



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del hipotiroidismo sobre marcadores del  
metabolismo lipídico en tejidos reproductivos de la  
coneja

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Julia de Guadalupe Rodríguez Castelán

**Directora**

Dra. Estela Cuevas Romero

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2018



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Efecto del hipotiroidismo sobre marcadores del metabolismo lipídico en tejidos reproductivos de la coneja

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Julia de Guadalupe Rodríguez Castelán

**Comité tutorial**

Dra. Estela Cuevas Romero

Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio

Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2018

La presente tesis fue realizada en el laboratorio de Endocrinología del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta perteneciente a la Universidad Autónoma de Tlaxcala, bajo la dirección de la Dra. Estela Cuevas Romero. Se contó con financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto de investigación (257549 a Cuevas-Romero E) y una beca doctoral (487362 a Rodríguez-Castelán J).



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado  
Posgrado en Ciencias Biológicas



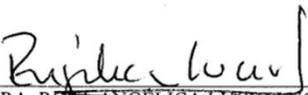
POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**  
**PRESENTE**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Julia de Guadalupe Rodríguez Castelán** realiza para la obtención del grado de **Doctora en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Efecto del hipotiroidismo sobre marcadores de metabolismo lipídico en tejidos reproductivos de la coneja”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., ENERO 24 DE 2018

  
DRA. ROSA ANGÉLICA FELICITUCIO

  
DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO

  
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

  
DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN

  
DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA



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



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

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por permitir mi formación académica como Doctora en Ciencias.

Al CONACyT por la concesión de una beca para financiar mis estudios durante todo el doctorado (487362 RC-J); y al programa de becas del Espacio Común de Educación Superior (ECOES)-Santander por financiar una estancia de movilidad en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Quiero expresar mi más grande agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Estela Cuevas Romero, ya que sin su motivación, apoyo, dirección y confianza no habría sido posible llegar a este punto en mi vida. Gracias por estimularme en cada momento a aprender más y más, y por ayudarme a entender que los límites los ponemos nosotros mismos.

A mi comité tutorial: Dra. Rosa Angélica Lucio Lucio y Dr. Pablo Pacheco Cabrera por sus relevantes comentarios, críticas, aportes y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Francisco Castelán por brindarme la confianza de trabajar en su laboratorio y aprender muchas de las técnicas que utilicé para el desarrollo de este trabajo; así mismo por su disposición de aclarar dudas y cuestionarme todo el tiempo, ya que gracias a ello eh podido entender con mayor profundidad los fenómenos que estudio.

A la Dra. Leticia Nicolás Toledo por apoyarme con la estandarización de técnicas que fueron útiles en el desarrollo de este trabajo, así como por sus consejos y sugerencias.

Por último, pero no menos importante, al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, de la facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con quien realicé una estancia de movilidad, gracias por todas las atenciones, sugerencias, confianza y facilidades prestadas.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

No tengo palabras suficientes para agradecer a la vida el tiempo que he compartido junto a ti Valentín. Gracias por ser mi “fan” número uno e impulsarme a seguir mis metas profesionales, pues a tu lado eh descubierto mi pasión por la ciencia. Gracias por ser mi maestro en casa, por apoyarme hasta lo incomprensible y por tanto amor. Hoy tenemos un lazo que nos une más allá del tiempo y la vida, y aunque la tristeza nubla a veces mi juicio estás ahí para no sentirme tan perdida, gracias por todo, incluso por los silencios. Y gracias por lo más importante: creer y hacerme creer.

Debo confesar que cuando me fui de casa para estudiar la licenciatura y te dije que no me cortarás las alas Omma, jamás pensé llegar hasta este punto. Hoy quiero agradecerte por que no sólo has sido la fuente de amor más grande e incondicional de mi vida, sino que has sido mi mayor ejemplo de esfuerzo, bondad y coraje. Gracias a ti eh tenido valor de soñar y de luchar por lo que quiero, tu siempre serás la “co-autora” de cualquier meta que me imponga en la vida. Te amo.

Gracias totales a los miembros de mi familia que han estado en los momentos de triunfos y derrotas, porque a su lado me siento cobijada y protegida. Particularmente gracias hermanas: Ana y Sheyla por apoyarme aún en la distancia y por darme momentos divertidos que me permitían salir un poco del “estrés” cotidiano. Gracias sobrinitas Chiqui y Sheylita porque reviven cada día mi corazón y espíritu. Gracias por tanto amor. Gracias tía Tomasita, por quererme, aconsejarme y apoyarme siempre que lo necesito.

Justamente en esta etapa de mi vida valoré como nunca a mis amigos, aquellos que han permanecido y los que eh conocido aquí en Tlaxcala, ustedes son un faro de luz y esperanza en mi vida... Isis eres la mejor amiga que la vida pudo haberme dado, has estado en los peores momentos y también en los mejores, los últimos 10 años han sido mil veces más divertidos gracias a ti, eres mi pequeño espacio de normalidad, quien siempre ha creído en mis locuras. Máx en estos últimos tiempos has estado ahí, incluso sin palabras, fuiste un gran apoyo y un verdadero amigo en la devastación, gracias por cada broma que me hizo renacer. Ángeles y Laura mil gracias por toda la paciencia al enseñarme técnicas de laboratorio, por dejarme

aprender un poquito de otros sistemas de trabajo, pero sobre todas las cosas, por ser mis más grandes confidentes, gracias por ser un gran ejemplo en mi vida, por las mil risas, las locuras, simplemente gracias por ser y estar.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio de Endocrinología y de Inmunología, los que están y a los que ya se fueron, por todas las experiencias vividas en los últimos años. Especialmente a Maribel, Dafne, Yadira, Adriana y Cristhian por su apoyo incondicional, por su disposición a aprender unas de otras y sobre todo por esos momentos de confianza que en muchas ocasiones necesitaba.

Durante mi estancia en el laboratorio de Neuroendocrinología de la UNAM, conocí grandes seres humanos: Valeria, Claudia, Carmen, Aylin, Gaby, Ana, Al, Diana, Moi y J. C., no tengo palabras suficientes para agradecerles todo lo que hicieron por mí, por recibirme con los brazos abiertos, por todos los consejos, por todos los momentos de mil risas y por dejarme aprender tanto de ustedes como me fue posible. Sin darse cuenta me dieron ése “empujoncito” para terminar con alegría este proceso. Ustedes son una importante fuente de inspiración en mi vida.

No quiero terminar sin antes agradecerle a vida por las hermosas personas que ha puesto en mi camino, por todo lo vivido haya sido bueno, malo, alegre o triste, y por encima de todo por estar aquí en este tiempo y en este espacio.

Para quien en su corta vida llenó la mía de amor,  
Y me enseñó lo fuerte que puedo llegar a ser,  
Quien jamás será mi pasado, que es mi presente y será mi futuro,  
Pues simplemente es mi eternidad.  
A ti que iluminas todo en mí y me haces cada día ser mejor,  
Por quien cada esfuerzo vale la pena,  
Te dedico cada uno de mis logros, de mis sueños y esperanzas,  
Pues eres infinito como el aire, mi pequeño arrullo de estrellas...

*#Sakura #71806201711*

*“Y si un día nos separa el tiempo que el más hermoso recuerdo nos una para siempre...”*

## RESUMEN

En mujeres y modelos animales, la obesidad y dislipidemias han sido relacionadas con alteraciones reproductivas. El hipotiroidismo genera dislipidemias y se asocia con anovulación, abortos, miomas e infertilidad. Tomando en consideración la relevancia que tienen el metabolismo y la señalización de lípidos como el colesterol (CT) y los triglicéridos (TAG) en diversos eventos reproductivos (esteroidogénesis, maduración folicular, señalización y nutrición de gametos y embriones), el objetivo del presente trabajo fue evaluar el almacenamiento de lípidos y la expresión del receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\delta$  (PPAR $\delta$ ) en el tracto reproductivo de la coneja. Ovarios, oviductos (regionalizado en fimbria-infundíbulo, FIM-INF; ámpula, AMP; istmo, IST; y útero-tubal, UT) y úteros (región medial) de 24 conejas del grupo control y el grupo hipotiroideo (inducido por medio de *metimazol* en una dosis de 10 mg/kg/día durante 30 días) fueron extraídos. Los tejidos del lado derecho fueron utilizados para realizar la cuantificación enzimática de CT y TAG, así como western blot para cuantificar la expresión de perilipina A (PLIN A) y PPAR $\delta$ . Los órganos izquierdos fueron utilizados para realizar tinciones de rojo oleoso (triglicéridos), negro de Sudán y lipofucsina de Kinyoun (lípidos oxidados). En otros animales, los tejidos izquierdos fueron usados para realizar inmunohistoquímica de PLIN A y PPAR $\delta$ . Como resultados tuvimos que el hipotiroidismo: 1) aumentó el contenido de CT en ovario, mientras que disminuyó el contenido de PLIN A, PPAR $\delta$  y alteró el almacenamiento de lípidos oxidados; 2) disminuyó el contenido de CT en fimbria-infundíbulo, mientras que aumentó el contenido de TAG en ámpula-istmo y en útero-tubal; 3) aumentó los gránulos teñidos con negro de Sudán y disminuyó los teñidos con Kinyoun en todas las regiones oviducto; 4) disminuyó la expresión citoplasmática de PLIN A únicamente en la región UT, mientras que la expresión nuclear fue modificada en AMP y IST-UT; 5) aumentó la inmunolocalización de PPAR $\delta$  en células secretoras de la región AMP.; y 6) disminuyó la presencia de lípidos oxidados en el epitelio luminal uterino y la acumulación de estos en las secreciones en epitelio glandular. Nuestros resultados indican que el hipotiroidismo modifica el contenido y posible señalización de lípidos dependiendo el tejido, lo cual podría estar asociado con el retraso en la maduración folicular, el menor tamaño de las células epiteliales del oviducto y el aumento en los niveles de lipoperoxidación uterinos observados previamente en conejas hipotiroideas.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Hormonas tiroideas .....	3
1.1.1 Hormonas tiroideas y lípidos .....	4
1.2 Aparato reproductor femenino .....	8
2. ANTECEDENTES .....	13
2.1 Hipotiroidismo e infertilidad femenina .....	13
2.3 PPAR y reproducción femenina .....	19
3. JUSTIFICACIÓN .....	21
4. HIPÓTESIS .....	22
5. OBJETIVOS .....	22
5.1 Objetivo General .....	22
5.2 Objetivos Específicos .....	23
6. METODOLOGÍA .....	23
6.1 Contenido de lípidos en ovario, oviducto y útero .....	24
6.2 Expresión de PLIN A en ovario, oviducto y útero .....	25
6.3 Determinación de PPAR $\delta$ en ovario, oviducto y útero .....	27
6.4 Análisis Estadístico .....	27
7. RESULTADOS .....	28
7.1 Ovario .....	28
7.2 Oviducto .....	34
7.3 Útero .....	41
8. DISCUSIÓN .....	46
8.1 Ovario .....	46
8.2 Oviducto .....	48

