmunológica materna de los antígenos fetales, evitando así el rechazo materno del trofoblasto (Magon y Kumar 2012; Chee y cols. 2018). La P_4 es de gran importancia para la receptibilidad uterina, las comunicaciones de células del estroma dan paso a la decidualización. En el embarazo temprano, los niveles maternos de 17 α -hidroxiprogesterona aumentan, marcando la actividad del cuerpo lúteo. La concentración sérica de P_4 se eleva en forma progresiva conforme avanza la gestación, desde 40 ng/mL en el primer trimestre hasta más de 175 ng/mL en el tercero, la secreción de esta hormona aumenta alrededor de 10 veces durante el embarazo (Yves y cols. 2016). Esto sucede en varias especies, incluida la coneja,

encontrándose con niveles basales de $< 1\text{ ng/mL}$ y a los 10 días de gestación en un rango de 15-20 ng/mL (DePaolo y Masoro 1987).

Estradiol. El estradiol (E_2) juega un papel fundamental en los cambios observados en el útero durante el embarazo temprano. Un pico de E_2 es vital para inducir la receptividad uterina y comenzar la decidualización (Wang y cols. 2017; Figura 1). La ventana de receptividad en humanos se abre el día 19 o 20 del ciclo menstrual, o después de un pico de E_2 que dura 4 a 5 días. Los mecanismos por los cuales E_2 transforma un útero preparado con P_4 al estado receptivo, requiere la señalización mediada por receptores nucleares alfa ($ER\alpha$) y beta ($ER\beta$) de estrógenos (Robertshaw y cols. 2017). La fijación del concepto o la correcta implantación del trofoblasto en la decidua es a través de la regulación del factor inhibidor de la leucemia de citoquinas (LIF). La expresión de LIF se induce en las glándulas uterinas durante el segundo pico de E_2 , la función de E_2 en el día de la implantación es iniciar la inducción de LIF y la cascada de eventos finalmente resulta en la implantación (Wang y cols. 2017). De acuerdo con esto la tasa de producción, el E_2 aumenta continuamente durante el embarazo y alcanza de 100-120 $\text{mg} / 24\text{ h}$. La síntesis de estriol (E_3), que constituye el 60–70% del total de los estrógenos, comienza en la 8 semana de gestación cuando la glándula suprarrenal fetal y el hígado son funcionales (Yves y cols. 2016). Los valores medios maternos del plasma aumentan de 0,07 a 16 ng/mL al final del embarazo (Figura 1; Yves y cols. 2016).

Hormona gonadotropina coriónica humana. Una de las moléculas que inicia la comunicación entre el blastocito y la decidua es la gonadotropina coriónica humana (hCG). En el embarazo, esta glicoproteína es crítica ya que rescata el cuerpo lúteo de la involución y mantiene la secreción de P_4 por las células de la granulosa ovárica. Su utilidad como marcador de diagnóstico del embarazo radica que su punto máximo está entre la octava y la décima semana de gestación, y tiende a estabilizarse en un nivel inferior durante el resto del embarazo (Magon y Kumar 2012; Figura 1). Esta hormona desempeña funciones importantes en el proceso de implantación, crecimiento, diferenciación celular y decidualización (Šuluburić y cols. 2017). Makrigiannakis y cols. (2017) mencionaron que la hCG inhibe la acción del factor crecimiento tipo insulina intrauterina (IGF) y al factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), mientras que estimula al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y a la metaloproteínasa-9 (MMP-9), lo que apoya aún más el papel de la

hCG es importante para la invasión de trofoblasto en el útero. Además, la hCG puede inducir la expresión del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) por las células del estroma endometrial. Desde ese punto de vista, la hCG puede regular la migración de macrófagos en la interfaz materno-fetal, para el mantenimiento de la gestación durante el primer trimestre (Makrigiannakis y cols. 2017).

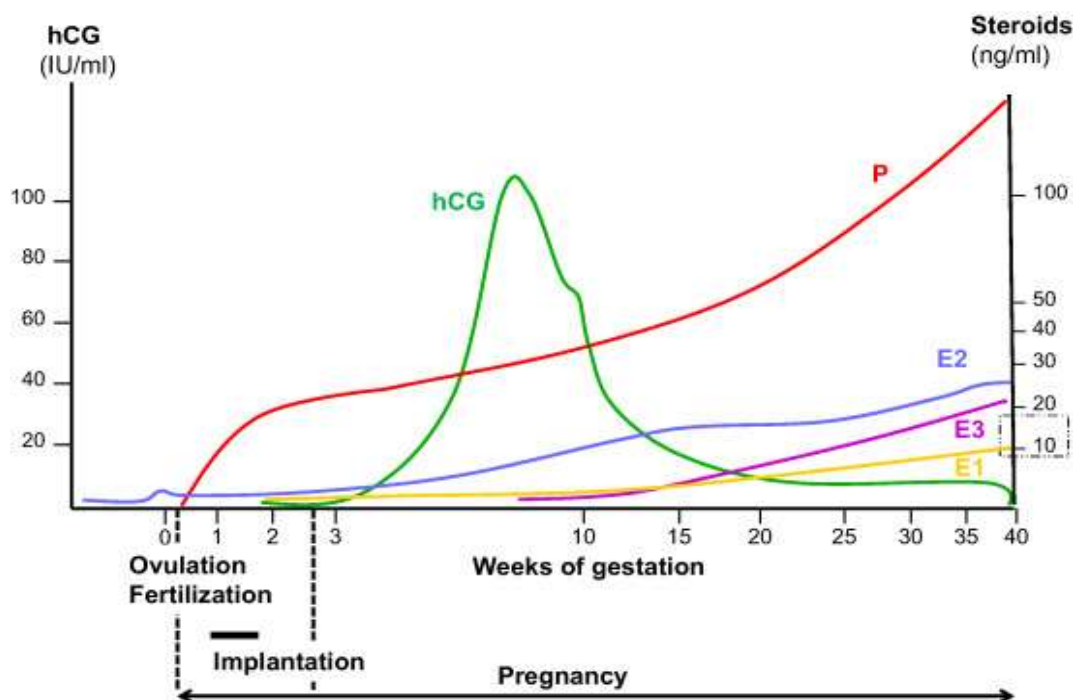


Figura. 1. Esteroides plasmáticos en la mujer durante el embarazo. Imagen tomada de Yves y cols. 2016.

Prolactina. Otra hormona que puede funcionar apoyando el embarazo es la prolactina (PRL), la cual es un polipéptido de cadena simple secretado por los lactotropos de la hipófisis anterior. La PRL regula la expresión de su propio receptor de prolactina (PRLP) y promueve las acciones de la P₄ en el epitelio uterino favoreciendo la implantación (Gorviny y cols. 2015).

Hormonas tiroideas. La fisiología de la tiroides es vital para el crecimiento y maduración de órganos, especialmente del cerebro los músculos y los huesos. Las hormonas tiroideas, tiroxina (T₄) y triyodotironina (T₃), en la vida intrauterina, son sintetizados en la glándula tiroides materna, donde pueden atravesar fácilmente la barrera placentaria (Santos

y cols. 2012). Las alteraciones de las hormonas tiroideas en la gestación humana y en modelos animales se ha establecido por diversos autores (Cleary-Goldman y cols. 2008; Santos y cols. 2012, Springer y cols. 2017). Durante el primer trimestre del embarazo, las hormonas tiroideas maternas son la única fuente de hormonas para el feto; durante las primeras semanas, son necesarias para el desarrollo de neuronas, corazón y vasos (Santos y cols. 2012). La ontogenia de la función tiroidea, en el feto, implica organogénesis y maduración del hipotálamo, la hipófisis y la glándula tiroides; donde comprende de la semana 12^a y 14^a de gestación, ya es completamente funcional (Springer y cols. 2017). Un hipotiroidismo materno manifiesto/ clínico (concentraciones de la hormona estimulante de la tiroides, TSH, elevada, y concentraciones de T4 y T3 disminuidas) debe iniciarse al comienzo del embarazo con levotiroxina, ya que después de la decimocuarta semana de gestación, el desarrollo del cerebro fetal puede verse afectado de manera irreversible por la falta de hormonas tiroideas, y de igual manera se asocia con parto prematuro y muerte fetal (Casey y cols. 2005). Cleary-Goldman (2008), reportó que la hipotiroxinemia (T4 libre baja, TSH normal) se relaciona con complicaciones graves de la madre y el feto; con trabajo de parto prematuro, diabetes gestacional y macrosomía fetal y en otros estudios reportan: abortos espontáneos, preclamsia, desprendimiento de placenta y presentación de nalgas, inducción por cesárea (Männistö y cols. 2013). En la rata, se reporta que puede afectar la función cardiovascular (Santos y cols. 2012), retarda el crecimiento placentario y fetal (Picard y cols. 2013), retrasa la implantación y aumenta las reabsorciones (Bolarinwa y Olaleye, 1997) y disminuye el número y fuerza de contracción uterina, así pues, aumenta la duración del parto en la perra (Panciero y cols. 2012). La prevalencia de hipotiroidismo clínico en mujeres embarazadas es de 0.2 a 0.5 % y de hipotiroidismo subclínico es de 2 a 2.5 % (Guía de Práctica Clínica, 2016).

1.2 Importancia del sistema inmunitario en la gestación

El embarazo es considerado un estado pro-inflamatorio que requiere una adaptación fisiológica del sistema inmunitario de la madre para tolerar la presencia del aloinjerto fetal mientras crece en su cuerpo (Holst y cols. 2018). El sistema inmune de los mamíferos tiene dos componentes, el sistema inmune adaptativo y el innato. El sistema inmune adaptativo se conoce como el sistema inmune avanzado y se presenta en todos los vertebrados (Negishi y

cols. 2018). El sistema inmunitario innato se caracteriza por el reconocimiento de antígenos de alta especificidad y la memoria inmunológica (Negishi y cols. 2018). El sistema inmune innato lo integran una población grande de leucocitos como las células Natural Killer (NK), las células presentadoras de antígeno (incluidas las células dendríticas y los macrófagos) que se acumulan en el lecho placentario y modulan la remodelación vascular y la invasión del trofoblasto (Hsu y Nanan, 2014). El feto es injerto semi-alogénico debe escapar de la vigilancia del sistema inmune adaptativo materno para lograr la tolerancia inmune (Negishi y cols. 2018). La invasión del embrión al endometrio y el inicio de la morfogénesis placentaria son eventos críticos para establecer el curso del embarazo (Schumacher y cols. 2018). Durante el proceso de la implantación, las células NK presentes en el lecho placentario (Marijke y cols. 2018) junto con otras células detriticas, neutrófilos y mastocitos en menor cantidad (Schumacher y cols. 2018), aumentan en número de un 23% de las células del estroma, hasta un 32% en el embarazo temprano (Harris y cols. 2019). Los macrófagos son otro tipo de población abundante en el interfaz materno fetal, y comprenden aproximadamente el 90% de todos los leucocitos junto con las NK (Marijke y cols. 2018). Los macrófagos intervienen en el desarrollo fetal por lo que es importante el crecimiento saludable de la placenta y el lecho placentario (Faas y de Vos. 2017), donde apoyan el alargamiento y engrosamiento de las arterias espirales y la producción de moléculas esenciales para la interacción blastocito-endometrio (Marijke y cols. 2018).

El trofoblasto fetal es semi-alogénico (comparte solo el 50% del material genético de la madre y el resto del padre), por lo que es inevitable en una respuesta inmune local. En los humanos como en animales, incluida la coneja, presentan una placenta hemocorial (Harris y cols. 2019). La placenta hemocorial es más invasiva, existiendo un contacto íntimo entre el tejido fetal (trofoblasto) y el sistema inmunitario materno (Faas y de Vos 2017). La placenta es importante en el intercambio materno fetal de nutrientes y oxígeno. Durante la placentación, la circulación sanguínea materna debe producirse cambios en el útero (Faas y de Vos 2017). En el sitio de implantación del trofoblasto, junto con las hormonas E₂ y P₄, modulan una serie de interacciones complejas entre el embrión y el endometrio lo que lleva a la formación de un tejido materno diferenciado como “decidua” (Colicchia y cols. 2014). En la mujer, como en la coneja, cuando el blastocito tiene contacto con el epitelio uterino

inicia el proceso de decidualización (reorganización del endometrio). Dicho proceso aumenta el número de leucocitos en el lecho placentario (Faas y de Vos 2017).

El proceso de implantación implica el reclutamiento de células inmunes innatas, donde van a secretar gran cantidad de citocinas como son: el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y la interleucina-2 (IL-2), moléculas de adhesión, incluida la mucina Muc-1, factores de crecimiento junto con los receptores de esteroides donde activan varias vías de señalización para una implantación exitosa (Wang, y cols. 2017) Los factores de crecimiento como el M-CSF, factor de crecimiento placentario (PlGF), VEGF-C, factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-I) y MMP desempeñan un papel importante en la remodelación de las arterias espirales (Colicchia y cols. 2014; Holst y cols. 2019; PrabhuDas y cols. 2015; Marijke y cols. 2018; Figuras 2 y 3).

En el embarazo saludable, las células NK uterinas (NKu) se encuentran cerca de las células trofoblásticas invasoras fetales y alrededor de las arterias espirales. La remodelación de la arteria espiral tiene lugar en 2 fases: en la primera fase, la pérdida de la estructura muscular elástica y la formación de rupturas de la capa de células endoteliales (Marijke y cols. 2018). En la segunda fase, los trofoblastos endovasculares son atraídos hacia las arterias espirales y reemplazan el revestimiento endotelial en la decidua (Marijke y cols. 2018). En el primer trimestre, las NKu secretan VEGF-C, angiopoyetina-1 y -2, interferón-gamma (IFN- γ) y MMP-2, -7 y -9 para el apoyo de la implantación, decidualización y formación de arterias espirales (Harris y cols. 2019; Figuras 2 y 3).

Las células inmunes las podemos identificar a través de marcadores específicos conocidos como Cluster of Differentiation (cúmulo de diferenciación) o CD que son moléculas de superficie celular reconocidas por ciertos anticuerpos. La actividad de las células NK *in vivo* es regulada por receptores CD94/NKG2 (Hanssens y cols. 2013) y receptores para las moléculas de clase I del antígeno leucocitario humano (HLA) (Negishi y cols. 2018). Por su parte, el trofoblasto produce antígenos de histocompatibilidad de clase 1, clásicos (HLA-C) y I no clásicos (HLA-E, HLA-F y HLA G) (Hanssens y cols. 2013). Durante el embarazo, la interacción CD94/NKGA2 y HLA-E proporciona una señal dominante para prevenir la citotoxicidad por parte de las células NKu hacia el trofoblasto (Hanssens y cols. 2013). Las NK facilitan la implantación de embriones, regulan la invasión del trofoblasto y el crecimiento vascular (Negishi y cols. 2018), crecimiento fetal y

angiogénesis (Andreotti y cols. 2018). Estas células son beneficiosas para la formación y desarrollo de la placenta durante el embarazo temprano.