8.3 Útero .....	50
9. CONCLUSIONES .....	52
10. PERSPECTIVAS .....	53
Ovario .....	53
Oviducto .....	53
Útero .....	54
11. REFERENCIAS .....	55
12. GLOSARIO DE TÉRMINOS .....	72
13. ANEXOS .....	77
Anexo 1. Modelo del efecto del hipotiroidismo sobre el metabolismo de lípidos en el ovario	77
Anexo 2. Modelo del efecto del hipotiroidismo sobre el metabolismo de lípidos en el oviducto .....	78
Anexo 3. Modelo del efecto del hipotiroidismo sobre el metabolismo de lípidos en el útero ..	79
1. PUBLICACIONES .....	80

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Hormonas tiroideas

La glándula tiroides está situada en la parte media del cuello y está compuesta por dos lóbulos (derecho e izquierdo) unidos por un istmo transversal. Esta glándula se compone de tirocitos, formados por una sola capa de células foliculares que rodean material proteico de tipo coloide. Su función es la secreción de hormonas tiroideas, triyodotironina (T3) y tetrayodotironina (T4), las cuales juegan un papel importante en el metabolismo, desarrollo y crecimiento (Darras y cols. 2015).

La síntesis de hormonas tiroideas se da en las células foliculares. Para su síntesis se requiere de moléculas de tirosina, las cuales son yodadas a través de la enzima tiroperoxidasa. Su síntesis es regulada por las hormonas tirotropina (TSH; liberada por la hipófisis) y de la hormona liberadora de tirotropina (TRH; secretada por el hipotálamo). Niveles altos de hormonas tiroideas disminuyen la secreción de TSH y TRH, mientras niveles bajos de ellas la inducen. Una vez liberadas, las hormonas tiroideas son transportadas a través de la sangre, unidas a proteínas plasmáticas como la albúmina, alfa globulina y la transtirrenina (Beck-Peccoz y cols. 2017).

Las acciones de las hormonas tiroideas, antes citadas, son posibles gracias a la activación de receptores nucleares específicos que unen a las hormonas tiroideas (TRs). Existen dos tipos de TRs:  $\alpha$  y  $\beta$  (Darras y cols. 2015). Las hormonas tiroideas también actúan sobre receptores localizados en membrana plasmática, citoplasma y mitocondrias. La hormona se une al receptor y promueve cascadas de señalización, que finalizan en la modulación de iones sodio, calcio, potasio, transporte de glucosa y regulación del metabolismo de lípidos, entre otras funciones. Además, en diversos tejidos se encuentran desyodasas que van a catalizar la conversión de T4 a T3 (Darras y cols. 2015).

Alteraciones en la síntesis de hormonas tiroideas pueden ser por un aumento en las concentraciones de T3 y T4 (hipertiroidismo) o por la insuficiencia en la secreción de estas

(hipotiroidismo). Estas alteraciones pueden ser causadas por diversos factores entre los que destacan la presencia de anticuerpos que bloquean el mecanismo de síntesis y acción de las hormonas, deficiencias de yodo y daños en la glándula tiroidea como malformaciones y tumores. Sin embargo, el hipotiroidismo es el que tiene mayor impacto en la salud, al tener una prevalencia mayor y ser más frecuente en mujeres. Lo anterior está asociado a la presencia de anticuerpos anti-tiroideos, principalmente anti-peroxidasa o anti-tiroglobulina (Beck-Peccoz y cols. 2017).

### **1.1.1 Hormonas tiroideas y lípidos**

**Síntesis de lípidos.** Los lípidos pueden ser adquiridos por la dieta o por una síntesis endógena (de novo). En general, los lípidos pueden ser acumulados en diversas células y sirven como reserva para la obtención de energía. Así mismo, los lípidos actúan como moléculas de señalización regulando diversas funciones como es la proliferación celular, apoptosis y diferenciación (Barbosa y Siniossoglou 2017). En las células, los diferentes tipos de lípidos se almacenan en forma de inclusiones o gotas de lípidos, ya que si se encuentran libres pueden generar lipotoxicidad (Barbosa y Siniossoglou 2017). Si bien diferentes tipos de lípidos pueden estar almacenados en las gotas, los lípidos que predominan son triglicéridos, colesterol (esterificado) y ácidos grasos libres (Barbosa y Siniossoglou 2017). Las gotas de lípidos son sintetizadas en el retículo endoplásmico, donde se forman gotas de lípidos neutros<sup>1</sup> (llamadas micro gotas de lípidos) y, posteriormente, migran hacia el citoplasma donde se pueden incluir otro tipo de lípidos (Schuldiner y Bohner 2017). Las gotas lipídicas están rodeadas de una monocapa de fosfolípidos<sup>2</sup> que posee proteínas (Schuldiner y Bohner 2017) que regulan el tráfico y la señalización de lípidos, así como su hidrólisis. Las proteínas son la perilipina (PLIN), proteína relacionada con la diferenciación de adipocitos o adipofilina (ADPR)<sup>3</sup>, proteína de interacción de colas de 47 kD (TIP47), S3-12, proteína PAT oxidatoria (OXPAT), MLDP; y las proteínas de almacenaje de lípidos recombinatorias tipo 1 y 2 (LSD1 y LSD2) que actualmente

---

<sup>1</sup> Ver glosario.

<sup>2</sup> Ver glosario.

<sup>3</sup> Ver glosario.

son conocidas como una familia de proteínas llamada PAT (por las iniciales de PLIN, ADPR y TIP47). De manera que, el tipo de proteína que se encuentre en la membrana y la cantidad de ella determina el grado de maduración (mayor tamaño) de la gota lipídica (Itabe y cols. 2017). Aquellas gotas que se encuentran en el retículo contienen ADPR, mientras que las del citoplasma contienen PLIN mayoritariamente. Este intercambio suprime la lipólisis<sup>4</sup> de los ácidos grasos neutros ejerciendo un efecto protector a la célula (Tauchi-Sato y cols. 2002). Aunado a los efectos antes mencionados, la disminución de PLIN promueve un aumento en la expresión de enzimas relacionadas con la oxidación de ácidos grasos (Londos y cols. 2005) y eleva los niveles de citocinas<sup>5</sup> relacionadas con procesos inflamatorios en el tejido adiposo (Londos y cols. 2005). Por su parte, cuando los ácidos grasos son requeridos necesitan la interacción sinérgica de PLIN y de lipasa sensible a hormonas<sup>6</sup> (HSL), modulando su hidrólisis (Schuldiner y Bohner 2017). Los ácidos grasos contenidos en las gotas lipídicas también pueden metabolizarse y convertirse en fosfolípidos para formar las membranas celulares o de gotas lipídicas (Tauchi-Sato y cols. 2002).

El colesterol ingresa a la célula a través de receptores de lipoproteína de baja densidad (LDLR), los cuales son endocitados y degradados dejando libre la molécula de colesterol, la cual puede esterificarse y almacenarse o bien no esterificarse y cumplir su función biológica (Brasaemle y cols. 2014). El colesterol también puede ser almacenado por medio de PLIN (Hsieh y cols. 2012). El colesterol puede transformarse en hormonas esteroides, prostaglandinas, ácidos biliares y vitamina E (Iqbal y Hussain 2009). Por otra parte, los triglicéridos pueden ser hidrolizados y convertirse en ácidos grasos, los cuales (si son de cadena corta) pueden convertirse en acetil coA y originar colesterol (Ikonen 2008). Algunos productos del metabolismo de los ácidos grasos como la ceramida<sup>7</sup> y lipofucsina<sup>8</sup> (ambos lípidos oxidados) pueden metabolizarse como esfingolípidos de membrana o, bien, servir como señalizadores en procesos de apoptosis (Schuldiner y Bohner 2017). Mientras que los desechos del metabolismo

---

<sup>4</sup> Ver glosario.

<sup>5</sup> Ver glosario.

<sup>6</sup> Ver glosario.

<sup>7</sup> Ver glosario.