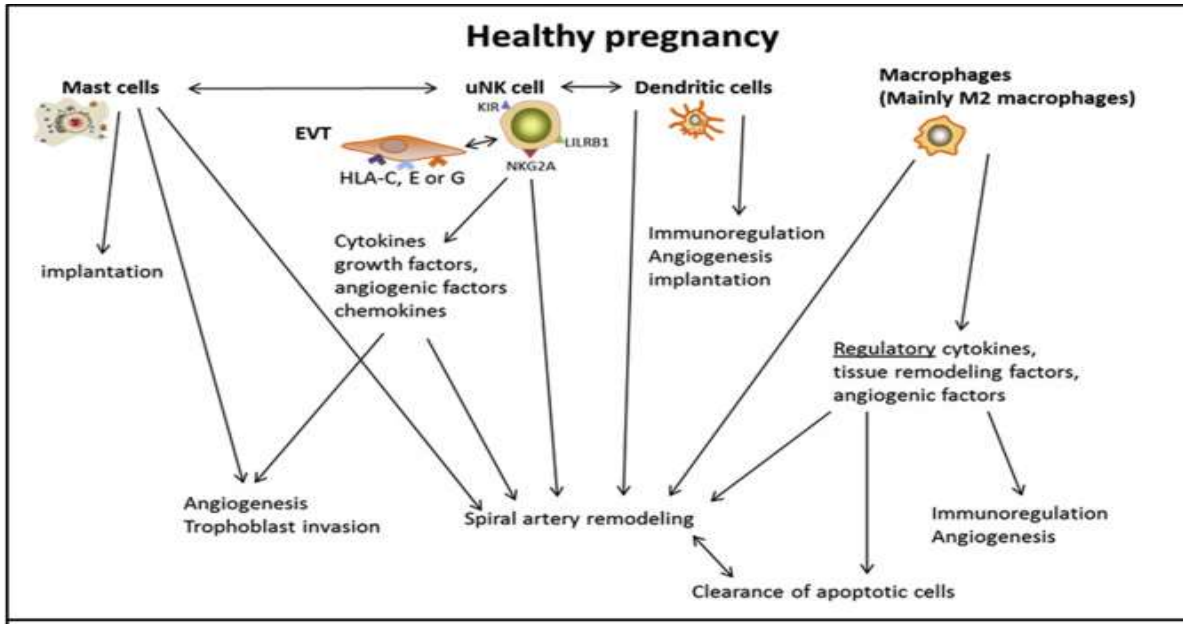


Figura 2. Función de las células uNK, macrófagos, células dendríticas y mastocitos en el lecho placentario en el embarazo normal. En el embarazo saludable las células inmunitarias innatas participan en la remodelación de la arteria espiral y en la producción de citoquinas y otros factores en el lecho placentario. Todos los tipos de células inmunitarias innatas también tienen otras funciones en la decidua, como la angiogénesis e inmunoregulación, pero también pueden desempeñar un papel en la implantación. Tomada de Marijke y cols. 2018.

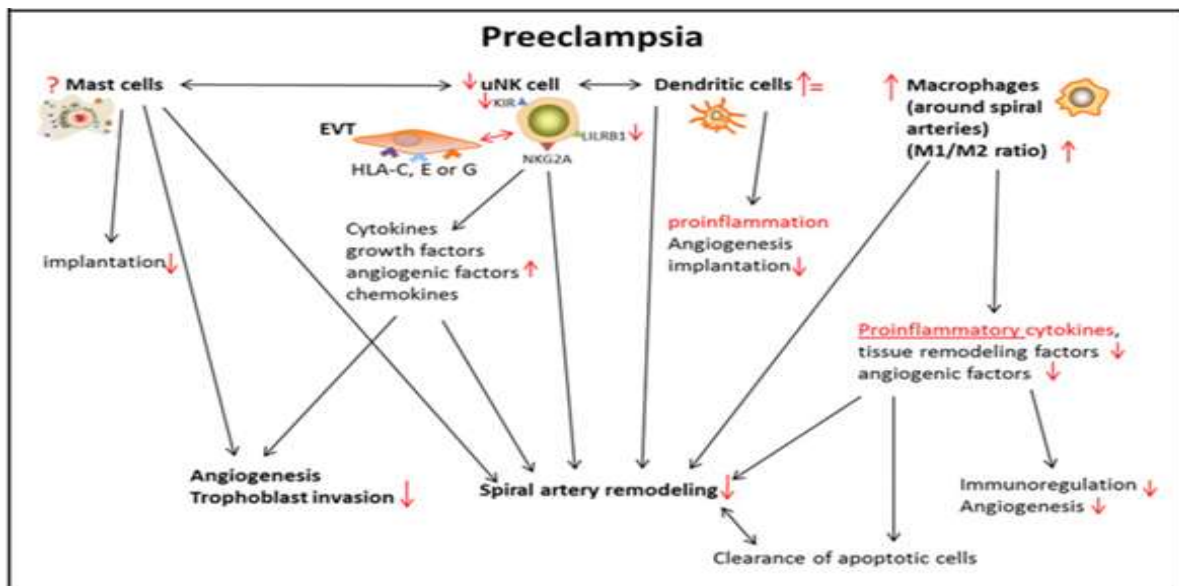


Figura. 3. Función de las células Natural Killer uterinas, macrófagos, células dendríticas y mastocitos en el lecho placentario en el embarazo con preeclampsia. En la preeclampsia las células NKu, los macrófagos y las células dendríticas cambian en número, en la preeclampsia las NKu disminuyeron y los números de macrófagos (alrededor de las arterias espirales), especialmente los macrófagos tipo M1, aumentaron. Esto da como resultado una expresión diferente de diversos factores y, finalmente, puede dar como resultado una disminución en la angiogénesis y la inmunoregulación y la implantación (Marijke y cols. 2018).

Los macrófagos son células clave en el sistema inmunitario innato. Se diferencian de los monocitos en respuesta a infecciones, los macrófagos están presentes durante la gestación y expresan una gran plasticidad fenotípica y funcional (Marijke y cols. 2018). Los macrófagos constituyen el 10% de las células deciduales y el 20-30% de los linfocitos deciduales (Marijke y cols. 2018). Este porcentaje se mantiene constante durante todo el embarazo. Los macrófagos deciduales son monocitos circulantes que han migrado al útero. El ambiente tisular ayuda para dicha diferenciación especializando sus funciones en el útero (Hanssens y cols. 2013). Existen dos estados de activación para los macrófagos: el fenotipo de macrófagos de activación clásica y activación alternativa, esto en respuesta de las células T helper (Th1/Th2) de las células T (Hanssens y cols. 2013; Figura 4). Los macrófagos activados clásicamente, actúan como células efectoras en la respuesta inmune celular, mientras que los macrófagos activados alternativamente, se ven involucrados en la inmunosupresión y la reparación de tejidos (Jara y cols. 2017). Los macrófagos clásicos median una respuesta inflamatoria con producción de TNF- α , IL1 β , IL-8 e IL-12 (Hanssens y cols. 2013). Los macrófagos en el lecho placentario expresan genes implicados en la inmunomodulación y la remodelación tisular (Hanssens y cols. 2013). Las diferentes poblaciones de macrófagos encontrados en el tejido uterino son CD14, donde disminuyen en número del primero hasta el segundo trimestre. Los macrófagos CD163 y CD206 positivos aumenta en número durante este período (Harris y cols. 2019). La expresión de IL-15 está aumentada y es producida por las células trofoblásticas y los macrófagos deciduales activados (Hanssens y cols. 2013). Los macrófagos también se localizan cerca de las arterias espirales que se encuentran en proceso de remodelación temprana (Marijke y cols. 2018). Esto propone que los macrófagos preparan a las arterias espirales para impedir la liberación de sustancias pro-inflamatorias en la decidua (Marijke y cols. 2018). Los macrófagos contribuyen a la remodelación del tejido en la interfaz materno-fetal, participan en la formación de la matriz extracelular, así como también regulando la musculatura y el crecimiento tisular. Estas células realizan funciones homeostáticas indispensables para la formación de placenta (Houser 2012). La función de los macrófagos no está restringida solo a la tolerancia inmune, sino que incluye el reconocimiento y la eliminación de infecciones, y la eliminación de restos apoptóticos de la remodelación tisular (Svensson y Ernerudh 2015). Los macrófagos de vía alternativa secretan mayor antagonista e IL-1R que son esenciales

para la remodelación tisular y la tolerancia inmune durante el embarazo. Un equilibrio de macrófagos activados clásicamente u/o alternativamente puede contribuir al resultado de un embarazo exitoso (Figuras 2 y 3; Nagamatsu y Schust 2010).

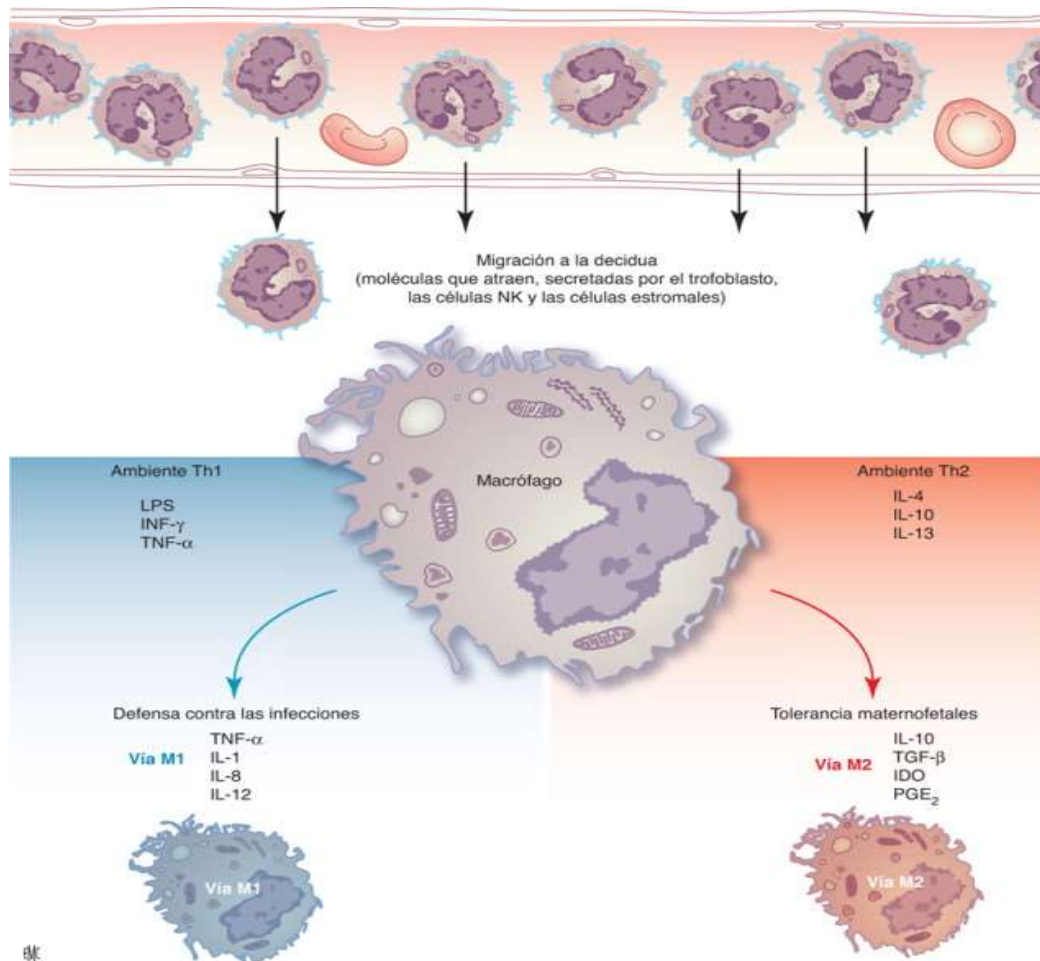


Figura 4. Dualidad del funcionamiento de los macrófagos (M1/M2). Moléculas producidas por las células estromales, Las células trofoblásticas y de las células asesinas Naturales (NK) atraen los monocitos circulantes hacia la decidua. Dependiendo del tipo de microambiente. Los macrófagos se orientan hacia la vía M1 defensiva o hacia la vía 2 Tolerante. Los macrófagos deciduals en los embarazos normales son tipo M2. LPS: lipopolisacárido; INF: interferón; TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleucina; TGF: Factor de crecimiento transformante; IDO: idolamina2, 3 Dioxigenasa. Tomado de Hanssens y cols. 2013.

1.4 Hormonas tiroideas y gestación

Las T3 y T4 son secretadas por las células epiteliales foliculares que conforman a la glándula tiroides. La glándula tiroides se ubica cerca de la tráquea justo por debajo del cartílago tiroideo; está formada por dos lóbulos (izquierdo, derecho) unidos por un istmo tiroideo donde hay gran irrigación sanguínea y linfática (Figura 5). La homeostasis de las hormonas tiroideas está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa que involucra el eje hipotálamo-adenohipófisis-tiroides. El hipotálamo secreta la TRH, que estimula la síntesis y secreción de la TSH en la adenohipófisis. La TSH, a su vez, estimula a la glándula tiroides para que sintetice T4 y T3 (Figura 5; Adu-Gyamfi y cols. 2019).

Cuando son liberadas al torrente sanguíneo, las T3 y T4 se unen de manera reversible a proteínas transportadoras diferentes que se producen principalmente en el hígado: globulina fijadora de tiroxina (TBG), transtirenina (TTR) y albúmina (Silva y cols. 2018). Las tres proteínas pueden transportar T3 y T4, aunque T4 tiene una mayor afinidad por las tres proteínas. Sin embargo, la principal proteína transportadora en humanos es la TBG debido a mayor afinidad por las hormonas tiroideas (Adu-Gyamfi y cols. 2019). En humanos, aproximadamente el 80% de la cantidad de hormonas tiroideas secretadas por la tiroides está en forma de T4, mientras que el 20% es la forma activa T3 (Van der Spek y cols. 2017; Pascual y Aranda 2012). Menos del 0.1% de la cantidad total de hormona tiroidea circulante está en forma libre, o no unida que puede transferirse a través de la membrana plasmática a una célula objetivo (Vissenberg y cols. 2015). En roedores, aproximadamente el 50% de hormonas tiroideas liberadas por la tiroides es T4 y el 50% es T3 (Jara y cols. 2017).

La T4 puede metabolizarse por varias vías diferentes, para volverse biológicamente activo, debe convertirse periféricamente en T3. Esta conversión está regulada a nivel celular por la interacción de las enzimas deiodasas (Van der Spek y cols. 2017). Estas enzimas (D1, D2 y D3) son capaces de eliminar un átomo de yodo del anillo interno o externo de una isoforma de la hormona tiroidea. La desyodación del anillo externo de T4 da como resultado la activación de la hormona por generación de T3. La desyodación del anillo interno de T4 da como resultado la formación de la T3 inversa (rT3; Van der Spek y cols. 2017; Figura 5C). Las deiodasas se expresan diferencialmente entre varios tipos de células y tejidos (Forehead y cols. 2014). La D1 está presente en el hígado, riñón, tiroides y pituitaria. El tipo D2 se encuentra en áreas del cerebro como la hipófisis, en tejido adiposo marrón, placenta,

células inmunes innatas y en niveles notablemente bajos, el músculo esquelético (Forehead y cols. 2014). La D3 se considera la enzima inactivadora de hormonas tiroideas, ya que solo puede catalizar la desyodación del anillo interno de T4 y T3. Al igual que la D1, la D3 está presente en la membrana plasmática. La D3 se expresa altamente en la placenta y juega un papel importante durante el desarrollo embrionario al regular los niveles de hormonas tiroideas en el feto (Van der Spek y cols. 2017). La transferencia de T4 y T3 de la madre al feto durante el embarazo varía entre mujeres y animales. Este mecanismo depende del tipo de placenta, así como la expresión de moléculas transportadoras, las proteínas de unión y actividad D3 (Silva y cols. 2018). La D3 tiene una alta expresión en el útero, la placenta y la membrana amniótica, donde juega como un importante papel como barrera enzimática para la transferencia específica de hormonas tiroideas maternas al desarrollo del feto (Van der Spek y cols. 2017).