<sup>8</sup> Ver glosario.

del colesterol u oxisteroles<sup>9</sup> promueven la síntesis de enzimas del metabolismo (Nelson y cols. 2011). Los ácidos grasos de cadena media o larga pueden unirse a receptores de membrana asociado a proteínas G conocidos como GPR120 y GPR40, también conocidos como receptor de ácidos grasos libres. Los ácidos grasos poliinsaturados ( $\alpha$ -linolenico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico) también se pueden unir a receptores proliferadores de peroxisomas (PPAR)- $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  (Zhao y cols. 2016). Los ácidos grasos oxidados se unen a PPAR $\gamma$  (Komar 2005). El colesterol se une con receptores de LDL (Goldstein y Brown 2009). Los oxisteroles pueden unirse con receptores PPAR $\gamma$  (Komar 2005), receptor X del hígado (LXR $\beta$ ; Mouzat y cols. 2007) y receptores de farnesoides (FXR $\alpha$ ; Deng y cols. 2006). Por otra parte, la ceramida y los fosfolípidos no se unen con receptores, pero tienen funciones como segundos mensajeros (Tauchi-Sato y cols. 2002).

**Funciones de los lípidos.** La administración de  $\alpha$ -linolenico incrementa la expresión del gen G0S2<sup>10</sup>, favoreciendo la división celular (Zhao y cols. 2016). Los ácidos grasos estimulan la expresión del gen de linfoma de células B (bcl2) para inhibir la apoptosis en cultivo de células hepáticas (Butts y cols. 2015). La ceramida incrementa la expresión de proteínas como el CD65 y el receptor de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  promoviendo apoptosis (Gulbins 2003). Las tiazolidinedionas, agonistas de PPARs, disminuyen la apoptosis por inhibición de la ciclina 2 (Komar 2005). Las tiazolidinedionas también promueven la proliferación de células de la granulosa activando el PPAR $\gamma$  (Dupont y cols. 2008). Existe una regulación de los niveles de lípidos por los propios ácidos grasos y otros lípidos a través de la activación de diversos receptores. Así, la administración de  $\alpha$ -linolenico disminuye la concentración de triglicéridos en suero (Zhao y cols. 2016). Así mismo, los ácidos grasos regulan el flujo de colesterol en las membranas celulares (Chehaibi y cols. 2015). La administración de  $\alpha$ -linolenico disminuye la expresión de PPAR- $\gamma$  e incrementa la expresión de GPR120 en células sanguíneas (Zhao y cols. 2016). La expresión de PPAR $\gamma$  se encuentra disminuida en cultivo de adipocitos con medios enriquecidos en ceramida (Kajita y cols. 2004). Las ceramidas disminuyen la actividad de receptores de insulina, por lo que alteran la captación de glucosa en músculo (Mahfouz y cols.

---

<sup>9</sup> Ver glosario.

<sup>10</sup> Ver glosario.

2006). Las ceramidas promueven la conversión de colesterol en ácidos biliares, por lo que disminuye los niveles en hígado (Deng y cols. 2006). Los lípidos también son capaces de regular el sistema inmune y, por ende, participar en procesos de inflamación. Algunos ácidos grasos, como el ácido palmítico y el ácido oleico, pueden aumentar la secreción de citocinas (Stelzner y cols. 2016). Mientras que otros ácidos grasos, como los ácidos grasos poliinsaturados ( $\alpha$ -linolenico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico), tienen el efecto antiinflamatorio (Monk y cols. 2012). Los ácidos grasos, oxisteroles y el propio colesterol son capaces de activar células del sistema inmunitario como las células Kuffer y células estrelladas del hígado, así como la secreción de citocinas por algunas células hepáticas (Luu y cols. 2016). Los ácidos grasos poliinsaturados activan el factor de transcripción NF $\kappa$ b para la producción de proteínas proinflamatorias como CoX-2, TNF $\alpha$  e IL-1 (Hommelberg y cols. 2009). Por su parte, agonistas para PPAR $\alpha$  y antagonistas de PPAR $\gamma$  reducen la concentración de citocinas en suero y en el hígado (Zhang y cols. 2015). Los ácidos grasos son conocidos también por regular la expresión de metaloproteasas<sup>11</sup>. El ácido oleico promueve la secreción y activación de metaloproteasas, por lo que dañan el endotelio y túnica media de los vasos sanguíneos (Chan y cols. 2016). Las tiazolidinedionas estimulan la síntesis de plasminógenos y metaloproteasas, favoreciendo la ruptura del folículo en el ovario (Komar 2005).

**Hormonas tiroideas y lípidos.** El efecto de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo y señalización de los lípidos ha sido mayoritariamente estudiado en tejidos metabólicos. Las hormonas tiroideas modulan los niveles séricos de colesterol debido a que regulan enzimas como 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), colesterol 7-alfa hidroxilasa (CYP4A1) y los genes de LDLR, HSL, acetil CoA (Rizos y cols. 2011). Así mismo, la T3 incrementa la actividad de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) por lo que regula los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y la apoproteína AV (ApoAV), disminuyendo los niveles de triglicéridos (Rizos y cols. 2011). Por otra parte, las hormonas tiroideas promueven una mayor síntesis de ácidos grasos de cadena larga en el hígado (Blennemann y cols. 2011). La activación de los TRs  $\beta$ , por sus agonistas GC-1 y KB2115, favorece la expresión de LDLR y la síntesis de novo del colesterol. Sin embargo, dichos

---

<sup>11</sup> Ver glosario.

agonistas reducen la cantidad de colesterol circulante por inducir la expresión de la enzima Cyp7a1 que estimula la conversión de colesterol a sales biliares (Kannisto y cols. 2014).

La  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos también es regulada por hormonas tiroideas, debido a que alteran la síntesis de enzimas como la acil coA hidroxigenasa y la acil coA tioesterasa, las cuales participan en hígado, riñón y corazón (Krause y cols. 2015). La T3 reduce la actividad de la enzima esfingomielin fosfodiesterasa (SMasa) con lo que disminuye el contenido de ceramida presente en cultivo de hepatocitos y en el hígado de ratas (Babenko 2005). Las hormonas tiroideas, a través de TR $\beta$ , reprimen la actividad del LXR $\alpha$ , con lo que las acciones de los oxisteroles podrían estar limitadas (Kawai y cols. 2004). Además de los órganos considerados metabólicos, las hormonas tiroideas también regulan la acumulación de lípidos en otros tejidos. Por ejemplo, en algunos músculos estriados como el gastronemius, donde la administración de T3 reduce el contenido de ácidos grasos libres y triglicéridos (Miklosz y cols. 2012). En este mismo músculo, el hipotiroidismo regula la expresión de FAT/CD36 (Lombardi et al. 2012).

En mujeres, el hipotiroidismo es conocido por inducir dislipidemias<sup>12</sup> (Ganie et al. 2011). Estas dislipidemias han sido también observadas en conejas y ratas con hipotiroidismo inducido (Rodríguez-Castelán y cols. 2017a). Además, el hipotiroidismo favorece la acumulación de triglicéridos en tejido adiposo, hígado y páncreas (Gagnon y cols. 2010; Graselli y cols. 2011; Sinha y cols. 2012, Rodríguez-Castelán y cols. 2017b). El aumento de triglicéridos, colesterol total y LDL por el hipotiroidismo se asocia con la influencia que tienen las hormonas tiroideas sobre las enzimas acil coA hidrogenasa y acil coA tioesterasa (Krause y cols. 2015). En hígado de ratas hipotiroideas, los ácidos grasos de cadena larga se encuentran disminuidos (Blennemann y cols. 2011); mientras que el contenido de ceramida se encuentra aumentada, por el incremento en SMasa (Babenko 2005).

## **1.2 Aparato reproductor femenino**

El aparato reproductor femenino está situado en la porción inferior del abdomen, detrás de la vejiga y enfrente del recto. Tiene la función de producir óvulos y hormonas sexuales, así

---

<sup>12</sup> Ver glosario.

como proveer la nutrición para el desarrollo y el crecimiento del feto. En los humanos, este aparato se compone de dos ovarios, dos trompas de Falopio, un útero y una vagina (Lessey y Young 2014). A continuación, describiremos las primeras tres estructuras que son el objeto de estudio del presente proyecto.

**Ovarios y maduración folicular.** Los ovarios están constituidos por un epitelio cúbico simple que rodea un estroma conjuntivo que contiene los folículos ováricos. Está dividido en dos regiones: corteza, que contiene los folículos ováricos, y médula, que contiene los vasos sanguíneos. Cada ovario tiene la función de sintetizar y secretar hormonas sexuales, así como proveer los óvulos a través de foliculogénesis. Los óvulos pasan por distintos estadios foliculares: primordiales, son los que se encuentran en mayor cantidad y que contienen el oocito<sup>13</sup> y una capa total o parcial de células de la granulosa con aspecto plano; primarios que contienen el oocito y una única capa de células de la granulosa con aspecto redondo; secundarios o preantrales con varias capas de granulosa rodeadas de células de la teca; terciarios o antrales que contienen líquido folicular, al cumulus oophorus y al oocito que se encuentra flotando en el centro rodeado de la corona radiada; y los maduros o de Graaf que se encuentran más cercanos al epitelio del ovario (Lessey y Young 2014). Durante la foliculogénesis, diversos folículos no completan la maduración y se convierten en folículos atrésicos en cuyo interior se infiltran células del sistema inmunitario (Dal Bosco y cols. 2011).

La foliculogénesis es dependiente de diversos factores como la edad (Baerwald y cols. 2017) y la acción de las hormonas liberadora de gonadotropinas (GnRH), folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH; Hashemitabar y cols. 2014). Los folículos que alcanzan la madurez liberarán el óvulo mediante la ovulación, la cual está regulada por la acción de la GnRH, entre otras hormonas, así como de señales simpáticas y parasimpáticas (Dal Bosco y cols. 2011). En la coneja, por ser un ovulador reflejo, distintas señales pueden dar lugar a la ovulación, como son los estímulos dados por el macho durante la cópula y cambios ambientales en la temperatura, dieta y estrés (Tsiligianni y cols. 2004). En todos los mamíferos, después de la ovulación, las células de la granulosa comienzan a infiltrarse de tejido conectivo y a formar un cuerpo hemorrágico conocido como cuerpo lúteo (Dal Bosco y cols. 2011). Las células de la teca y la

---

<sup>13</sup> Ver glosario.

granulosa de los distintos folículos sintetizan estrógenos ( $17\beta$  estradiol principalmente), y las células del cuerpo lúteo producen progesterona (Chang y cols. 2014). Aunado a la anterior, se encuentran glándulas intersticiales diseminadas a lo largo del ovario, que contienen gotas de lípidos y en las cuales se lleva a cabo la esteroidogénesis. El tamaño y desarrollo de dichas glándulas es dependiente de hormonas gonadotrópicas, principalmente LH (Dal Bosco y cols. 2011).

**Oviducto, transporte de gametos y fertilización.** Las Trompas de Falopio u oviductos tienen la función de almacenar y capacitar a los espermatozoides, transportar a los gametos, y en ellos se lleva a cabo la fertilización y la maduración temprana de los embriones (Ito y cols. 2016). Están compuestos por un epitelio cilíndrico que contiene células ciliadas (movilizan los gametos) y secretoras (liberan glicoproteínas<sup>14</sup> y mucopolisacáridos<sup>15</sup>), rodeados de una capa de mucosa, seguido de una capa de músculo liso y serosa (Lessey y Young 2014). Están divididos en cinco porciones. La fimbria e infundíbulo (FIM-INF) que contiene una proporción mayor de células ciliadas y el músculo liso organizado en paquetes (Pedrero-Badillo y cols. 2013). Esta región tiene la función de capturar el óvulo. Las contracciones de la musculatura y de los ligamentos bajo la acción de prostaglandinas facilita el transporte del óvulo hacia la región del ámpula para su posible fertilización (Lyons y cols. 2006). El ámpula (AMP) contiene una proporción similar de células ciliadas y secretoras, así como una capa delgada de músculo liso con orientación circular (Pedrero-Badillo y cols. 2013), y es el sitio donde se lleva a cabo la fecundación. El istmo (IST) y la región útero-tubal (UT) tienen una mayor cantidad de células secretoras, poseen una capa gruesa de músculo liso y cumplen funciones de capacitación y almacenamiento de espermatozoides (Pedrero-Badillo y cols. 2013).

El transporte de los gametos está dado por la combinación de los movimientos peristálticos de la capa muscular, los movimientos ciliares y el flujo de secreciones. Una disminución en el bateo de los cilios en el oviducto genera una disminución de la fertilidad en mujeres (Ito y cols. 2016). Además, el transporte del ovocito en la región del AMP está dado por las células ciliadas presentes en esta región (Pedrero-Badillo y cols. 2013). La secreción oviductal es

---

<sup>14</sup> Ver glosario.

<sup>15</sup> Ver glosario.

imprescindible para el espermatozoide ya que modula la capacitación espermática y la respuesta acrosomal<sup>16</sup> (Killian 2004). En cuanto a la composición del fluido oviductal, hay diferencias en el contenido de oviductinas presentes en el AMP y el IST, y cuando cambia sus concentraciones el espermatozoide ya no exhibe todas sus acciones por lo que no ocurre la fertilización (Killian 2011). Las células secretoras del epitelio oviductal tienen la finalidad de sintetizar proteínas, enzimas, carbohidratos, lípidos y iones que van a dar lugar al flujo oviductal (Killian 2011), el cual adquiere relevancia ya que en él se lleva a cabo la fertilización, el transporte de los gametos y el desarrollo temprano de los embriones (Killian 2011). La secreción del fluido oviductal es diferencial, así es mayor en el AMP y menor en el IST (Leese y cols. 2001).

La presencia de receptores de estrógenos, progesterona, FSH y LH pone de manifiesto su intervención en las diferentes funciones del oviducto (Ito y cols. 2016). Tanto los movimientos ciliares como la actividad secretora son susceptibles de modificarse por la acción del estradiol (Lyons y cols. 2006). La proporción de células ciliadas/secretoras es alterada por los niveles de estradiol y la gonadotropina coriónica humana (hCG)<sup>17</sup>, así tratamientos con agonistas de estrógenos incrementan el número de células ciliadas (Anzaldúa y cols. 2002). Aunado a lo anterior, el bateo de los cilios en el oviducto es favorecido por el incremento de LH durante la ovulación (Anzaldúa y cols. 2002) y es disminuido por progesterona (Bylander y cols. 2013). Agonistas para el receptor de progesterona aumentan la velocidad del transporte del ovocito fecundado por el oviducto (Bylander y cols. 2013). La secreción oviductal aumenta con los estrógenos y disminuye con la progesterona (Leese y cols. 2001). El estradiol regula procesos de recambio epitelial en el oviducto, así altas concentraciones promueven proliferación celular, mientras que su disminución favorece la apoptosis (Ito y cols. 2016). Así en la lagartija, la proliferación del epitelio oviductal es detenida por la progesterona (Pageaux y cols. 1992). Por otro lado, los estrógenos también regulan la contracción del músculo en el oviducto y la progesterona su relajación (Bylander y cols. 2013). Así mismo, la FSH regula a los canales de calcio en la musculatura oviductal, relacionados con la contracción (Ghavideldarestani y cols. 2016).

---

<sup>16</sup> Ver glosario.

<sup>17</sup>

**Útero y anidación.** El útero puede ser simple o doble. En las especies con un útero bifurcado como la coneja se le denominan cuernos uterinos (Lessey y Young 2014). El útero tiene la función de anidar al feto y proporcionar los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo, de ahí que se encuentre altamente vascularizado. Histológicamente está dividido en tres porciones: endometrio, miometrio y perimetrio o serosa. El endometrio está compuesto de un epitelio luminal que expresa moléculas de adhesión celular que permiten la adherencia del blastocisto<sup>18</sup>, epitelio glandular que secreta sustancias (aminoácidos, glucosa, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales; proteasas, citosinas y factores de crecimiento) que permiten el desarrollo del blastocisto y de las células deciduales<sup>19</sup> que sintetizan glucógeno<sup>20</sup> y citocinas (Bazer y cols. 2009). Posee mucosa formada por un epitelio simple cilíndrico y un estratificado plano que rodean estroma, que es la matriz extracelular que facilita la invasión del trofoblasto (Burton y cols. 2002). Por su parte, el miometrio es el músculo liso que rodea el endometrio y se encuentra ordenado en forma circular y longitudinal; su función principal es inducir las contracciones uterinas durante el parto (Blanks y Brosens 2012). La capa más externa, la serosa, se encuentra altamente vascularizada (Lessey y Young 2014).

Después de la ovulación y durante la gestación ocurren procesos importantes en el útero: decidualización<sup>21</sup>, la remodelación de la vasculatura uterina y la entrada de células inmunes dentro del endometrio; los cuales están regulados por la acción de hormonas gonadales principalmente progesterona (Gibson y cols. 2015). La elevación de la progesterona después de la ovulación promueve la decidualización (Blanks y Brosens 2012). Si no ocurre la fertilización, los niveles de progesterona disminuyen y se promueve la síntesis de citocinas inflamatorias y metaloproteasas de la matriz que generarán apoptosis de la capa secretora y, con ello, la ruptura de la capa de endometrio superficial (Blanks y Brosens 2012). Por lo que, si ocurre la fertilización, la progesterona se mantiene elevada y la decidualización continúa aumentando la resistencia a muerte celular por estrés oxidativo y se genera la invasión del trofoblasto (Blanks y Brosens 2012). Así mismo, la progesterona promueve el aumento en la irrigación sanguínea

---

<sup>18</sup> Ver glosario.

<sup>19</sup> Ver glosario.

<sup>20</sup> Ver glosario.

<sup>21</sup> Ver glosario.

y angiogénesis, regula la cantidad de células inmunitarias presentes en el endometrio incrementando la proliferación de células T<sup>22</sup> y modifica la expresión de genes relacionados con el transporte y señalización de moléculas en el epitelio luminal (Bazer y cols. 2010). Por su parte, los estrógenos (estradiol y estrona), la aromatasa y los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  se aumentan después de la fertilización favoreciendo proliferación del estroma uterino (Mouzat y cols. 2007) y la hiperplasia en glándulas uterinas (Gunin y cols. 2002). Así mismo, los estrógenos regulan la angiogénesis y la placentación a través de activar a las células natural killer (Nk) promoviendo que secreten factores de crecimiento como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetina-2 (ANGPT2) y el factor de crecimiento placentario (PLGF, Gibson y cols. 2015. El aumento en los niveles de estrógenos y la disminución de progesterona en la etapa final de la gestación promueve el aumento de receptores de oxitocina en el miometrio promoviendo su actividad contráctil durante el parto (Mouzat y cols. 2007). Por otra parte, se ha observado que la prolactina disminuye la expresión receptores de estrógenos  $\alpha$  inhibiendo la hiperplasia de glándulas uterinas (Gunin y cols. 2002).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Hipotiroidismo e infertilidad femenina

El hipotiroidismo está asociado con alteraciones en el tracto reproductivo que tienen un impacto en la fertilidad. Un alto porcentaje de mujeres con hipotiroidismo son infértiles, tienen un mayor riesgo de presentar endometriosis<sup>23</sup>, síndrome de ovario poliquístico<sup>24</sup> (Straveus 2012), abortos, miomas uterinos (Ott y cols. 2014), sangrados uterinos anormales (Soleymani y cols. 2014), epitelio proliferativo desordenado (Ajmani y cols. 2016) e hiperplasia uterina (Hu

---

<sup>22</sup> Ver glosario.

<sup>23</sup> Ver glosario.