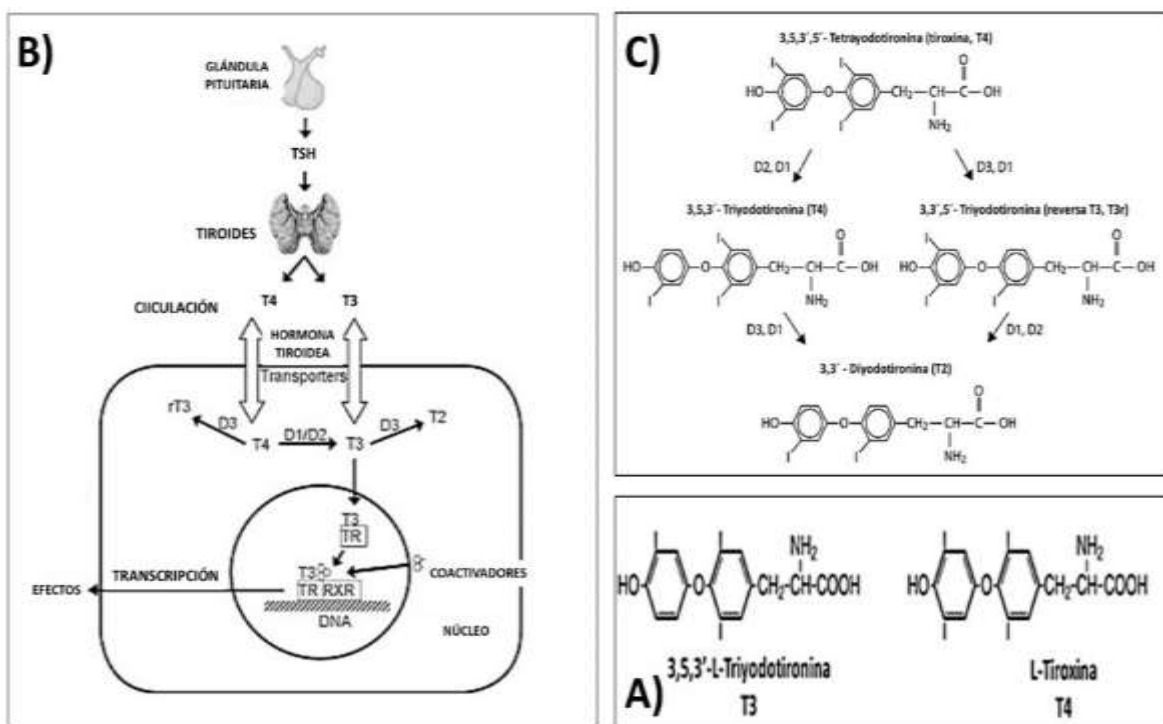


Figura 5. A) Fórmula química de las hormonas tiroideas. B) Mecanismo de retroalimentación de síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. C) Reacciones básicas de las desyodasas para formar las hormonas tiroideas. Las reacciones son catalizadas por las desyodasas que eliminan restos de yodo de los 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 (Vijai 2011).

Las hormonas tiroideas ingresan a la célula a través de los transportadores, incluidos los de membrana monocarboxilato (MCT) y los transportadores de aniones orgánicos (OATP), aunque tienen más afinidad por los de MCT (Adu-Gyamfi y cols. 2019). Dentro de la célula diana, la T4 y T3 realizan su función directamente activando sus receptores nucleares, estimulando o reprimiendo la expresión de genes de transcripción que dependen de la dimerización del receptor X del ácido retinoico (RXR) y / o el reclutamiento de coactivadores, como el coactivador del receptor de esteroides (SRC). Por otra parte, las hormonas tiroideas pueden actuar indirectamente al unirse a una proteína de membrana, la integrina $\alpha\beta3$, que activa una cascada de transducción de señales a través de MAPK y ERK1/2 para regular la transcripción y la fosforilación de sus receptores nucleares (Silva y cols. 2018; Figura 6).

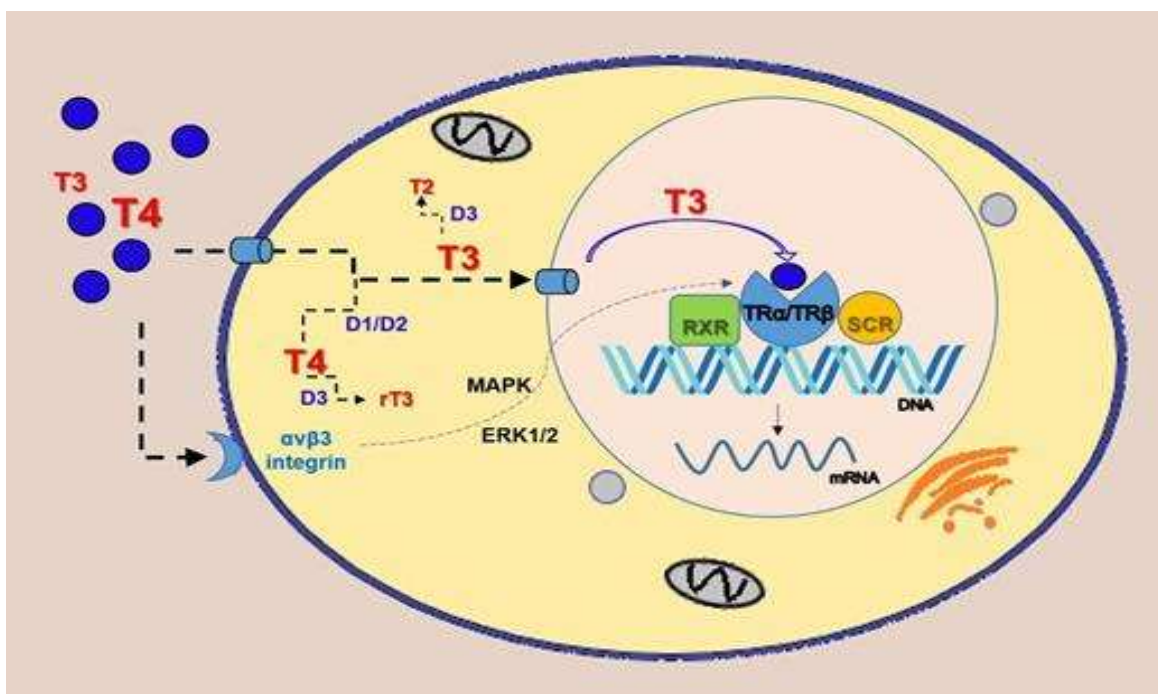


Figura 6. Mecanismo de acción de las hormonas tiroideas en las células diana. Las hormonas tiroideas ingresan a la célula diana por difusión o por transporte mediado por el portador. Dentro de la célula, T4 se convierte en T3 mediante desyodasas de tipo 1 (D1) y tipo 2 (D2). La desyodasa tipo 3 (D3) es responsable de inactivar las hormonas tiroideas al convertir T4 y T3 en rT3 y T2, respectivamente. T3 ingresa al núcleo celular y activa sus receptores nucleares en el ADN, estimulando o reprimiendo la expresión de genes transcripcionales que dependen de la dimerización del receptor X del ácido retinoico (RXR) y/o el reclutamiento de coactivadores, como el coactivador del receptor de esteroides (SRC). Además de los receptores nucleares, las hormonas tiroideas también pueden actuar uniéndose a la integrina $\alpha\beta3$, que está presente en la membrana celular y activa una cascada de transducción de señales a través de MAPK y ERK1/2 para regular la transcripción y la fosforilación de sus receptores nucleares (Silva y cols. 2018).

Los TRs que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando y los receptores de TSH (TSHR) acoplados a proteína G han demostrado una amplia expresión en la unidad fetomaterna durante la ventana de implantación (Vissenberg y cols. 2015), sugiriendo una acción local de hormonas tiroideas y TSH, tanto en el endometrio como en el embrión (Forhead y cols. 2014). Las isoformas de TR α 1, TR α 2 y TR β 1 están presentes en la placenta y su expresión aumenta con la edad fetal. Además, estos receptores están presentes en el trofoblasto intersticial y extraviloso. También la tiroperoxidasa y la tiroglobulina son expresadas por el endometrio y pueden ser responsables de la producción local de hormonas tiroideas en el interfaz materno-fetal. En humanos, la concentración sérica de hCG se al primer trimestre de gestación es producida por la placenta. Dicha hormona tiene la capacidad de unirse al receptor de TSH. Y estimular el eje hipotálamo hipófisis tiroides de la madre (Figura 7). Durante el embarazo, la placenta complementa la función hepática materna, ya que produce transtirenina, antitripsina y glicoproteína ácida β 1, proteínas). Este evento depende de los transportadores de membrana, incluidos MCT8, MCT10, OATP1A2 y OATP4A1 (Silva y cols. 2018; Figura 7).

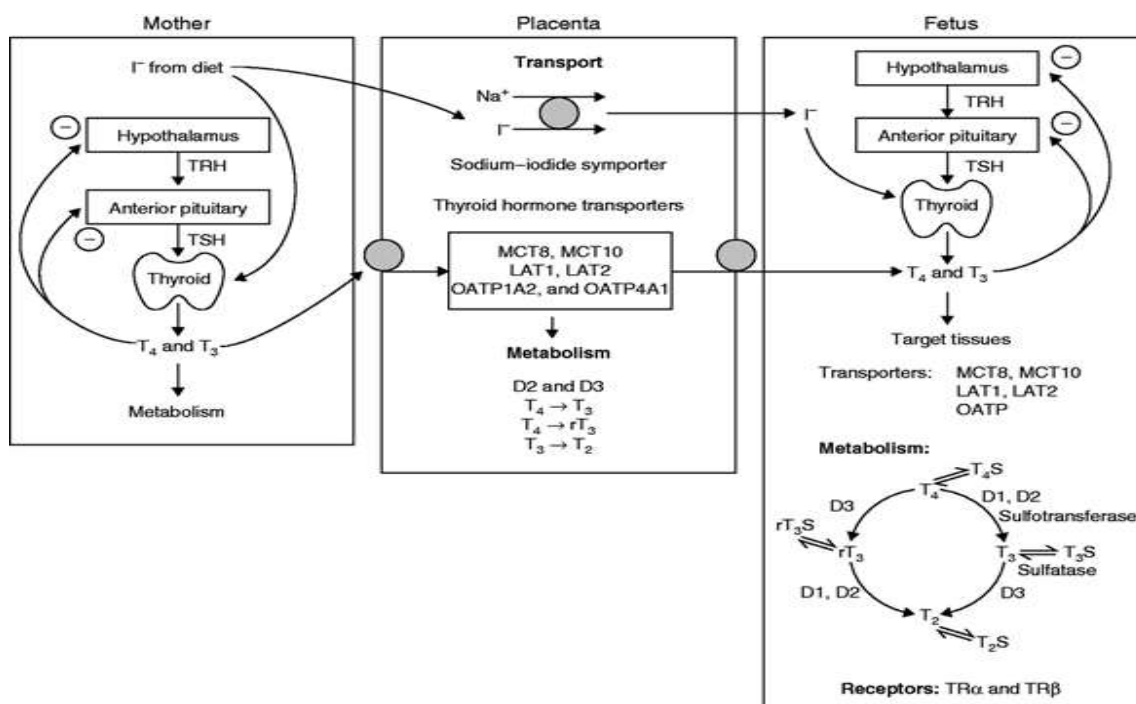


Figura 7. Diagrama donde se muestra los factores que afectan la biodisponibilidad de las hormonas tiroideas en el feto, la placenta y la madre. TRH, hormona liberadora de tirotrópica; TSH, hormona estimulante de la tiroidea; T4, tiroxina; T3, triyodotironina; rT3, reversa T3; T2, diyodotironina; S, sulfatada; D1, D2 y D3, desyodasas; OATP, transportadores de aniones orgánicos; LAT1 y LAT2, transportadores de ácidos de tipo aminoácidos 1 y 2; MCT8 y MCT10, transportadores de monocarboxilatos 8 y 10. Tomado de Forhead y cols. 2014.

El efecto de T4 y T3 sobre la fertilidad se continúa investigando ampliamente mediante la inducción experimental en animales de laboratorio o en animales domésticos como perros, vacas, ovejas y cerdos (Silva y cols. 2018). Los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas en mujeres y animales influyen en mecanismos moleculares que afectan el control del ciclo menstrual/estro, la maduración y el comportamiento sexual, la ovulación, la capacidad materna, el embarazo, y desde luego en el mantenimiento, crecimiento fetal, posnatal y lactancia (Silva y cols. 2018; Tabla 1). La acción de las hormonas tiroideas sobre la biodisponibilidad hacia otras hormonas y factores de crecimiento que también son necesarios para el correcto funcionamiento del sistema reproductor femenino (Vissenberg y cols. 2015). Las hormonas tiroideas actúan indirectamente con otras hormonas y factores de crecimiento, como el estrógeno, prolactina e IGF, al promover la liberación de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (Silva y cols. 2018).

Tabla 1. Evidencia disponible sobre las hormonas tiroideas y el efecto sobre la reproducción.

Hormonas tiroideas	
Fertilización y embriogénesis	El hipotiroidismo se asocia con tasas de fertilización más bajas y embriogénesis alterada. No se han reportado estudios sobre la fisiopatología.
Endometrio	Las D2 y D3, así como, TR α y TR β se expresan en el endometrio.
Implantation	La hormona tiroidea estimula la producción de P ₄ en las células de la granulosa y regula el LIF
Placentation	La T3 aumenta la expresión de MMP-2, MMP-3, fibronectina fetal e integrina $\alpha 5\beta 1$. La T3 se encuentra presente en trofoblastos extravillosos placentarios tempranos.

T3, triyodotironina; TR α , receptor de hormona tiroidea alfa; TR β , receptor beta de la hormona tiroidea; LIF, factor inhibidor de la leucemia; MMP-2,3, metaloproteinasas matriciales 2,3.

El desequilibrio de hormonas tiroideas se relaciona con dos patologías. El hipertiroidismo se caracteriza por un aumento de las concentraciones de hormonas tiroideas. Mientras que el hipotiroidismo es causado por la disminución de la concentración de las hormonas tiroideas. Ambas enfermedades pueden provocar infertilidad, irregularidades menstruales, anovulación, aborto, parto prematuro, preclamsia, restricción del crecimiento intrauterino y retraso mental en los niños (Silva y cols. 2018). Las hormonas tiroideas regulan el metabolismo fetal, estimulando el consumo de oxígeno y regulando las acciones de otras hormonas y factores de crecimiento que influyen en el desarrollo fetal (Forhead y cols. 2014).

La prevalencia de hipotiroidismo clínico y subclínico en mujeres en edad reproductiva y durante el embarazo es de 0.3% y 4.3%, respectivamente (Silva y cols. 2018). El hipotiroidismo generalmente en mujeres y animales está relacionada con trastornos reproductivos, como inicio tardío de la pubertad, anovulación, quistes ováricos, irregularidad menstrual, infertilidad, aumento de la frecuencia de abortos espontáneos, y el nacimiento de recién nacidos prematuros con bajo peso al nacer y anomalías congénitas (Silva y cols. 2018). El hipotiroidismo en mujeres embarazadas va de un 3% a 15%. Esta patología se asocia con múltiples secuelas desfavorables en la madre y el feto, incluido el aborto espontáneo, preclamsia, hipertensión gestacional, diabetes gestacional, parto prematuro y la disminución del cociente intelectual en su descendencia (Negro y cols. 2014).