<sup>24</sup> Ver glosario.

y cols. 2013). El impacto del hipotiroidismo sobre la fertilidad femenina también ha sido estudiado en animales de laboratorio. En ovario, los animales hipotiroideos (ratas y conejas) muestran un retraso en la maduración folicular (Rodríguez-Castelán y cols. 2017a), atresia folicular e infiltración de leucocitos en la médula ovárica (Krassas y cols. 2010; Lutsyk y Sogomonian 2012) y disminución de la angiogénesis<sup>25</sup> folicular (Jiang y cols. 2008); además de disminuir la expresión de aromatasa (Rodríguez-Castelán y cols. 2017a) y aumentar la actividad de enzimas como la de desdoblamiento de la cadena lateral de colesterol (P450<sub>scc</sub>) y la 3  $\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD; Chen y cols. 2003). En el oviducto, el hipotiroidismo induce hipertrofia de las células epiteliales del oviducto (Anaya-Hernández y cols. 2015), modifica la infiltración de células inmunitarias de tipo adquirido (Rodríguez-Castelán y cols. en proceso a) y la presencia de glicoproteínas en el epitelio oviductal (Rodríguez-Castelán y cols. en proceso a). En el útero, el hipotiroidismo disminuye la talla de las crías (Krassas y cols. 2010) y el porcentaje de crías de tallas grandes (Rodríguez-Castelán y cols. en proceso b), promueve la infiltración de leucocitos en el estroma del endometrio (Lutsyk y Sogomonian 2012), aumenta el contenido de malondialdehído (MDA; Kong y cols. 2015) y reduce la actividad de enzimas antioxidantes: catalasa (CAT)<sup>26</sup>, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH; Kong y cols. 2015); además el contenido de óxido nítrico y la actividad de la óxido nítrico sintasa se ven reducidas (Kong y cols. 2015).

Las acciones de las hormonas tiroideas sobre el tejido reproductivo femenino podrían llevarse a cabo por acción directa sobre TRs en ovario (Wakim y cols. 1996; Rodríguez-Castelán y cols. 2016), oviducto (Öner y Öner 2007; Rodríguez-Castelán y cols. 2016) y útero (Aghajanova y cols. 2011; Rodríguez-Castelán y cols. 2016).

## 2.2 Importancia de los lípidos en la reproducción femenina

**Función ovárica.** Los ovocitos de muchas especies contienen altas cantidades de ácidos grasos, los cuales regulan la maduración de los ovocitos (Leroy y cols. 2004; Ferguson y Leese 2006; Van Hoeck y cols. 2014). Así, una mayor cantidad de lípidos acumulados promueve la

---

<sup>25</sup> Ver glosario.

<sup>26</sup> Ver glosario.

dominancia folicular<sup>27</sup> (Dadarwal y cols. 2015). El ovocito requiere de energía proporcionada por la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos que se lleva a cabo en las células de la granulosa y del cúmulo. La  $\beta$ -oxidación también es necesaria para la ovulación (Dunning y cols. 2010). La entrada de ácidos grasos en el ovocito es mediada por PLIN (Zhang y cols. 2014). Los ácidos grasos requieren ser esterificados y almacenados debido a que reducen la viabilidad del ovocito e incluso del embrión (Van Hoeck y cols. 2014); además son importantes para el reconocimiento del ovocito por los espermatozoides permitiendo la fertilización (Vrablick y Watts 2013). Por otra parte, si bien el colesterol es metabolizado y convertido en hormonas esteroideas, también puede esterificarse y almacenarse en gotas de lípidos (Kakuta y cols. 2013). El colesterol es transportado al fluido folicular por medio de HDL y de LDL oxidado, en donde se activan receptores acarreadores clase B tipo 1 (SR-B1) y 2 (SR-B2) promoviéndose la esteroidogénesis (DeAngelis y cols. 2014). En conejos con una mutación en el LDLR presentan una disminución de hormonas esteroideas, así como bajas tasas de fertilidad (DeAngelis y cols. 2014). El estroma, los folículos ováricos y cuerpos lúteos también almacenan lípidos oxidados en gránulos de lipofucsina (Hayama y cols. 1992). La presencia de una mayor cantidad de gránulos de lipofucsina indica una tasa alta de  $\beta$ -oxidación, promoviendo la formación de radicales libres a partir de lípidos y su acumulación en los gránulos. En este sentido, tamaños grandes en los gránulos de lipofucsina están relacionados con citotoxicidad (Hayama y cols. 1992), reducción de la fertilización y un mal desarrollo del blastocisto (Otsuki y cols. 2007).

Existe una relación estrecha entre el contenido de lípidos y las hormonas gonadotropinas<sup>28</sup> y hormonas gonadales. El tamaño y la localización de las gotas de lípidos del ovocito es dependiente de la acción de la hCG, la FSH y el factor de crecimiento epidérmico<sup>29</sup> (Yang y cols. 2010). Así mismo, PLIN disminuye conforme los niveles de FSH aumentan y los folículos van madurando (Yang y cols. 2010). Además, hCG y FSH incrementan la expresión del LDLR y de SR-B1, favoreciendo la captura de colesterol y su conversión en hormona esteroide respectivamente, dentro de las células de la granulosa (Lai y cols. 2013). Enzimas de la síntesis de novo del colesterol (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, HMGCR) y de su

---

<sup>27</sup> Ver glosario.

<sup>28</sup> Ver glosario

<sup>29</sup> Ver glosario.

esterificación (acetil-CoA acetil transferasa 1, ACAT1) son modificados por agonistas de estrógenos como el dietilestilbestrol; por lo que se ha sugerido que los estrógenos modulan el almacenamiento de colesterol en las gotas lipídicas (Kakuta y cols. 2013).

Mujeres con obesidad y dislipidemias muestran un aumento en los triglicéridos y/o colesterol en células de la granulosa, la teca y el fluido folicular repercutiendo sobre la calidad del ovocito (Leroy y cols. 2004, Robker y cols. 2009). Por lo que se ha propuesto que los ácidos grasos pueden oxidarse generando estrés en el retículo endoplásmico y lipotoxicidad de los folículos (Wu y cols. 2010). Así, alteraciones en la lipogénesis<sup>30</sup> y lipólisis de los folículos puede afectar su maduración. Además, la obesidad genera disminución en los niveles de hormona anti-muleriana (AMH) repercutiendo en la reserva ovárica (Kriseman y cols. 2015). En mujeres con ovario poliquístico, la PLIN3 se encuentra disminuida y el contenido de lípidos se ha asociado con el desarrollo de dicha patología (Covington y cols. 2015). Mientras que el exceso de lípidos en los folículos también conlleva a una mayor beta-oxidación y a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>31</sup> en el ovario, generando una mayor atresia folicular en todos los estadios foliculares (Brunk y Terman 2002). Además de los ROS, se ha encontrado que si los ácidos grasos no esterificados (sin convertirse en triglicéridos) se acumulan pueden originar atresia folicular (Van Hoeck y cols. 2014). Por otro lado, si las células del epitelio ovárico convierten los ácidos grasos en fosfolípidos podrían iniciar el desarrollo de cáncer ovárico (Shan y cols. 2012).

**Función del oviducto.** El contenido de lípidos en la secreción oviductal varía dependiendo la región, siendo mayor en el IST. Mientras que el contenido de fosfolípidos es mayor en el ámpula de bovinos (Grippio y cols. 1994). El tamaño, el tipo y la cantidad de gotas lipídicas en el epitelio oviductal es también dependiente de la región; siendo la región pre-ampular la que acumula mayor cantidad y principalmente de triglicéridos (Henault y Killian 1993b). Este contenido diferencial de lípidos a lo largo del oviducto indica que estos podrían ejercer acciones relacionadas con la función que cada región oviductal tiene. En lo que se refiere a los ácidos grasos y al colesterol, se ha descrito que el colesterol es el lípido sintetizado en mayor cantidad en el oviducto (Henault y Killian 1993a). Los ácidos grasos saturados (mirístico, esteárico y

---

<sup>30</sup> Ver glosario.

<sup>31</sup> Ver glosario.

palmítico) y ácidos grasos insaturados (oleico y el linoleico) han sido identificados en la región útero-tubal (Huang y cols. 2016), promoviendo la reacción acrosomal (Davis 1980) y la supervivencia de los espermatozoides en el oviducto (Huang y cols. 2016). Gotas de lípidos también han sido identificadas en las criptas presentes en la región útero-tubal del oviducto (Huang y cols. 2016). Además, el oviducto tiene receptores de lípidos como el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), LDLR y transportadores de ácidos grasos (FAT/CD36, Huang y cols. 2016). Por su parte, la lipoproteína de alta densidad (HDL) ha sido identificada en el fluido oviductal (Killian 2004). Además, enzimas como la fosfolipasa C<sup>32</sup>, la catalasa y la fosfodiesterasa<sup>33</sup>, que participan en la beta oxidación, la síntesis de fosfolípidos y ácidos nucleicos, así como en la eliminación de productos de desecho derivados del metabolismo, están presentes en las secreciones del oviducto permitiendo la obtención de energía y facilitando la motilidad espermática (Lapointe y Sirard 1998).

El contenido y, posiblemente, las funciones de los lípidos en el oviducto son reguladas por hormonas gonadales y gonadotropinas. Así, la síntesis y liberación de lípidos en el oviducto ocurre únicamente en el epitelio y depende del ciclo ovárico, siendo mayores durante la fase folicular<sup>34</sup> y mayor en el IST (Henault y Killian 1993a). Por lo que, el tamaño de las gotas lipídicas en el oviducto de hembras vírgenes aumenta durante la fase lútea (Henault y Killian 1993c). Por su parte, las hormonas gonadales alteran la cantidad y presencia de un tipo determinado de lípido. Así, hay menor cantidad de fosfolípidos y un aumento de triglicéridos durante la etapa secretora<sup>35</sup> en la rata (Desvasagayam 1986). En lagartija el estradiol promueve la acumulación de fosfolípidos y triglicéridos en el epitelio oviductal aumentando su proliferación (Pageaux y cols. 1992). Así mismo, hay acumulación de gotas lipídicas en el epitelio oviductal durante la gestación (Murray y cols. 1996).