2. ANTECEDENTES

2.1 Hormonas tiroideas y sistema inmunitario

Las hormonas tiroideas son importantes durante el embarazo, regulan la respuesta inflamatoria al inicio de la gestación para prevenir el rechazo inmune fetal y promover el desarrollo placentario normal a través de la regulación de la secreción de citocinas y factores de crecimiento antigénicos (Vasilopoulou y cols. 2014). Sin embargo, los efectos de estas disfunciones en tejido reproductivo de mujeres y animales dependerán del momento de aparición de la disfunción endocrina en relación con la concepción y de la gravedad del hipotiroidismo. Sabemos que el aborto, parto prematuro, preclamsia, muerte fetal y déficits mentales en los niños son secuelas bien documentadas de la disfunción tiroidea materna en las mujeres (Silva y cols. 2018). El déficit de hormonas tiroideas está relacionado con problemas en tejidos reproductivos como sucede en el útero. El hipotiroidismo aumenta los niveles séricos de factor inhibidor de la leucemia, un factor importante involucrado en el proceso de decidualización e implantación del embrión (Silva y cols. 2018). En ratas hipotiroideas se ha descrito que tienen un área decidual reducida y expresan un aumento en la expresión de VEGF a la mitad de la gestación (Silva y cols. 2018). En relación con el desarrollo fetal-placentario, el hipotiroidismo afecta el peso placentario y fetal retrasando el crecimiento, tanto en mujeres como en ratas, además de una reducción de vasos fetales (Silva y cols. 2018). Esto puede presentar alteraciones en las reservas de glucógeno placentario y actividad reducida del trofoblasto, aumentando la apoptosis placentaria (Silva y cols. 2018). El desarrollo fetal-placentario también depende del ambiente anti-inflamatorio apropiado en la interfaz materno-fetal durante el embarazo. Las células inmunes leucocitaria como las NK y macrófagos del endometrio cuentan con TRs $\alpha 1$ y $\beta 1$ que son capaces sintetizar a las hormonas tiroideas (Vasilopoulou y cols. 2014; Montesinos y Pellizas, 2019).

En pacientes con hipertiroidismo se han observado respuestas inmunes desequilibradas, incluida la producción anormal de anticuerpos (ya sea mayor o menor), mayor migración de leucocitos y mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por macrófagos (Jara y cols. 2017). Jara y cols. (2017) mencionaron que en los pacientes con hipotiroidismo muestran déficits inmunes, por lo que aumentan significativamente la susceptibilidad a las infecciones, sobre todo en pacientes que tienen enfermedades

inflamatorias crónicas como sepsis grave, shock séptico y shock hemorrágico tienen una incidencia concurrente de padecer hipotiroidismo en un 12 %.

2.2 El hipotiroidismo como una enfermedad inflamatoria crónica

Mujeres embarazadas con hipotiroidismo tienen más posibilidades de dar a luz a niños con mayor peso al nacer (Hou y cols. 2015). En modelos animales, se ha encontrado que el hipotiroidismo podría ser considerada una enfermedad inflamatoria crónica, ya que se asocia con la infiltración de células inmunes en diversos órganos como el páncreas (Rodríguez-Castelán y cols. 2015), hígado (Rodríguez-Castelán y cols. 2017), músculos pélvicos (Sánchez-García y cols. 2017), ovario (Rodríguez-Castelán y cols. 2017) y útero (Rodríguez-Castelán y cols. 2019). En lo referente al útero, el hipotiroidismo se asocia un aumento el grosor del endometrio (Rodríguez-Castelán y cols. 2019) e induce macrosomía fetal (datos sin publicar), lo que indica que el hipotiroidismo durante el embarazo altera el crecimiento y desarrollo embrionario. En ratas con hipotiroidismo se observó un aumento de citocinas inflamatorias (MIF e INF- γ) al final de la gestación y una reducción en la migración trofoblásticas endovasculares y en la expresión de factores pro-angiogénicos como VEGF (Silva y cols. 2018). De la misma manera la tiroidectomía en ratas antes de la gestación no tiene ningún efecto sobre el peso placentario, pero retrasa el crecimiento fetal en el hipotiroidismo moderado a severo. Sin embargo, la inducción de hipotiroidismo materno moderado o severo poco después de la concepción retrasa permanentemente el crecimiento fetal y el aumento de peso placentario (Silva y cols. 2018). La infiltración de células inmunes en el endometrio en humanos como en mamíferos es común. Sin embargo, Rodríguez-Castelán y cols. (2019) observaron una mayor inflamación en el grupo hipotiroideo con respecto al grupo control; muchas de estas células inmunes infiltradas en el endometrio eran macrófagos CD163+ y la expresión de VEGF-A, también se encontró aumentada en el grupo hipotiroideo. En ratas hipotiroideas se observan niveles elevados de leptina circulante y niveles reducidos de corticosterona, hormona del crecimiento e IGF (Silva y cols. 2018).

2.3 Consecuencias de un exceso de inflamación del endometrio

El embarazo se considera un estado pro-inflamatorio que requiere una adaptación fisiológica del sistema inmunológico de la madre. Sin embargo, existen diversas patologías que se asocian con la inflamación excesiva en el endometrio.

Endometriosis y adenomatosis. En la adenomatosis, el epitelio endometrial y glandular liberan diversas moléculas pro-inflamatorias que actúan como señales para promover la infiltración de células inmunes. Entre las moléculas están CD163 (Zhi y cols. 2018; Smith y cols. 2012; Duan y cols. 2018), CD68 (Orazov y cols. 2017), CD24 (Sundqvist y cols. 2012), IL-6, IL-10 y MCP-1, lo que conduce a problemas de implantación (Zhinong y cols. 2016). Este tejido inflamado, posteriormente, puede desprenderse y ocasionar endometriosis y dolor pélvico crónico. La endometriosis es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por el crecimiento ectópico del tejido endometrial. Las mujeres con endometriosis también tienen mayor expresión de IL8 (Arıcı y cols. 2002), IL-13 e IL-15 (Chegini y cols. 2003) en el endometrio. Las mujeres con adenomiosis muestran una mayor infiltración de macrófagos CD68+ (Orazov y cols. 2017). En mujeres con endometriosis, el porcentaje de células NK peritoneales positivas para CD94/NKG2A fue significativamente mayor con respecto al grupo control (Galandrini y cols. 2008).

Preeclampsia. La preeclampsia es otra causa relacionada con la morbilidad y mortalidad materna y fetal. La placenta humana se asocia con una disminución de la formación de arterias espirales (Harris y cols. 2019). Los macrófagos y las células NK aumentan en número desde el endometrio secretor hasta el embarazo temprano y desempeñan un papel crítico en la mediación del proceso de transformación de la arteria espiral al inducir cambios estructurales iniciales. La remodelación vascular de las arterias espirales se inicia independientemente de la invasión del trofoblasto (Harris y cols. 2019).

Diabetes gestacional. La diabetes gestacional se asocia con una mayor infiltración de marcadores de macrófagos (CD68, CD14 y EMR-1) con respecto al grupo control (Mrizak, y cols. 2014). En otro estudio realizado por Barke y cols. (2018) se menciona que el CD163 se expresa exclusivamente en los macrófagos y a menudo se utiliza como un marcador para los macrófagos placentarios. Por lo que se encontró un aumento en la

expresión de CD163 dentro del corion y la decidua en mujeres con diabetes mellitus gestacional. Estos datos se asocian con la patogénesis de la diabetes mellitus gestacional y la patogénesis de la macrostomia fetal (Atègbo y cols. 2006).

Placenta acreta. El término de placenta acreta se define como las vellosidades coriónicas se adhieren a (acreta), invaden (inacreta) o penetran (peracreta) en el miometrio (Bulmer, 1992). La patogenia de la placenta acreta es desconocida; sin embargo, se ha propuesto teorías, como: los cambios fisiológicos defectuosos en algunas arterias espirales pueden conducir a una migración excesiva del trofoblasto como un intento de mecanismo compensatorio (Bulmer, 1992). Una extensa neovascularización y una alta expresión de factores antigénicos se puede relacionar con casos de espectro de placenta acreta (EPA; Bartels y cols. 2018). Por otra parte, se ha reportado que una puntuación baja de células NK se asoció con casos de placenta acreta con adherencia mórbida (Laban y cols. 2014). La presencia de células NK y citosinas en el útero, entre sus funciones principales ayuda a controlar la invasión del trofoblasto en el útero, sin embargo, alteraciones en su expresión podría contribuir a patologías como EPA (Sharma y cols. 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de hipotiroidismo en mujeres embarazadas es de 3-15% y se ha asociado con múltiples secuelas desfavorables en la madre y el feto, incluido el aborto espontáneo, preeclampsia, hipertensión gestacional, diabetes gestacional, parto prematuro y disminución del coeficiente intelectual en su descendencia y macrosomía fetal (Atègbo y cols. 2006; Negro y cols. 2014). Las hormonas tiroideas son importantes para un correcto funcionamiento, metabolismo y desarrollo del aparato reproductor femenino (Silva y cols. 2018). Su acción regula respuestas inflamatorias al inicio del embarazo para prevenir el rechazo inmune fetal y promover el desarrollo placentario normal a través de secreción de citosinas y factores de crecimiento antigénicos (Vasilopoulou y cols. 2014).

Las células NK y macrófagos son abundantes dentro del tejido uterino y juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune (Leno y cols. 2014), sus niveles más altos ocurren en el primer y segundo trimestres del embarazo. Una excesiva acumulación de NK en el útero puede generar un ambiente citotóxico en este, provocando una proliferación y diferenciación del trofoblasto donde podría verse obstaculizada la implantación y la placentación. Por otra parte, el mal funcionamiento de los macrófagos está relacionado con aborto espontáneo y la preeclampsia (Svensson y Ernerudh 2015). La expresión de marcadores de superficie como CD94 para NK y CD163 para macrófagos ha sido utilizada como biomarcadores de procesos inflamatorios (Zhi y cols. 2018). La expresión de CD94 se ha medido en mujeres embarazadas con preeclampsia en el último trimestre del embarazo donde se observó un aumento considerable de esta (Eidukaite y cols. 2004). Las NK y macrófagos del endometrio cuentan con receptores de hormonas tiroideas y son capaces incluso de sintetizar a las hormonas tiroideas (Vasilopoulou y cols. 2014). En modelos animales el hipotiroidismo afecta la decidualización del endometrio y la implantación del trofoblasto en el útero en ratas (Silva y cols. 2014). En la coneja, el hipotiroidismo produce hiperplasia uterina, mayor tamaño en la circunferencia abdominal, inflamación y alteración en la expresión de hormonas esteroides (Rodríguez-Castelán y cols. 2019) así como también promueve macrosomía fetal (datos sin publicar). De esta manera que el presente estudio pretendemos analizar cómo las hormonas tiroideas podrían estar modificando la expresión de células inmunes a lo largo del embarazo.

4. HIPÓTESIS

El hipotiroidismo aumenta la expresión de CD163 y CD94 en el útero de conejas hipotiroideas durante la gestación.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Determinar si el hipotiroidismo aumenta la expresión de CD163 y CD94 en el útero de conejas hipotiroideas durante la gestación.

5.2 PARTICULARES

1. Localizar la presencia de CD163 y CD94 en el útero de coneja por medio de la técnica inmunohistoquímica.
2. Cuantificar el número de células CD163 en el endometrio de conejas no gestantes y gestantes de 5 10 y 20 días en sitio con y sin implante en controles e hipotiroideas
3. Cuantificar el número de células CD94 en el endometrio de conejas no gestantes y gestantes de 5, 10 y 20 días en sitios con y sin implante de controles e hipotiroideas

6. METODOLOGÍA

Animales. Se utilizaron conejas adultas vírgenes y gestantes de 8-12 meses de edad de la raza chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*), mantenidas 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*. Para la realización de este proyecto se utilizaron 6 conejas controles e hipotiroideas tanto vírgenes como gestantes (5, 10 y 20 días de gestación).

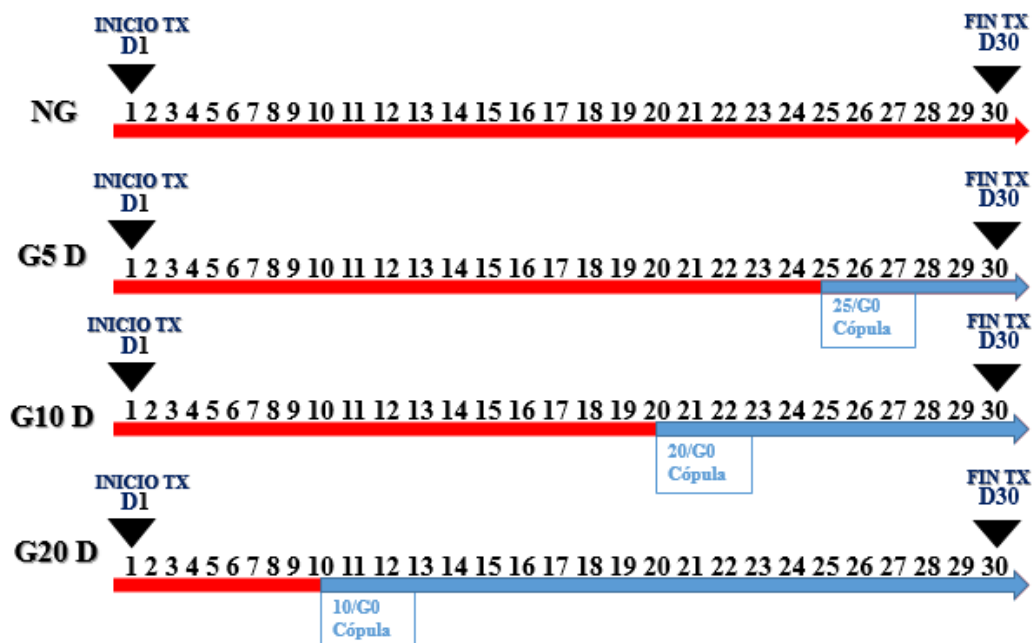


Figura 8. El tratamiento de animales. Tratamiento de 30 días en conejas controles (consumo de agua potable) hipotiroideas (consumo de agua potable con una concentración de 0.02% metimazol). no gestantes (NG) y gestantes durante la implantación (G5 D), placentación (G10 D) y degeneración de cuerpo lúteo (G20 D).

Inducción del hipotiroidismo. Se llevó a cabo mediante el tratamiento con el fármaco anti-tiroideo metimazol (Sigma), que se les administró en agua potable a una concentración de 0.02% durante treinta días (10 mg/kg; Méndez-Tepepa 2019). Para el grupo gestante el tratamiento se ajustó a los 5, 10 y 20 días de gestación (Méndez-Tepepa 2019). Al término del tratamiento, ambos grupos fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (60 mg/kg). Para el sacrificio se administró una sobredosis de 60 mg/kg de pentobarbital. Se extrajo una porción media de tejido útero (sitios de no implante e

implante), tanto izquierdos como derechos. Los úteros derechos fueron congelados y guardados.