Aunque la acumulación de lípidos en el oviducto es normal, altas concentraciones de ácidos grasos en la secreción oviductal disminuyen la capacitación espermática (Grippio y cols. 1994). Así mismo, el exceso de colesterol en el fluido oviductal impide la respuesta acrosomal (Davis

---

<sup>32</sup> Ver glosario.

<sup>33</sup> Ver glosario.

<sup>34</sup> Ver glosario.

<sup>35</sup> Ver glosario.

y cols. 1980). Además, en animales con obesidad se ha observado un aumento en las gotas de lípidos en la capa muscular del istmo inhibiendo su contracción (Maki y Kadokawa 2014). En vacas obesas, se ha observado un aumento en los niveles de ácidos grasos no esterificados, lo que se ha asociado con la disminución del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y el aumento del factor inhibitorio de migración de los macrófagos (MIF) en el ampolla e istmo. Lo anterior es relevante para la supervivencia de los embriones en las primeras horas posteriores a la fertilización, así como en la capacitación espermática (Nahar y cols. 2013, Nahar y Kadokawa 2016). Como podemos observar hay pocos trabajos aborden las posibles implicaciones de los lípidos en las disfunciones del oviducto.

**Función uterina.** Los lípidos que predominan en el útero son los fosfolípidos (Devasagayam 1986). Así mismo se ha evidenciado la presencia de gotas de lípidos neutros en el epitelio uterino (Yin y cols. 2012), particularmente en el estroma uterino (Devasagayam 1986). Los ácidos grasos de cadena larga son importantes para realizar el proceso de decidualización (Leaver y cols. 1992). Durante la gestación se observa aumento en los niveles séricos y locales de colesterol, particularmente al final, lo que regula la actividad de los receptores de oxitocina (Mouzat y cols. 2007). Los oxisteroles, a través del LXR $\beta$ , disminuyen los niveles de colesterol en el endometrio y miometrio (Mouzat y cols. 2007), disminuyendo la expresión de proteínas lipogénicas como la proteína de unión a al elemento de respuesta de esteroides (SREBP1), sintasa de ácidos grasos (FAS) y esteroil CoA desaturasa SCD1 (Chu y cols. 2006). En animales gestantes, se ha descrito que el contenido de triglicéridos aumenta con la gestación, y los ácidos grasos promueven la decidualización (Tsai y cols. 2014); mientras que el colesterol promueve las contracciones al término de la gestación (Laboccaro y cols. 2013).

Las hormonas gonadales regulan el contenido de lípidos en el endometrio, ya que estos varían dependiendo de la etapa del ciclo estral<sup>36</sup> (Devasagayam 1986). Análogos del estradiol favorecen la acumulación de gotas de lípidos dentro de las células del endometrio (Komar 2005; Yin y cols. 2012), particularmente de fosfolípidos y triglicéridos (Stacey y cols. 1991). Mientras que análogos de progesterona favorecen la acumulación de colesterol y triglicéridos (Stacey y cols. 1991). El tipo de ácidos grasos en el útero varía con la menopausia, así en animales jóvenes

---

<sup>36</sup> Ver glosario.

se encuentran elevados los niveles de ácidos grasos de cadena corta, mientras que en animales adultos y viejos son los de cadena larga los abundantes (Leaver y cols. 1992), lo cual indica que los niveles de estrógenos regulan el tipo de lípidos presentes en el útero.

En el epitelio uterino, el aumento en la densidad de las gotas de lípidos, así como, su localización (región perinuclear o apical de la célula) inducen citotoxicidad (Dadarwal y cols. 2015). Por su parte, la disminución de la  $\beta$ -oxidación (Dunning y cols. 2010) reduce el número de implantaciones. En mujeres obesas sometidas a fertilización in vitro se ha observado un aumento en el número de abortos y una disminución de las implantaciones (Bellver y cols. 2007). Además, la obesidad aumenta la prevalencia de cáncer endometrial, lo que se ha relacionado con una disminución en los niveles de adiponectina<sup>37</sup>, estimulando la síntesis de factor de crecimiento tumoral (Nagaraju y cols. 2016). Mientras que en rumiantes obesos se ha observado que la obesidad aumenta el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) en el fluido uterino, el cual favorece la apoptosis y altera la diferenciación del blastocisto (Velazquez y cols. 2011). Por otra parte, la acumulación de colesterol puede generar hiperplasia endometrial y prolapso uterino (Sumathi y cols. 2016). El incremento en el colesterol uterino está relacionado con una disminución en la amplitud de las contracciones del miometrio durante el parto (Smith y cols. 2005).

## 2.3 PPAR y reproducción femenina

Los PPARs son una familia de receptores que se codifican por tres genes distintos originando los isotipos  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ . El PPAR $\alpha$  promueve la expresión de genes para la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, el transporte y la síntesis de apoproteínas<sup>38</sup>, así como la expresión de PLIN en hígado (Okumura 2011; Gryciel-Górniak 2014). El PPAR $\delta$  regula genes relacionados con la síntesis lipídica y la formación de la gota lipídica. El PPAR $\gamma$  regula genes relacionados con el transporte de los ácidos grasos (CD36, Grasselli y cols. 2011). Además, este último regula la entrada y salida de colesterol, disminuye su esterificación, la expresión de LDLR y la secreción

---

<sup>37</sup> Ver glosario.

<sup>38</sup> Ver glosario.

de prostaglandinas (Chinetti y cols. 2003; Froment y cols. 2006). Los PPARs pueden formar heterodímeros con el LXR, receptor X retinoide (RXR) y los TRs (Graselli y cols. 2011). La activación de PPAR $\alpha$  e inactivación de PPAR $\gamma$ , a través de la molécula Z-551, reduce la concentración de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos en el suero e hígado (Shiomi y cols. 2015; Zhang y cols. 2015).

La expresión de PPAR en las estructuras reproductivas femeninas ha sido ya estudiada, aunque mayoritariamente en el ovario. Se ha mostrado que todos los estadios foliculares y el estroma tienen PPAR $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  (Froment y cols. 2006). Su expresión en roedores y rumiantes es abundante en la etapa folicular y disminuye en la etapa secretora (Komar y cols. 2001). La activación de PPAR $\gamma$  a través de tiazolidinedionas modula la foliculogénesis (Froment y cols. 2006), la maduración del ovocito (Vélez y cols. 2013) y el mantenimiento del cuerpo lúteo (Kurzynska y cols. 2014). Tales acciones son posibles ya que tiazolidinedionas favorecen la síntesis y actividad de enzimas esteroidogénicas como la aromatasa y 3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- $\beta$ HSD; Mu y cols. 2000). Así mismo, las tiazolidinedionas favorecen la conversión de colesterol a pregnenolona (Komar y cols. 2001). La secreción de progesterona y estradiol también es regulada diferencialmente por PPARs. Así, en trabajos utilizando tiazolidinedionas se ha visto que, la activación de PPAR $\alpha$  y  $\delta$  disminuye la secreción de estradiol; mientras que PPAR $\gamma$  no tiene ningún efecto. En cuanto a la secreción de progesterona, todos los isotipos de PPAR son capaces de disminuir su síntesis (Kurzynska y cols. 2014). Por otra parte, PPAR $\alpha$  regula la expresión de genes como el de la sintasa óxido nítrico (NOS) y el de ciclooxigenasa 2 (COX-2), implicados en la maduración del ovocito (Komar y cols. 2001); proteasas involucradas en el proceso de ruptura folicular en la ovulación, y genes que participan en el remodelamiento ovárico, como el de las metaloproteasas de la matriz celular (tipo 1, 3, 9 y 13; Shu y cols. 2000; Komar y cols. 2005); activadores de plasminógenos; y factores de crecimiento y sus receptores que regulan el mantenimiento del cuerpo lúteo como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor Flt-1, -2 (Yamakawa y cols. 2000; Komar y cols. 2005). En el oviducto, solo un estudio ha mostrado que el ámpula e istmo del oviducto de ranas tiene receptores PPAR $\gamma$ 2, cuya activación modula el tamaño de las células epiteliales durante su hibernación y en la fase estral (Liu y cols. 2014). Mientras que en el útero, la expresión de PPAR $\gamma$  ha sido mostrada en el epitelio uterino de rata (Yin y cols. 2012), aunque

se desconoce su posible función. Por su parte, ratones knock-out de PPAR $\gamma$  disminuyen el número de implantaciones (Cui y cols. 2002). De manera que es posible que este receptor cumpla un papel importante en las funciones del útero.

## **2.4 Hormonas tiroideas, lípidos y PPAR**

Como podemos apreciar hay una fuerte evidencia de que las hormonas tiroideas regula la acumulación de lípidos en diversos tejidos. En esta relación, los receptores nucleares como PPAR son importantes. Así, las hormonas tiroideas parecen tener una estrecha relación con los PPARs, ya que estos heterodimerizan con los TRs para actuar sobre los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (Lu y Cheng 2010). El gen de PPAR es regulado a la baja por hormonas tiroideas en hígado (Lu y Cheng 2010; Graselli y cols. 2011); y, a su vez, los PPAR regulan la expresión de desyodasas tipo 2, participando así en la síntesis local de T3 (Lu y Cheng 2010). Así mismo, ratones con mutación en el gen de TR $\beta$  disminuyen la expresión de PPAR $\alpha$ 1 y aumentan la expresión de PPAR $\delta$  en el corazón (Hyyti y Portman 2006). En ovejas tiroidectomizadas PPAR $\alpha$  se encuentra disminuido en el corazón (McClure y cols. 2005).

## **3. JUSTIFICACIÓN**

En mujeres y en modelos animales, el hipotiroidismo se relaciona con alteraciones en la maduración folicular, en la histología del oviducto y el útero, así como con un menor tamaño de las crías (Jiang y cols. 2008; Krassas y cols. 2010; Lutsyk y Sogomonian 2012; Straveus y cols. 2012, Hapon y cols. 2007; Anaya-Hernández y cols. 2015; Rodríguez-Castelán y cols. 2017b; Rodríguez-Castelán y cols. en proceso a y b). Se desconocen los mecanismos que conllevan a que el hipotiroidismo produzca estos efectos en el tracto reproductivo femenino. Sin embargo, considerando que las hormonas tiroideas: 1) regulan el contenido de lípidos en el suero y en diversos tejidos metabólicos (Rodríguez-Castelán y cols. 2015, Rodríguez-Castelán y cols. 2017a y b), y 2) que las células epiteliales y musculares del ovario, oviducto y útero almacenan lípidos (colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, oxiesteroles y fosfolípidos, Henault y

Killian 1993a,b,c; Murray y cols. 1996), donde regulan la maduración folicular (Leroy y cols. 2004; Ferguson y Leese 2006; Van Hoeck y cols. 2014), la capacitación de los espermatozoides (Davis y cols. 1980) y la decidualización del endometrio (Tsai y cols. 2014), es posible suponer que los problemas de fertilidad de las hembras con hipotiroidismo se relacionen con cambios en el contenido de lípidos en las diversas estructuras reproductivas.

Las hormonas tiroideas regulan la síntesis de diversos lípidos y tienen una estrecha relación con los PPARs, ya que estos heterodimerizan con los TRs para actuar sobre los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (Lu y Cheng 2010). El gen de PPAR es regulado a la baja por hormonas tiroideas en hígado (Lu y Cheng 2010; Graselli y cols. 2011); y, a su vez, los PPAR regulan la expresión de desyodasas tipo 2, participando así en la síntesis local de T3 (Lu y Cheng 2010). Considerando que los ácidos grasos y oxisteroles son ligandos endógenos de PPAR $\beta/\delta$  (Komar 2005), que este receptor se localiza en ovario y útero (Froment y cols. 2006, Yin y cols. 2012) y es regulado por hormonas tiroideas (Lu y Cheng 2010), es posible que el efecto del hipotiroidismo sobre las estructuras reproductivas se asocie con modificaciones en la expresión de este receptor.

## **4. HIPÓTESIS**

El hipotiroidismo aumenta la acumulación de lípidos, la expresión de PLIN y la inmunolocalización de PPAR  $\delta$  en tejidos reproductivos de la coneja.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Determinar el efecto del hipotiroidismo sobre el contenido de lípidos, la expresión de PLIN y la presencia de PPAR  $\delta$  en tejidos reproductivos de la coneja.

## 5.2 Objetivos Específicos

En conejas controles e hipotiroideas:

- a) Cuantificar el contenido de colesterol en ovario, oviducto y útero.
- b) Cuantificar el contenido de triglicéridos en ovario, oviducto y útero.
- c) Determinar la presencia de gotas de triglicéridos y lípidos oxidados en ovario, oviducto y útero.
- d) Cuantificar la expresión de PLIN en ovario, oviducto y útero.
- e) Cuantificar la expresión de PPAR  $\delta$  en ovario, oviducto y útero.

## 6. METODOLOGÍA

Se utilizaron conejas de la raza Chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) de 7-13 meses de edad, las cuales fueron alojadas en jaulas de acero inoxidable de 50 x 60 x 40. Los animales fueron proporcionados por el animalario del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Durante el desarrollo de los experimentos, las conejas permanecieron en condiciones controladas de ciclo luz/oscuridad (16/8 h), a una temperatura de ( $22 \pm 2$  °C), mantenidas con alimento purina con acceso controlado (120 g diarios) y agua *ad libitum*. Las conejas se dividieron en dos grupos: el control (sin tratamiento; n=12) y el hipotiroideo (n=12). El hipotiroidismo se indujo mediante tratamiento con el fármaco antitiroideo *metimazol* (MMI, Sigma), el cual fue administrado en el agua de bebida a una concentración de 0.02% (10 mg/kg/día) durante treinta días. Después del sacrificio, se extrajeron los ovarios, oviductos y úteros, de los cuales los derechos de todos los animales se congelaron y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento y los izquierdos se fijaron en paraformaldehído al 4% (n=6 por grupo) para cortes (5  $\mu$ m) en criostato o en Bouin-Duboscq (incluidos en parafina, n=6 por grupo) para cortes (7  $\mu$ m) en micrótomo.

## 6.1 Contenido de lípidos en ovario, oviducto y útero

*Cuantificación de colesterol por método enzimático.* Una porción de los tejidos almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  fue usada ( $n=6$  por grupo). Se utilizó una porción de aproximadamente 200 mg de ovario y 100 mg oviducto y útero. El oviducto fue dividido en una porción craneal correspondiente a las regiones FIM e INF, una porción intermedia que contiene AMP y una porción caudal correspondiente a las regiones IST y UT. Las porciones mencionadas anteriormente de 6 animales por condición fueron maceradas en una solución de cloroformo-metanol (2:1; método de Folch), posteriormente se agregó NaCl al 0.7% para separar las fases. Después se centrifugó durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fase superior fue desechada y la fase inferior fue separada y se dejó evaporar durante una noche. El tubo que contenía la grasa fue pesado antes y después de que se evaporara y la diferencia entre pesos fue el contenido de grasa total. La grasa total obtenida se reconstituyó en una solución de tritón al 10% en isopropanol y se obtuvo la muestra de lípidos. El colesterol fue medido a través de un método colorimétrico enzimático mediante el kit de ELITech Clinical Systems (CHSL-0507).

*Presencia de triglicéridos mediante tinción.* Una porción de ovario, oviducto (porciones craneal, intermedia y caudal) y útero izquierdos de 6 animales por grupo fue fijada en paraformaldehído al 4% durante 24 h, posteriormente se colocaron en una solución de sacarosa, al 10, 20 y 30% y fueron cortados a  $5\ \mu\text{m}$  en un criostato y colocadas en laminillas hasta su uso. Las laminillas cortadas se colocaron en alcohol isopropílico y, posteriormente, en la solución de rojo oleoso. Se contrastaron con rojo núcleo y se montaron con glicerina. Se tomó como marcaje aquellos gránulos que estuvieran en el interior de las células. Posteriormente se tomaron fotografías a 100x y se describió la presencia de gotas de lípidos en ovario, oviducto y útero. Se realizó un análisis semi-cuantitativo de la presencia de gránulos de triglicéridos donde se consideró su presencia como abundante (+++), intermedia (++) o escasa (+).

*Cuantificación de triglicéridos por método enzimático.* Para la determinación del contenido de triglicéridos en ovario, oviducto (porciones craneal, intermedia y caudal) y útero se utilizó el mismo procedimiento del apartado de colesterol. Los triglicéridos fueron medidos a través de un método colorimétrico enzimático mediante el kit de ELITech Clinical Systems (TGML-0425).

*Cuantificación de lípidos oxidados por la tinción Negro de Sudán.* Lípidos oxidados como la lipofucsina han sido usados como un indicador indirecto de estrés oxidativo, envejecimiento y muerte celular (Brunk y Terman 2002). Esta puede ser detectada por tinciones como el negro de Sudán y de carbolfucsina. Las laminillas conteniendo ovario, oviducto (porciones craneal, intermedia y caudal) o útero se colocaron en una solución de etilenglicol al 100% durante 2 min, posteriormente en la solución de negro de Sudán por 5 min, se lavaron con una solución de etilenglicol al 85% durante 3 min, se contrastaron con rojo neutro y se montaron con glicerina. Se tomó como marcaje aquellos gránulos que estuvieran en el interior de las células. Posteriormente se tomaron fotografías a 10x, 40x y 100x representativas de cada tejido. Se realizó un análisis semi-cuantitativo de la presencia de gránulos de lípidos como se mencionó en el apartado d presencia de triglicéridos mediante tinción, donde se consideró la presencia abundante (+++), intermedia (++) o escasa (+).

*Cuantificación de lípidos oxidados por el Método de Kinyoun.* Las laminillas obtenidas del ovario, oviducto (porciones craneal, intermedia y caudal) y útero fueron teñidas con carbolfucsina durante 5 min, posteriormente fue contrateñido con hematoxilina de Harris y se montó con glicerina. Posteriormente se tomaron fotografías a 100x representativas de cada tejido. Se realizó un análisis semi-cuantitativo como el realizado con la técnica de rojo oleoso y negro de Sudán.