Inmunohistoquímica anti-CD163 y anti-CD94. Los úteros medios izquierdos de conejas controles e hipotiroideas grávidas fueron fijados en una solución de Bouin-Duboscq por 12 h. Los tejidos se deshidrataron 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 colocarán 6 cortes en una laminilla. Los cortes de útero se observaron con un microscopio para el posterior análisis histológico. Se utilizó una laminilla de útero por coneja para realizar la técnica de inmunohistoquímica en base al método adivina-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-CD163 (1:20), (C-16):sc18797, Santa Cruz Biotechnology) o anti-CD94 (1:500, ab217362 Abcam) en una cámara húmeda a 4°C durante una noche. Seguido de ello, los cortes se incubaron con un anticuerpo secundario mouse anti-goat (1:250) y mouse anti-rabbit (1:250) durante 2 h temperatura ambiente. Después, los cortes se lavaron con una solución buffer de fosfatos (PBS; pH= 7.2) y se incubaron con el ABC durante 1 h. Para luego realizar el revelado con una solución de diaminobencidina (DAB) al 0.05% y H₂O₂ al 30% en PBS hasta localizar el marcaje en el tejido de útero (capa epitelial, submucosa, músculo y células inmunes). Por último, los cortes se deshidrataron en alcoholes a concentraciones ascendentes y se cubrieron con Cytoseal TM 60 y un cubreobjetos. Para determinar la inmunolocalización y descripción de la presencia macrófagos CD163+ o NK CD94+ positivos en el tejido del útero, se observará el tejido con un microscopio de luz visible (Nikon ECLIPSE E600).

Cuantificación de células positivas de CD163 y CD94

Una vez dejando secar por 3 días las laminillas después de la inmunotinción. Se continuo a tomar fotos, en el microscopio de luz visible (Nikon ECLIPSE E600) a 40x, tomando 10 campos por tejido de forma aleatoria, en regiones de vasos subepiteliales y en la capa muscular, esto para CD163+ y CD94+.

Semicuantificación de marcaje CD163 y CD94 en células no inmunes. Dado que se observa marcaje CD163+ y CD94+ en células no inmunes se realizó una semicuantificación de este. Para ello, se tomaron fotos de endometrio y miometrio a 40x. Se consideró la categorización de +, ++ y +++ para poco, moderado o alto marcaje,

respectivamente, dependiendo la proporción de células positivas observadas. Esto se realizó para todos los animales y se hizo un consenso de lo que predominaba para cada tejido y grupo de animales.

Análisis estadístico. Los valores obtenidos de los diferentes marcadores para CD163+ con una n3 y CD94+ una n6 donde fueron analizados mediante una prueba ANOVA de 2 vías usando el programa GBStat.

7. RESULTADOS

7.1 Inmunodetección de CD163 en el útero gestante

Se observaron macrófagos CD163+ presentes en el tejido uterino de la coneja, en condición no gestante y gestante del grupo control e hipotiroideo, durante implantación (5 días), placentación (10 días) y degradación del cuerpo lúteo (20 días) en sitio inter-implante y con implante (Figura 9; Tabla 2). En el sitio sin implante, del grupo control y grupo tratado con metimazol, se observó un marcaje de intensidad leve en partes del epitelio, moderada expresión en glándulas uterinas, estroma y capa muscular. Para el sitio con implante, hubo moderado inmunomarcaje en epitelio y glándulas uterinas, no obstante, en el estroma y capa muscular se observó una moderada expresión en el grupo hipotiroideo en comparación con el grupo control (Figura 9; Tabla 3)

7.2 Macrófagos CD163+ en vasos subepiteliales de útero

La gestación no modificó el número de macrófagos CD163+ en los animales eutiroides (Figura 10A). Sin embargo, hubo una disminución de macrófagos CD163+ al día 10 de la gestación en el grupo tratado con metimazol, valor que fue significativamente diferente en comparación con el día 20 (Figura 10A). Por otra parte, no se observaron diferencias en el número de macrófagos CD163+ de los animales eutiroides en los sitios con implante al comparar entre el día 10 y 20 de gestación (Figura 10B). Al día 20 de gestación se encontró un aumento en el número de células CD163+ en el grupo hipotiroideo en comparación con el grupo control (Figura 10B).

7.3 Macrófagos CD163+ en la capa muscular de útero

No se encontraron diferencias en el número de macrófagos CD163+ en vasos de la capa muscular a lo largo de la gestación. El tratamiento con metimazol no modificó el número de macrófagos CD163+ presentes en esta capa en los sitios sin (Figura 11A) y con implante (Figura 11B).

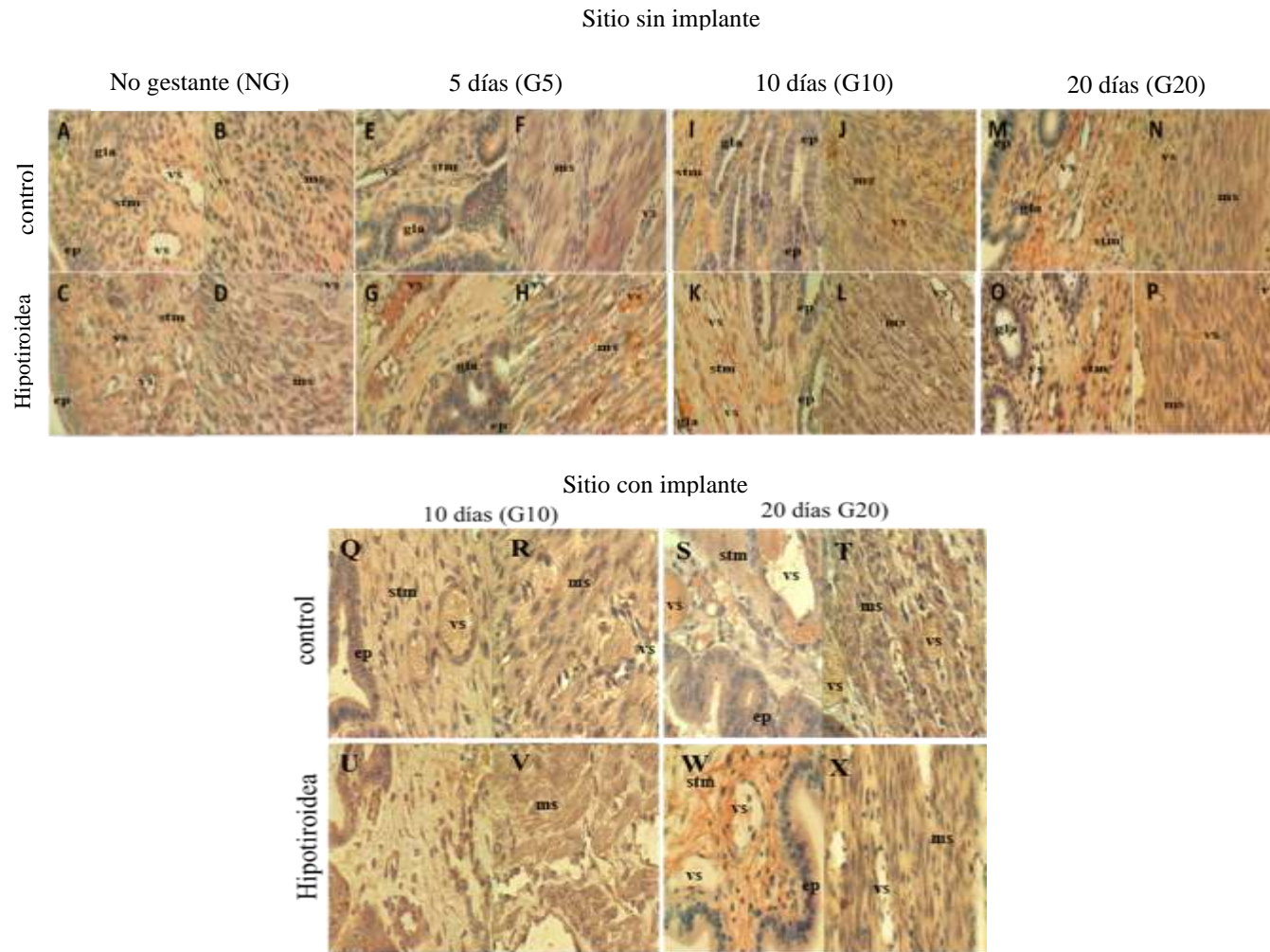


Figura 9. Inmunohistoquímica anti-CD163+ en el útero de la coneja no gestante y gestante control e hipotiroidica.

A) Sitio sin implante; no gestante (NG) control e hipotiroidica, gestante al día 5 (implantación), día 10 (placentación) y día 20 (degradación del cuerpo lúteo) control e hipotiroidica.
 B) Sitio con implante; día 10 (placentación) y día 20 (degradación del cuerpo lúteo) ep; epitelio, stm; estroma, gla; glándula, vs; vasos (* indica de células CD94+).

REGIONES DEL TEJIDO	CONDICIÓN	NG	G5	G10	G20
Epitelio luminal	Control	+	+	+	+
	Hipotiroidea	+	+	+	+
Glándulas uterinas	Control	+	+	+	+
	Hipotiroidea	++	+	+	+
Estroma (decidua basal)	Control	+	+	+	+
	Hipotiroidea	++	++	++	++
Musculo	Control	+	+	+	+
	Hipotiroidea	+	++	+	++

Tabla 2. Semicuantificación en la expresión de CD163+ en útero en sitio sin implante de conejas controles e hipotiroideas. No gestantes (NG) y 10 días (G10) y 20 días (G20); indica (+) poca expresión, (++) moderada expresión, (+++) alta expresión.

REGIÓN DEL TEJIDO	CONDICIÓN	G10	G20
Epitelio luminal	Control	+	+
	Hipotiroidea	++	+
Glándulas uterinas	Control	+	+
	Hipotiroidea	++	+
Estroma (decidua basal)	Control	+	+
	Hipotiroidea	++	++
músculo	Control	+	++
	Hipotiroidea	++	++

Tabla 3. Semicuantificación en la expresión de CD163+ en útero en sitio con implante de conejas controles e hipotiroideas. Gestante al día 5 (implantación), s en 10 días (placentación) y 20 días (Degradación del cuerpo lúteo); indica (+) poca expresión, (++) moderada expresión, (+++) alta expresión.

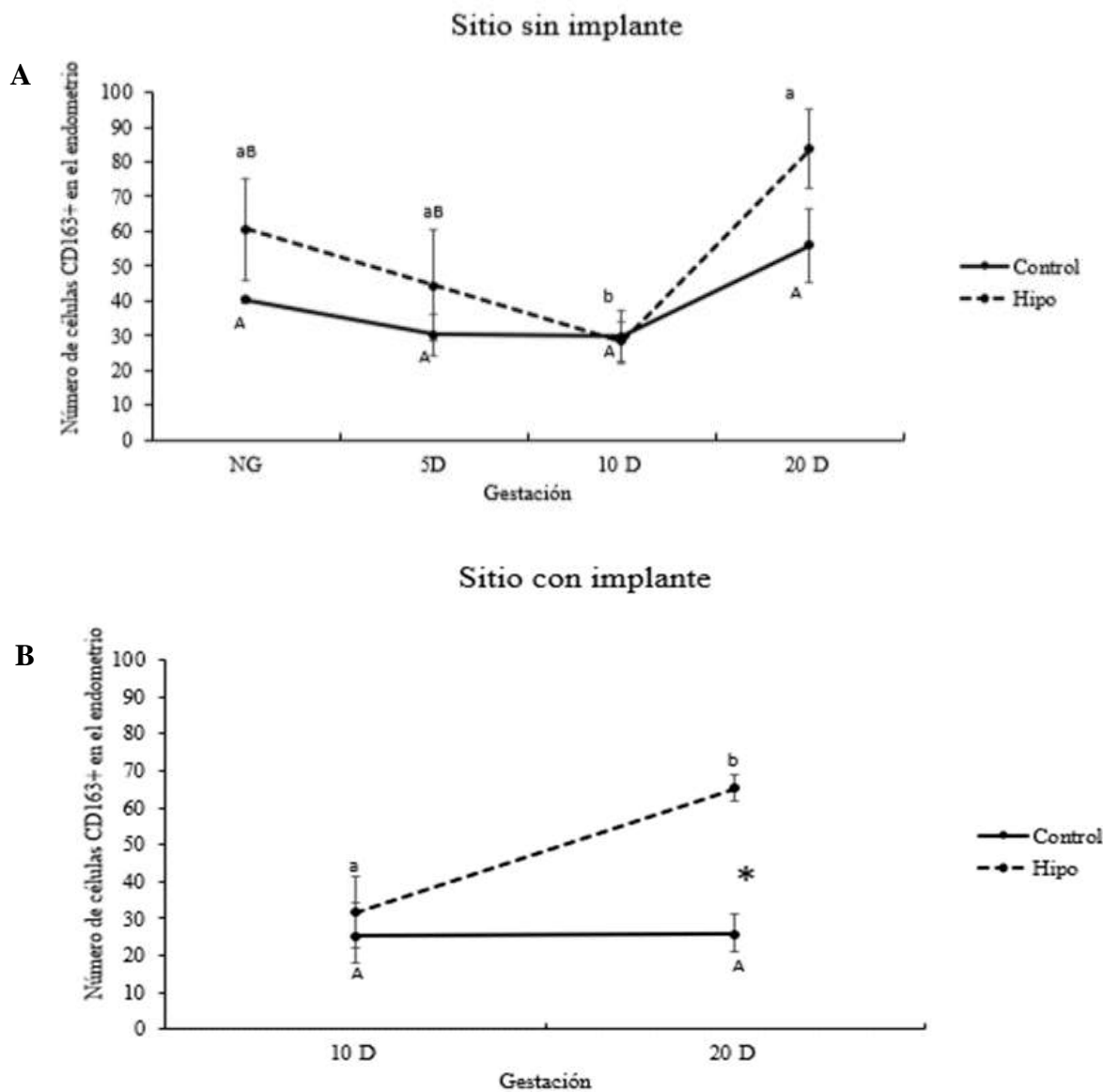
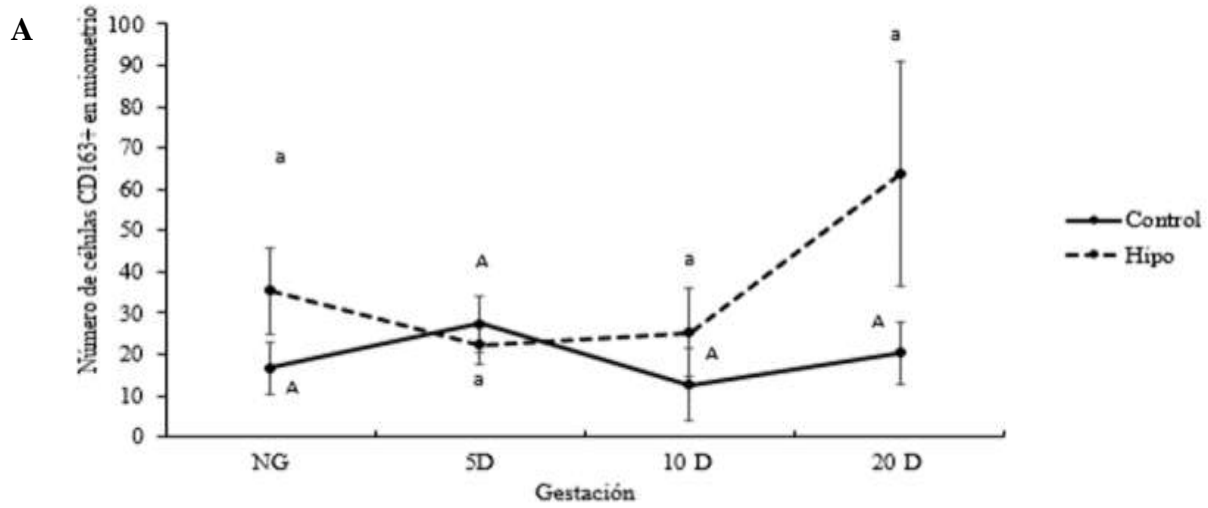


Figura 10. Cuantificación de células CD163+ en vasos de la región subepitelial, en condición no gestante y gestante en conejas controles e hipotiroideas. Eje de las Y; el número de células inmunes, en el eje de las X; los tiempos de gestación. Gráfica A) sitio sin implante: no gestante (NG) y gestante al día 5 (implantación), día 10 (placentación) día 20 (degradación del cuerpo lúteo). Gráfica B) Sitio con implante, día 10 (placentación) y día 20 (degeneración de cuerpo lúteo); grupo control (línea negra) y el grupo hipotiroideo (línea punteada) n=3.

Sitio sin implante



Sitio con implante

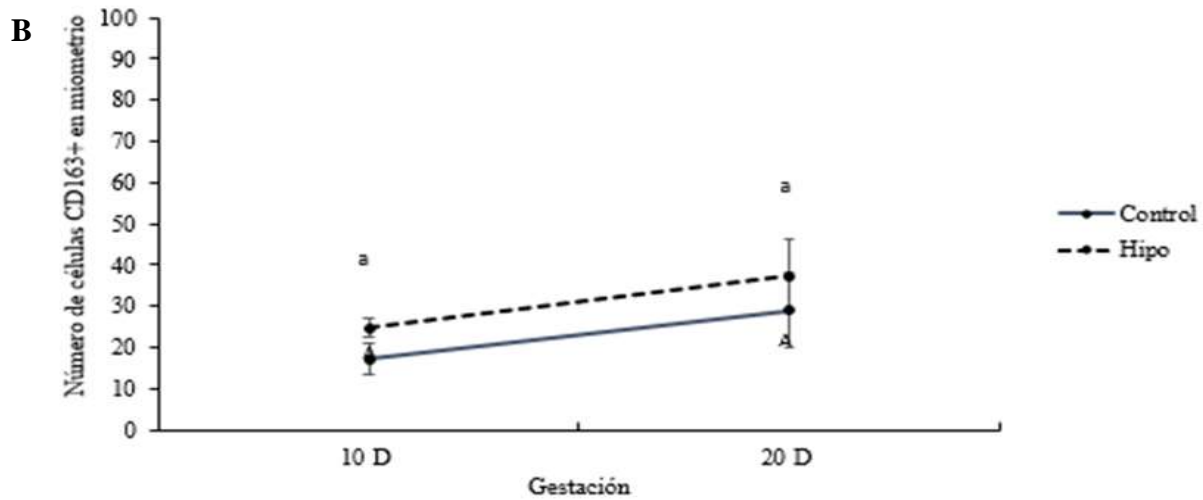


Figura 11. Cuantificación de células CD163+ en región de la capa muscular, en condición no gestante y gestante en conejas controles e hipotiroideas. Eje de las Y; el número de células inmunes, en el eje de las X; los tiempos de gestación. Gráfica A) sitio sin implante: no gestante (NG) y gestante al día 5 (implantación), día 10 (placentación) día 20 (degradación del cuerpo lúteo). Gráfica B) Sitio con implante, día 10 (placentación) y día 20 (degeneración de cuerpo lúteo); Grupo control (línea negra) y el grupo hipotiroideo (línea punteada) n=3.

7.4 Inmunodetección de CD94 en el útero gestante

La presencia de células inmunorreactivas anti-CD94+ se observaron en el útero de las conejas no gestantes (NG) y gestantes, tanto del grupo control como hipotiroideo. En los animales controles no gestantes, gestante al día 5 (implantación), día 10 (placentación) y día 20 (degradación del cuerpo lúteo); en el sitio sin implante, se observó inmunomarcaje en células dentro de vasos, que sugieren ser células NK CD94+. Sin embargo, también células del epitelio, estroma, glándulas uterinas y capa muscular mostraron este marcaje (Figura 12 y Tabla 4). En los animales hipotiroideas, el marcaje CD94+ fue similar a los animales no tratados, pero con mayor intensidad (Figura 12 y Tabla 4). Durante la gestación al día 10 (placentación) y día 20 (degradación del cuerpo lúteo) con implante se observaron células inmunes CD94+, así como el inmunomarcaje de la proteína CD94+ en el estroma, algunas glándulas uterinas y en la capa muscular. Tal inmunomarcaje fue mayor en los grupos hipotiroideos en comparación con los grupos eutiroideos (Figura 12; Tabla 5).

7.5 Cuantificación de células CD94+ en vasos del estroma uterino

La gestación no afectó el número de NK CD94+ en el estroma uterino en los sitios sin y con implante. El hipotiroidismo, en cambio, disminuyó el número de células CD94+ en el día 10 de gestación del sitio sin implante en comparación con el grupo NG (Figura 13A). En el sitio con implante, no se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo hipotiroideo (Figura 13B).

7.6 Cuantificación de células CD94+ en vasos de la capa muscular uterina

La gestación no afectó el número de NK CD94+ en el músculo uterino en los sitios sin y con implante. Tampoco no se encontraron diferencias entre los grupos control y tratado con metimazol en los sitios sin (Figura 14A) y con implante (Figura 14A).

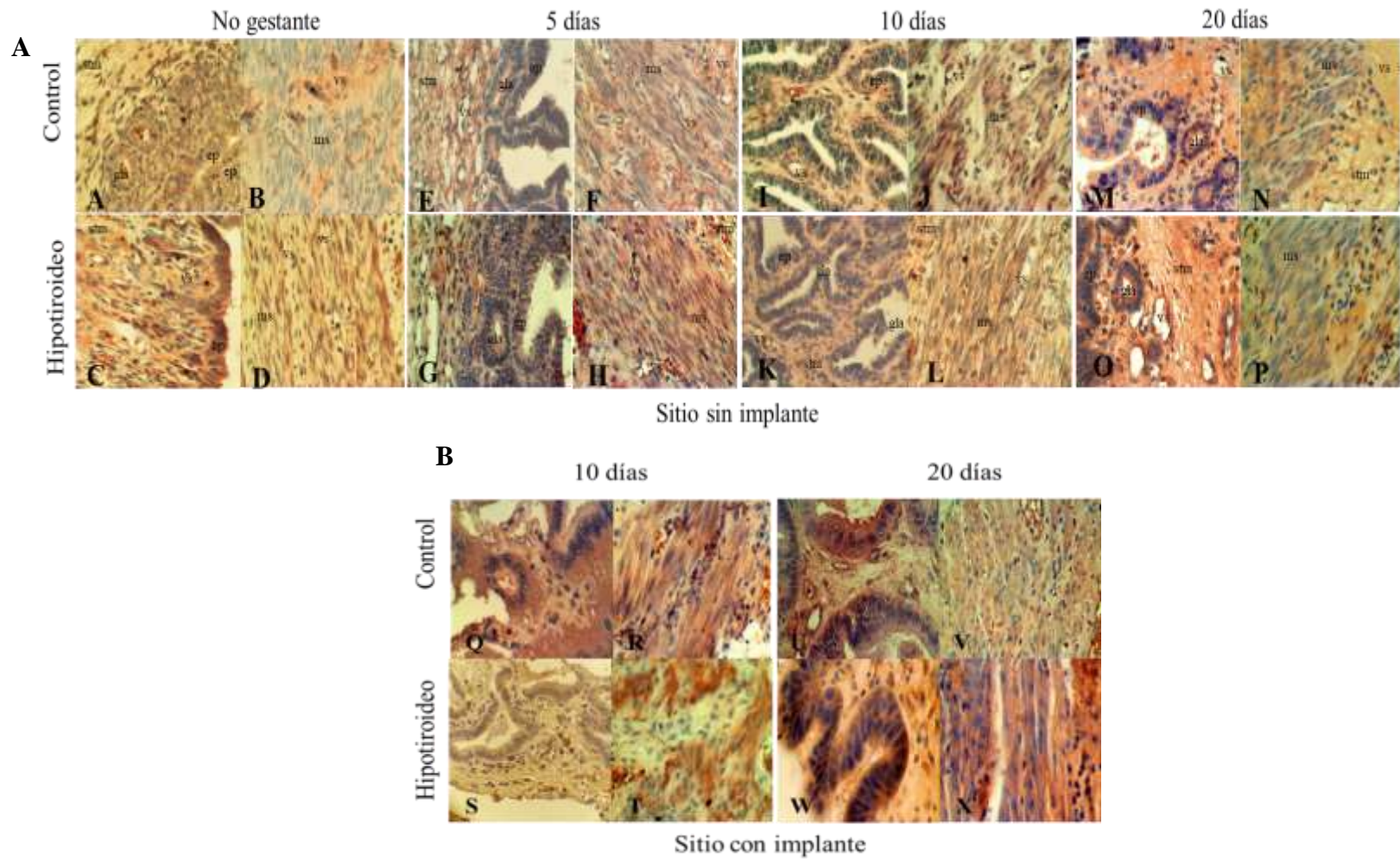


Figura 12. Inmunohistoquímica anti-CD94+ en el útero de la coneja no gestante y gestante control e hipotiroidica. A) Fotografías representativas de sitio sin implante; no gestante (NG) control e hipotiroidica, gestante al día 5 (implantación), día 10 (placentación) y día 20 (degradación del cuerpo lúteo) control e hipotiroidica. B) Sitio con implante; día 10 (placentación) y día 20 (degradación del cuerpo lúteo) ep; epitelio, stm; estroma, gla; glándula, vs; vasos (* indica de células CD94+).

REGIONES DEL TEJIDO	CONDICIÓN	NG	G5	G10	G20
Epitelio luminal	Control	+	+	+	+
	Hipotiroidea	++	++	+	++
Glándulas uterinas	Control	+	+	+	++
	Hipotiroidea	++	+	+	+
Estroma (decidua basal)	Control	+	+	++	+
	Hipotiroidea	++	++	+	++
Músculo	Control	+	+	++	+
	Hipotiroidea	++	+	+	++

Tabla 4. Semicuantificación en la expresión de CD94+ en útero en sitio sin implante de conejas controles e hipotiroideas. No gestantes (NG) y gestantes en 5 días (G5), 10 días (G10) y 20 días (G20) (+) poca expresión, (++) moderada expresión y (+++) alta expresión.

REGIONES DEL TEJIDO	CONDICIÓN	10 días (placentación)	20 días (degradación del cuerpo lúteo)
Epitelio	Control	+	+
	Hipotiroidea	+	++
Glándulas uterinas	Control	+	+
	Hipotiroidea	+	+
Estroma (decidua basal)	Control	+	+
	Hipotiroidea	++	++
musculo	Control	++	+
	Hipotiroidea	+	++

Tabla 5. Semicuantificación en la expresión de CD94+ en útero en sitio con implante de conejas gestantes de controles e hipotiroideas. Gestantes en 10 días (placentación) y 20 días (Degradación del cuerpo lúteo); indica (+) poca expresión, (++) moderada expresión y (+++) alta expresión.

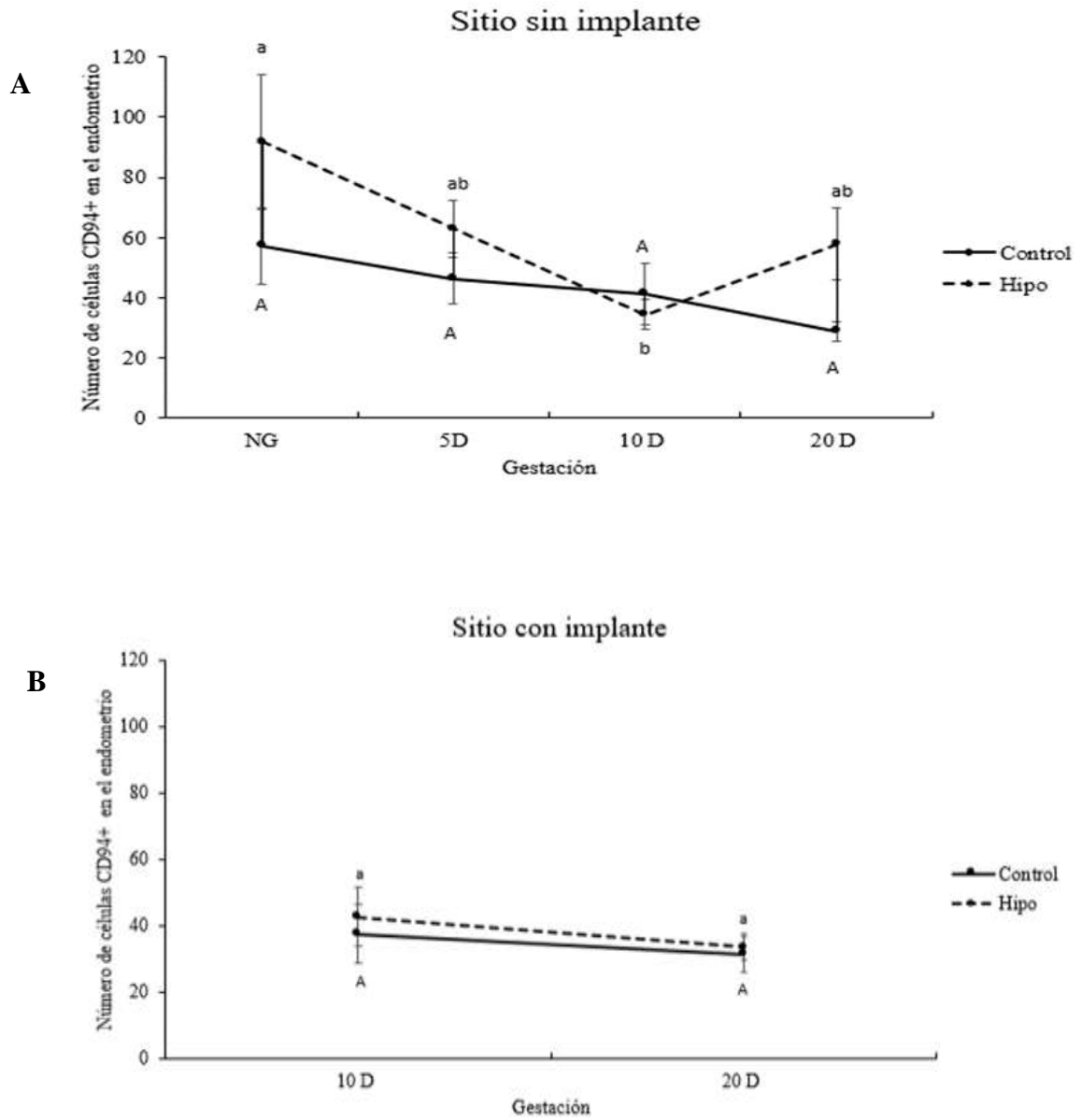


Figura 13. Cuantificación de células CD94+ en región de vasos subepitelial, en condición no gestante y gestante controles e hipotiroides. Eje de las Y; el número de células inmunes, en el eje de las X; los tiempos de gestación. Gráfica A). sitio sin implante no gestante (NG) implantación (día 5; 5D), placentación (día 10;10D) y degeneración de cuerpo lúteo (día 20; 20D). En grupos controles (negro) e hipotiroides (línea punteada). Gráfica B). En los sitios con implante, al día 10; placentación días 20; degradación del cuerpo lúteo. Grupo control (línea negra) y el grupo hipotiroideo (línea punteada) n=6.

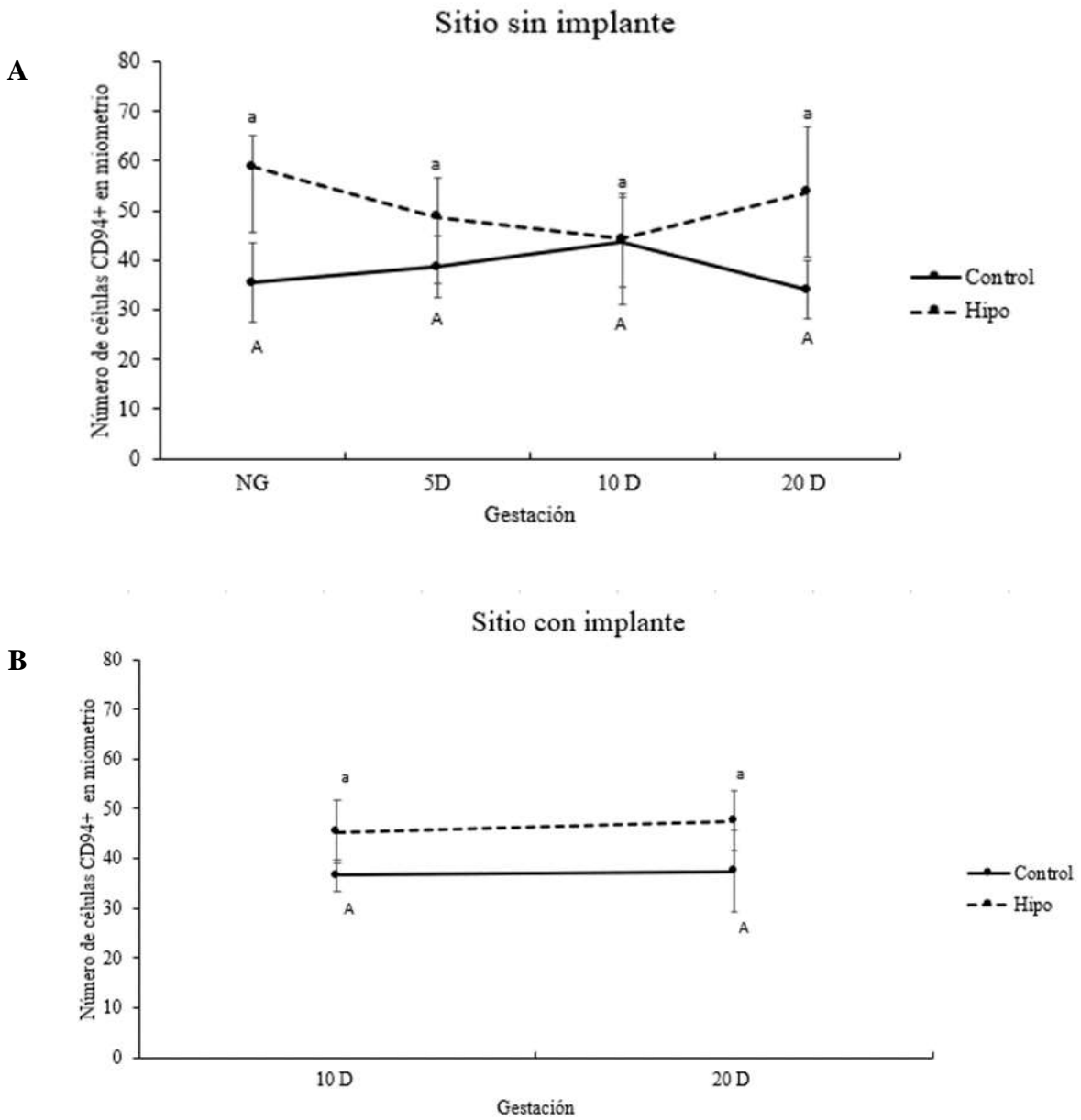


Figura 14. Cuantificación de células CD94+ en la capa muscular, en condición no gestante y gestante controles e hipotiroideas. Eje de las Y; el número de células inmunes, en el eje de las X; los tiempos de gestación. Gráfica A) sitio sin implante no gestante (NG) implantación (día 5; 5D), placentación (día 10;10D) y degeneración de cuerpo lúteo (día 20; 20D). En grupos controles (negro) e hipotiroideos (línea punteada). Gráfica B) En los sitios con implante, al día 10; placentación días 20; degradación del cuerpo lúteo control (negro) y el grupo hipotiroideo (línea punteada) n=6.

8. DISCUSIÓN

8.1 Hipotiroidismo y macrófagos CD163+

En este trabajo reportamos la expresión de CD163+ en tejido uterino de conejas controles e hipotiroideas donde reportamos expresión en diferentes tipos celulares: epitelio, glándulas uterinas, estroma y en la capa muscular, encontrando mayor expresión en el grupo hipotiroideo, en sitios con implante. En humanos como en animales de laboratorio, la proteína de CD163 ha sido utilizada como biomarcador de respuesta inflamatoria (Zhi y cols. 2018). La CD163 es una proteína de membrana glicosilada expresada exclusivamente en macrófagos y monocitos. Como receptor captador de macrófagos, la CD163 está involucrado en la inmunidad innata de bacterias y unión de inductores de apoptosis similares a TNF (Nie y cols. 2018).

También evaluamos el número de macrófagos CD163+ en vasos en región subepitelial, encontrando en sitio sin implante menor número de células CD163+ al día 10 de gestación. Sin embargo, cabe señalar que, en sitios con implante se encontró un mayor número de células CD163+ al día 20 de gestación. El aumento del marcador CD163 se ha relacionado en procesos inflamatorios en diferentes patologías como la endometriosis, diabetes gestacional y macrosomía fetal (Barke y cols. (2018); Duan y col, 2018 y Atègbo y cols. 2006) en otros estudios se reporta que el incremento de células CD163+ en el estroma se relaciona con adenomiosis (Tremellen y Russell 2012). Estas alteraciones de los macrófagos se correlacionan con los resultados adversos del embarazo, como el aborto espontáneo y la preclamsia (Svensson y Ernerudh, 2015) incluso puede verse afectados en patologías como el hipotiroidismo, Rodríguez-Castelán y cols. (2019) reportaron una alta infiltración de células inmunitarias en el endometrio, incluidos los macrófagos CD163+ (asociado a endometriosis) en útero de coneja virgen, así como varias alteraciones histológicas como la hiperplasia endometrial, proliferación epitelial y fusión de glándulas, e incluso desprendimiento de tejido epitelial. Durante la gestación, los macrófagos participan en la formación de la matriz extracelular, regulación muscular y crecimiento tisular, donde pueden realizar funciones homeostáticas indispensables para la formación de placenta (Houser 2012).

Las hormonas tiroideas son importantes durante el embarazo, regulan la respuesta inflamatoria al inicio de la gestación para prevenir el rechazo inmune fetal y promover el desarrollo placentario normal a través de la regulación de la secreción de citosinas y factores de crecimiento angiogénicos (Vasilopoulou y cols. 2014). Las NK y macrófagos cuentan con receptores a hormonas tiroideas y son capaces incluso de sintetizar a las hormonas tiroideas (Montesinos y Pellizas 2019). Este mecanismo de interacción hace que las hormonas tiroideas modulen la expresión de células inmunes en diversos órganos, este delicado equilibrio entre las hormonas tiroideas y células inmunes podría determinar el curso del embarazo e incluso explicar las alteraciones que se presentan en esta patología.

Las hormonas tiroideas modulan la producción de citocinas en varias células inmunitarias (Jara y cols. 2017). Los macrófagos CD163⁺ secretan TNF- α , IL-6, MCP-1 y VEGF-A, lo que apoya la presencia de inflamación uterina. Los macrófagos circulantes en el lecho placentario funcionan dependiendo medio celular al que están expuestos, incluidas las citoquinas locales, las quimiocinas y otras moléculas efectoras biológicas, así como la matriz extracelular y los componentes celulares. Por lo tanto, un microambiente local es importante en la activación alternativamente de células tolerogénicas e inmunomoduladoras que participan en la cicatrización de heridas y la remodelación de tejidos (Van der Spek y cols. 2016). En gran medida esta activación de la respuesta inmune esta mediada por hormonas incluidas, las hormonas tiroideas, las líneas de macrófagos expresan MCT10, D2, TR α 1 y TR β . Los macrófagos humanos como los murinos son capaces de producir una variante funcional de empalme de TSH β que está regulada positivamente por T3 y estimula al receptor de TSH (Van der Spek y cols. 2016). De esta manera, las concentraciones de T3 y T4 podrían modular la respuesta de macrófagos en el tejido del útero.

8.2 Hipotiroidismo y células CD94+

Un embarazo exitoso comprende de una población importante de leucocitos dentro de la decidua, donde se va a dar una regulación positiva de diversos genes involucrados en la regulación de la respuesta inflamatoria (tolerancia inmune). La presencia de células NK durante la gestación, se ha reportado que participa en muchos procesos de decidualización implantación, angiogénesis y formación de arterias espirales (Prabhu-Das y cols. 2015), además de guiar a las células del trofoblasto a no migrar más del tejido endometrial (Hanssens

y cols. 2013). Las NK son células leucocitarias innatas que se han reconocido cada vez más su importancia sobre aspectos en la tolerancia al injerto y la defensa inmune. Estas células reconocen las alteraciones de receptores activadores e inhibidores codificados por la línea germinal y muestran una amplia gama de funciones efectoras que juegan un papel importante en la respuesta a infecciones, tumores malignos y tejido alogénico (Calabrese y cols. 2018). Los receptores CD94 / NKG2 se expresan por la mayoría de las células NK y en subconjuntos de células T CD8+. En humanos como en modelos animales se ha utilizado este tipo marcadores, donde ha sido documentada en diversos órganos como riñón (Stanley y cols. 2001) hígado (Chen y cols. 2019), pulmón (Calabrese y cols. 2018) y tejidos reproductivos como el endometrio. (Yang y cols. 2004). Nuestros hallazgos revelan que hay presencia del marcador CD94+ en el útero de conejas controles e hipotiroideas. El inmunomarcaje del receptor CD94 se localizó en partes del epitelio, submucosa, algunas glándulas uterinas y alrededor de vasos. Conforme avanza la gestación se hacen más evidente la expresión de células alrededor de algunos vasos, sugiriendo a células CD94+, esto en el grupo control e hipotiroideo. Para el conteo de células NK en vasos en región subepitelial se reporta una disminución en el número de células CD94+ en sitio sin implante al día 10 de gestación. Laban (2014) reporta que una puntuación baja de células NK se asocia con casos de placenta accreta con adherencia mórbida, otros estudios reportan que una baja presencia de CD94+ se relaciona con patologías como preclamsia y endometriosis (Svensson y Ernerudh 2015), aún que estos resultados pueden ser contradictorios ya que en otros estudios reportan que un aumento del marcador CD94+ se relaciona con endometriosis (Galandrini y cols. 2008), aborto espontáneo recurrente y el fracaso de la fertilización in vitro (Ghafourian y cols. 2014). Entre las funciones de las células NK es delimitar la invasión del trofoblasto en el útero, en este trabajo se realizó un conteo de células CD94+ en la capa muscular, lo cual no encontramos diferencias entre el grupo control frente al hipotiroideo en sitios con y sin implante.

En nuestros hallazgos encontramos que el hipotiroidismo promueve varias alteraciones histológicas como la hiperplasia endometrial, e infiltración de células inmunitarias (Rodríguez-Castelán y cols. 2019). El hipotiroidismo podría asociarse, con una enfermedad inflamatoria crónica reportada por diversos estudios (Rodríguez-Castelán y cols.

2015; Rodríguez-Castelán y cols. 2017; Sánchez-García y cols. 2017; Rodríguez-Castelán y cols. 2017; Rodríguez-Castelán y cols. 2019).

Una de las limitaciones en la que se enfrentó este estudio, fue la falta un reactivo; complejo enzimático que se terminó a principios del mes de marzo del 2020, por contingencia sanitaria del virus SARS- CoV-2, llegó hasta mediados del mes de septiembre del mismo año, por lo que no dio tiempo terminar una $n6$ para el marcador CD163+.

9. CONCLUSIONES

La presencia de CD163+ y CD94+ en el tejido de útero, se encontró durante todo el periodo de la gestación. El inmunomarcaje se localizó en diferentes tipos celulares (epitelio, glándulas uterinas, alrededor de vasos, en partes del estroma y miometrio), si bien, el efecto del hipotiroidismo parece promover un aumento en el número de células CD163+ al día 20 de la gestación. Este aumento podría asociarse a alteraciones como la parto prematuro y macrosomía fetal. Por parte del marcador CD94+ donde al día 10 en sitio sin implante se encontró una disminución esto nos sugiere que podría asociarse con síndromes obstétricos como adenomiosis y endometriosis.

10. PERSPECTIVAS

En la coneja, el efecto del hipotiroidismo parece afectar la circunferencia abdominal y el peso de los fetos (datos sin publicar). Otros datos proponen que el incremento de células CD163+ en tejido uterino al día 20 de gestación, podrían apoyar el crecimiento y tamaño de los fetos (Ilhuicatzí-Netzahualcóyotl en proceso) De acuerdo con estos resultados sería interesante evaluar si las células inmunes como las NK, los neutrófilos y los macrófagos que son de las principales células en el interfaz materno fetal, podrían estar interviniendo en el peso de los fetos.

11. REFERENCIAS

- Adu-Gyamfi**, EA, Wan YX, Ding YB. 2020. The interplay between thyroid hormones and the placenta: a comprehensive review. *Biology of Reproduction* 102(1), 8–17.
- Aljabery F**, Olsson H, Gimm O, Jahnson S, Shabo I. 2018. M2-macrophage infiltration and macrophage traits of tumor cells in urinary bladder cancer. *Urologic Oncology* 36(4), 159.
- Andreotti JP**, Paiva AE, Prazeres P, Guerra D, Silva WN, Vaz RS, Mintz A, Birbrair A. 2018. The role of natural killer cells in the uterine microenvironment during pregnancy. *Cellular and Molecular Immunology* 15(11), 941–943.
- Arici A**. 2002. Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 955, 101–406.
- Atègbo**, JM, Grissa, O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Khan NA. 2006. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(10), 4137–4143.
- Barke TL**, Goldstein JA, Sundermann AC, Reddy AP, Linder JE, Correa H, Aronoff DM. 2018. Gestational diabetes mellitus is associated with increased CD163 expression and iron storage in the placenta. *American Journal of Reproductive Immunology* 80(4), 13020.
- Bartels HC**, Postle JD, Downey P, Brennan D J. 2018. Placenta accreta spectrum: a review of pathology, molecular biology, and biomarkers. *Disease markers* 1507674.
- Calabrese DR**, Lanier, LL, Greenland JR. 2018. Natural killer cells in lung transplantation. *Thorax*, 74(4): 397–404.
- Casey BM**, Dashe JS, Wells CE, McIntire DD, Byrd W, Leveno KJ, Cunningham FG. 2005. Subclinical hypothyroidism and pregnancy outcomes. *Obstetrics and Gynecology* 105(2), 239–245.
- Colicchia M**, Campagnolo L, Baldini E, Salvatore U, Herbert V, Costanzo M. 2014. Molecular basis of thyrotropin and thyroid hormone action during implantation and early development. *Human reproduction update* 20(6), 884–904.

- Chee** WK, Allen JC, Jr Lek SM, Chia ML, Tan NS, Tan TC. 2018. Serum progesterone distribution in normal pregnancies compared to pregnancies complicated by threatened miscarriage from 5 to 13 weeks gestation: a prospective cohort study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 18(1): 360.
- Chen** M, Xu M, Zhu C, Wang H, Zhao Q, Zhou F. 2019. Sirtuin2 enhances the tumoricidal function of liver natural killer cells in a mouse hepatocellular carcinoma model. *Cancer Immunol Immunother* 68(6):961-971.
- Chegini** N, Roberts M, Ripps B. 2003. Differential expression of interleukins (IL)-13 and IL-15 in ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis and normal fertile women. *American Journal of Reproductive Immunology* 49(2), 75.
- Cleary-Goldman** J, Malone FD, Lambert-Messerlian G, Sullivan L, Canick, J, Porter TF, D'Alton ME. 2008. Maternal thyroid hypofunction and pregnancy outcome. *Obstetrics and Gynecology* 112(1), 85–92.
- Czyzyk** A, Podfigurna A, Genazzani AR, Meczekalski B. 2017. The role of progesterone therapy in early pregnancy.: from physiological role to therapeutic utility. *Gynecology and Endocrinology* 33 (6): 421-424
- Di Renzo** GC, Giardina, I, Clerici G, Brillo E, Gerli S. 2016. Progesterone in normal and pathological pregnancy. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 27 (1): 35-48.
- Dos Santos** E, Duval F, Vialard F, Dieudonné MN. 2015. The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 24(1).
- Duan** J, Liu X, Wang H, Guo SW. 2018. The M2a macrophage subset may be critically involved in the fibrogenesis of endometriosis in mice. *Reproductive Biomedicine online* 37(3):254-268.
- Eidukaite** A, Siaurys A, Tamosiunas V. 2004. Differential expression of KIR/NKAT2 and CD94 molecules on decidual and peripheral blood CD56 bright and CD56 dim natural killer cell subsets. *Fertil Steril* 1: 863-8
- Faas** MM, De Vos, P. 2017. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta* 56, 44–52.

- Forhead** AJ, Fowden AL. 2014. Thyroid hormones in fetal growth and prepartum maturation. *Journal of endocrinology* 221 (3): R87-R103
- Galandrini** R, Porpora MG, Stoppacciaro A, Micucci F, Capuano C, Di Felice A, Benedetti-Panici P, Santoni A. 2008. Increased frequency of human leukocyte antigen-E inhibitory receptor CD94/NKG2A-expressing peritoneal natural killer cells in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 89:1490-6.
- Gorviny** C. M. 2015. The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *Journal of clinical and translational endocrinology* 2(3), 85–91.
- Guía de practica clínica IMSS**. 2016. Diagnóstico y tratamiento de HIPOTIROIDISMO PRIMARIO Y SUBCLÍNICO en el adulto. CENETEC IMSS-265-10
- Ghafourian** M, Karami N, Khodadadi A, Nikbakhat R. 2014. Increase of CD69, CD161 and cd94 on NK cells in women with recurrent spontaneous abortion and in vitro Fertilization Failure. *Iranian journal of immunology* 11(2), 84-96.
- Hanssens** S, Salzet M, Vinatier D. 2013. Aspectos inmunológicos de la gestación. *EMC - Ginecología-obstetricia* 49(2): 1–21.
- Harris** L, Benagiano MD, Elios MM, Brosens I, Benagiano G. 2019. Placental bed research: 2. Functional and immunological investigations of the placental bed. *American journal of obstetrics and gynecology* (19) 30894.
- Hou** J, Yu P, Zhu H, Pan H, Li N, Yang H, Chen S. 2015. The impact of maternal hypothyroidism during pregnancy on neonatal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Gynecological Endocrinology* 32(1), 9–13.
- Holst** BS, Gustavsson MH, Johannisson A, Hillström A, Strage E, Olsson U, Lilliehöök I. 2018. Inflammatory changes during canine pregnancy. *Theriogenology* (125):285-292
- Houser** BL. 2012. Decidual macrophages and their roles at the maternal-fetal interface. *Yale journal of biology and medicine* 85 (1): 105–118.
- Hsu** P, Nanan RKH. 2014. Innate and Adaptive Immune Interactions at the Fetal -Maternal Interface in Healthy Human Pregnancy and Pre-Eclampsia. *Frontiers in immunology* 28; 5:125.
- Jara** EL, Muñoz-Durango N, Llanos C, Fardellac C, González PA, Bueno SM, Kalergisac AM, Riedele CA. 2017. Modulating the function of the immune system by thyroid hormones and thyrotropin. *Immunology letters* 184, 76-83

- Krog MC**, Kolte AM, Husby K, Egerup P, Larsen EC, Christiansen OB, Nielsen HS. 2017. Recurrent pregnancy loss. *Ugeskr Laeger* 24;179(17)
- Kwak-Kim J**, Bao S, Lee S.K, Kim JW, Gilman-Sachs, A. 2014. Immunological modes of pregnancy loss: inflammation, immune effectors, and stress. *American Journal of Reproductive Immunology* 72 (2): 129-4019.18.
- Laban M**, Ibrahim EAS, Elsafty MSE, Hassanin AS. 2014. Placenta accreta is associated with decreased decidual natural killer (dNK) cells population: a comparative pilot study. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 181, 284–288.
- Leno-Durán E**, Muñoz-Fernández R, Olivares EG, Tirado-González I. 2014. Liaison between natural killer cells and dendritic cells in human gestation. *Cellular and Molecular Immunology* 11 (5): 449–455.
- Magon N**, Kumar P. 2012. Hormones in pregnancy. *Nigerian Medical Journal* 53(4), 179.
- Männistö T**, Mendola P, Grewal J, Xie Y, Chen Z Laughon SK. 2013. Thyroid diseases and adverse pregnancy outcomes in a contemporary us cohort. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98(7), 2725–2733.
- Marijke MF**, De Vos P. 2018. Innate immune cells in the placental bed in healthy pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 69: 125-133.
- Makrigiannakis A**, Vrekoussis T, Zoumakis E, Kalantaridou SN, Jeschke U. 2017. The role of HCG in implantation: a mini-review of molecular and clinical evidence. *International Journal of Molecular Sciences Sci* 19;18(6):1305.
- Mrizak I**, Grissa O, Henault B, Fekih M, Bouslema A, Boumaiza IK, Naim A. 2014. Placental infiltration of inflammatory markers in gestational diabetic women. *General Physiology and Biophysics* 33(02), 169–176.
- Montesinos M del M**, Pellizas, C. 2019. Thyroid hormone action on innate immunity. *Frontiers in Endocrinology Front Endocrinol (Lausanne)* 4; 10:350. 10.
- Nie MF**, Xie Q, Wu YH, He H, Zou LJ, She X, Wu XQ. 2018. Serum and ectopic endometrium from women with endometriosis modulate macrophage m1/m2 polarization via the smad2/sm3 pathway. *Journal of Immunology Research* 12; 6285813.

- Negro R**, Stagnaro-Green A. 2014. Diagnosis and management of subclinical hypothyroidism in pregnancy. *British Medical Journal* 6; 349: g492
- Negishi Y**, Takahashi H, Kuwabara Y, Takeshita T. 2018. Innate immune cells in reproduction. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 44(11), 2025–2036.
- Noyola-Martínez N**, Halhali A, Barrera, D. 2019. Steroid hormones and pregnancy. *Gynecological Endocrinology* 35(5), 376–384.
- Orazov MR**, Radzinsky VE, Nosenko EN, Khamoshina MB, Dukhin AO, Lebedeva MG. 2017. Immune-inflammatory predictors of the pelvic pain syndrome associated with adenomyosis. *Gynecological endocrinology* 33: 44-46.
- Pascual A**, Aranda A. 2012. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochimica et Biophysica* 1830 (7): 3908-16
- Pérez-Pérez A**, Vilariño-García T, Fernández-Riejos P, Martín-González J, Segura-Egea J, Sánchez-Margalet V. 2017. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 35, 71–84.
- PrabhuDas M**, Bonney E, Caron K, Day S, Erlebacher A, Fazleabas A, Fisher S, Golos T, Matzuk M, McCune J, Mor G, Schulz L, Soares M, Spencer T, Strominger J, Way S, Yoshinaga K. 2015. Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nature Immunology* 16 (4): 328-34.
- Reister F**, Frank HG, Heyl W, Kosanke G, Huppertz B, Schröder W, Kaufmann P, Rath W. 1999. The distribution of macrophages in spiral arteries of the placental bed in pre-eclampsia differs from that in healthy patients. *Placenta* 20 (2-3):229-33.
- Robertshaw I**, Bian F, Das SK. 2017. Mechanisms of uterine estrogen signaling during early pregnancy in mice: an update. *Journal of Molecular Endocrinology* 56 (3): R127-38.
- Rodríguez-Castelán J**, Corona-Pérez A, Nicolás-Toledo L, Martínez-Gómez M, Castelán F, Cuevas-Romero E. 2017. Hypothyroidism induces a moderate steatohepatitis accompanied by liver regeneration, mast cells infiltration, and changes in the expression of the farnesoid x receptor. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 125 (3): 83-190.

- Rodríguez-Castelán J, Martínez-Gómez M, Castelán F, Cuevas E.** 2015. Hypothyroidism affects vascularization and promotes immune cells infiltration into pancreatic islets of female rabbits. *International Journal of Endocrinology* 2015:917806.
- Rodríguez-Castelán J, Méndez-Tepepa M, Carrillo-Portillo Y, Anaya-Hernández A, Rodríguez-Antolín J, Zambrano E, Castelán F, Cuevas-Romero E.** 2017. Hypothyroidism reduces the size of ovarian follicles and promotes hypertrophy of periovarian fat with infiltration of macrophages in adult rabbits. *BioMed Research International* 2017:3795950.
- Rodríguez-Castelán J, Zepeda-Pérez D, Méndez-Tepepa M, Castillo-Romano M, Espíndola-Lozano M, Anaya-Hernández A, Berbel P, Cuevas-Romero E.** 2018. Hypothyroidism modifies the uterine lipid levels in pregnant rabbits and affects the fetal size. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders* 19(6):818-825.
- Rodríguez-Castelán J, Del Moral-Morales A, Piña-Medina AG, Zepeda-Pérez D, Castillo-Romano M, Méndez-Tepepa M, Espíndola-Lozano M, Camacho-Arroyo I, Cuevas-Romero E.** 2019. Hypothyroidism induces uterine hyperplasia and inflammation related to sex hormone receptors expression in virgin rabbits. *Life Sciences* 1; 230:111-120.
- Sánchez-García O, Rodríguez-Castelán J, Martínez-Gómez M, Cuevas E, Castelán F.** 2016. Hypothyroidism modifies morphometry and thyroid-hormone receptor expression in periurethral muscles of female rabbits. *Neurourol Urodyn* 35 (8): 895-901.
- Santos SO, Loureiro SM, Alves IG, Jesus CS, Santos PR, Santos MR, Dias DP, Santana-Filho VJ, Badauê-Passos D Jr.** 2012. Experimental gestational hypothyroidism evokes hypertension in adult offspring rats. *Autonomic Neuroscience* 170(1-2), 36–41.
- Silva JF, Ocarino NM, Serakides R.** 2018. Thyroid hormones and female reproduction. *Biology of Reproduction* 1;99(5):907-921.
- Sundqvist J, Andersson KL, Scarselli G, Gemzell-Danielsson K, Lalitkumar PG.** 2012. Expression of adhesion, attachment and invasion markers in eutopic and ectopic endometrium: a link to etiology of endometriosis. *Human Reproduction* 27(9):2737
- Šuluburić A, Milanović S, Vranješ-Đurić S, Jovanović IB, Barna T, Stojić M, Fratrić N, Szenci O, Gvozdić D.** 2017. Progesterone concentration, pregnancy and calving rate in

- Simmental dairy cows after oestrus synchronisation and hCG treatment during the early luteal phase. *Veterinaria Hungarica* 65 (3): 446-458
- Surendra S.** 2014. Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss. *The International Journal of Developmental Biology* 58(2-4):219-29.
- Schumacher A,** Sharkey DJ, Robertson SA, Zenclussen AC. 2018. Immune cells at the fetal-maternal interface: how the microenvironment modulates immune cells to foster fetal development. *The Journal of Immunology* 201(2), 325–334.
- Sharma S,** Godbole G, Modi D. 2016. Decidual control of trophoblast invasion. *American Journal of Reproductive Immunology* 75(3), 341–350.
- Smith KA,** Pearson CB, Hachey AM, Xia DL, Wachtman LM. 2012. Alternative activation of macrophages in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with endometriosis. *Comparative Medicine* 62:303–10.
- Springer D,** Jiskra, J, Limanova, Z, Zima T, Potlukova E. 2017. Thyroid in pregnancy: From physiology to screening. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 54(2), 102–116.
- Stanley, A. J.,** Gough, M. J., Banks, R. E., Selby, P. J., & Patel, P. M. 2001. Renal carcinoma cell lines inhibit natural killer activity via the CD94 receptor molecule. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 50(5), 260–268.
- Svensson-Arvelund J,** Ernerudh J. 2015. The role of macrophages in promoting and maintaining homeostasis at the fetal-maternal interface. *American Journal of Reproductive Immunology* 74 (2): 100-9.
- Tremellen K P,** Russell P. (2012). The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: adenomyosis and macrophages. *Journal of Reproductive Immunology* 93(1), 58–63.
- Van der Spek AH,** Fliers E, Boelen A. 2017. The classic pathways of thyroid hormone metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology* 458, 29–38.
- Van der Spek A. H,** Fliers E, Boelen, A. 2016. Thyroid hormone metabolism in innate immune cells. *Journal of Endocrinology* 232(2), R67–R81.
- Vasilopoulou E,** Loubière LS, Lash GE, Ohizua O, McCabe CJ, Franklyn JA, Kilby MD, Chan SY. 2014. Triiodothyronine regulates angiogenic growth factor and cytokine

secretion by isolated human decidual cells in a cell-type specific and gestational age-dependent manner. *Human Reproduction* 29 (6): 1161-72.

Vissenberg R, Manders VD, Mastenbroek S, Fliers E, Afink GB, Ris-Stalpers C, Goddijn M, Bisschop PH. 2015. Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorders/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction. *Human Reproduction update* 21 (3) :378-87

Wang X, Wu SP, De Mayo FJ. 2017. Hormone dependent uterine epithelial-stromal communication for pregnancy support. *Placenta* 60: S20–S26.

Yang JH. 2004. Decreased expression of killer cell inhibitory receptors on natural killer cells in eutopic endometrium in women with adenomyosis. *Human Reproduction* 19(9): 1974–1978.

Yves M, Roucher F, Plotton I, Goursaud C, Tardy V, Mallet D. 2016. Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis. *Annales Endocrinologie* 77:2, 82-89.

Zhi Y, Gao P, Li W, Gao F, Zhang J, Lin H, Zhang J. 2018. Soluble CD163 levels and CD163+CD14+ monocyte/macrophage counts in patients with asthma. *Iranian Journal of Immunology* 15(3):239-245.

Zhihong N, Yun F, Pinggui Z, Sulian Z, Zhang A. 2016. Cytokine profiling in the eutopic endometrium of adenomyosis during the implantation window after ovarian stimulation. *Reproductive Sciences* 23 (1): 124-33