## **6.2 Expresión de PLIN A en ovario, oviducto y útero**

**Western blot.** Para la realización de esta técnica los tejidos almacenados a -80°C fueron usados. Se utilizó una porción de aproximadamente 100 mg de ovario, oviducto (porciones craneal, intermedia y caudal) y útero. *Extracción total.* Se tomó una porción de los tejidos congelados de 6 animales por condición y fueron macerados con un homogenizador electrónico utilizando un buffer de lisis (0.02 M tris HCl pH 7.4, 0.1 mM NaCl, 0.1 M glicina y Tx 0.1%) adicionado con un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma), 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 1 mM ditiotreitolo (DTT). Los homogenados obtenidos fueron centrifugados a 15000 rev/min durante 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante considerado como extracto total. *Extracción citoplasmática y nuclear.* Otro fragmento de los tejidos

congelados fue procesado con un buffer de homogenización enriquecido en Hepes a 10 mM pH 7.5 (KCl 10 mM y EDTA 0.1 mM) adicionado con un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma), 1 mM PMSF y 1 mM DTT. Posteriormente se agregó 0.5% de tergitol tipo NP40, se llevó al vórtex por un minuto y se centrifugó durante 5 min a 10000 rev/min a 4°C para obtener el precipitado y el sobrenadante, el sobrenadante fue considerado como el extracto citoplasmático. Después, se colocó un segundo buffer de homogenización enriquecido en Hepes a 20 mM pH 7.5 (KCl 400 mM y EDTA 1 mM) adicionado con un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma), 1mM PMSF y 1 mM DTT al precipitado y se centrifugó durante 10 min a 9000 rev/min a 4°C, el sobrenadante fue tomado como el extracto nuclear. Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford de los homogenados que se obtuvieron (totales, citoplasmáticos y nucleares). Se realizó la separación electroforética de las proteínas utilizando geles de poliacrilamida/dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% que fueron cargados con 30 µg de proteína para ovario, 100 µg para cada porción de oviducto y 30 µg para útero. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NTC) utilizando el sistema Mini Trans-Blot Cell (ENDURO). Una vez realizada la transferencia se bloqueó con una solución de leche descremada al 6% y 0.2% tween-20 en buffer fosfato sódico (PSB) a un pH 7.6. Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (anti-PLIN A, 1:100, Sigma) diluido en 1% de leche descremada en 0.2% de tween-20 PBS durante 16-18 h a 4°C. Después se incubó con el anticuerpo secundario (mouse anti goat IgG acoplado a peroxidasa, Santa Cruz Biotechnology) diluido en 1% de leche descremada y 0.2% de tween-20 PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente las bandas inmunoreactivas fueron reveladas utilizando un kit de quimioluminiscencia (Super Signal West Pico, Pierce) en un equipo de quimioluminiscencia (Thermo Scientific). Las bandas se visualizaron y se midió su intensidad por densitometría usando el programa Image J. El patrón de bandas teñidas con rojo de Ponceu fue usado como control en el análisis del western blot (Rivero-Gutiérrez y cols. 2014; Rodríguez-Castelán y cols. 2017b).

**Inmunohistoquímica.** El oviducto, ovario y útero izquierdo de 6 animales por condición se fijaron con una solución de Bouin-Duboscq por 12 h. Se deshidrataron con alcoholes en concentración ascendente (60-100%) e incluyeron en parafina. Los segmentos de ovario, oviducto (FIM-INF, AMP, IST Y UT) y útero fueron cortados transversalmente a 7 µm con un

micrótomo. Los tejidos fueron desparafinados en xilol y alcoholes de graduación descendente. Enseguida, los cortes fueron incubados en una solución de citrato de sodio (10 mM, pH 6) durante 3 noches a 4°C para el destape de antígenos. Posteriormente, los cortes se incubaron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, y se lavaron en soluciones de PBS y PBS-tritón. A continuación, los cortes fueron incubados en solución de bloqueo al 5% (suero de burro). Los cortes se lavaron con solución de PBS-tritón y se incubaron con el anticuerpo primario (anti-PLIN A, 1:100, Abcam) durante 12 h a 4°C. Pasado el tiempo, los cortes se lavaron con PBS-tritón y se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado (donkey anti-mouse, Santa Cruz, Biotechnology) diluido a una concentración de 1:250 durante 2 h. Los cortes se lavaron con PBS- tritón y PBS. Se incubaron durante 1 h con el complejo avidina biotina (ABC; 1:200), y se lavaron con PBS. La presencia del antígeno fue revelada con el cromógeno diaminobencidina a una concentración de 0.3%. Finalmente, los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron en alcoholes con concentración ascendente, se aclararon con xileno y se montaron con resina. Microfotografías a 100X fueron tomadas y se describió la inmunolocalización de PLIN en ovario, oviducto y útero.

### **6.3 Determinación de PPAR $\delta$ en ovario, oviducto y útero**

**Western blot.** Para cuantificar la expresión del PPAR $\delta$  en ovario y útero, se utilizó el mismo procedimiento del apartado de PLIN, el anticuerpo primario utilizado fue anti-PPAR $\delta$  (1:80, Abcam).

**Inmunohistoquímica.** Para la determinación de PPAR $\delta$  en ovario, oviducto y útero, se utilizó el mismo procedimiento del apartado de PLIN, el anticuerpo primado utilizado fue anti PPAR  $\delta$  (1:200, Abcam). En todos los tejidos se tomaron fotografías a 100X y se describió la expresión de PPAR $\delta$ .

### **6.4 Análisis Estadístico**

Los valores obtenidos de las diferentes variables estudiadas se analizaron mediante una prueba *t* de Student o *U* Mann Whitney, según fue el caso. Para todas las pruebas se usó el

programa Graph Pad Prism v5. Se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como significancia estadística. Los valores fueron mostrados como medias  $\pm$  error estándar (EE).

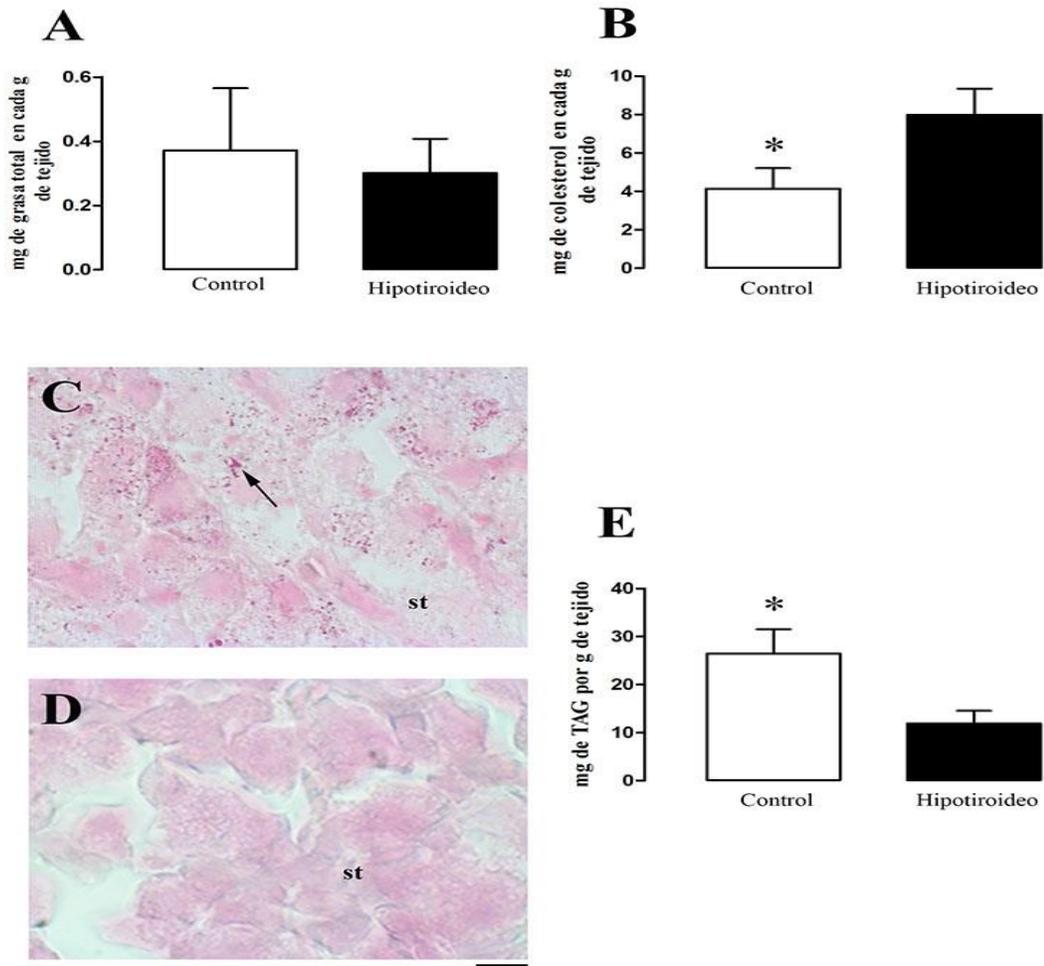
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Ovario

**Lípidos.** La cuantificación de grasa por el método de Folch mostró que el contenido de grasa total en los ovarios de animales controles e hipotiroideos fue similar (Fig. 1 A). Sin embargo, el contenido de colesterol por el método enzimático mostró que el hipotiroidismo aumenta el contenido de colesterol en ovario (Fig 1 B, tabla 1). Respecto a los triglicéridos, las gotas de triglicéridos se apreciaron en el estroma ovárico (Fig. 1 C, tabla 1), ovocitos, y folículos ováricos de los animales controles, en los que aumentaron con respecto a su grado de maduración (tabla 1); no se encontraron gotas en glándulas ováricas. El hipotiroidismo indujo un menor número de gotas de triglicéridos en el estroma (Figs. 1 C y D). En folículos terciarios, se observó una menor cantidad de triglicéridos en células de la teca y un aumento en células de la granulosa, en todas las estadias foliculares (tabla 1). Con respecto a los ovocitos, no se observó ninguna influencia del hipotiroidismo, lo mismo ocurrió en glándulas ováricas y epitelio; mientras que en el cumulus se encontró disminuido (tabla 1). El método enzimático mostró que el contenido de triglicéridos en el grupo hipotiroideo fue menor que en el grupo control (Fig. 1 E).

**Tabla 1.** Semi-cuantificación de triglicéridos en el ovario de animales controles (n=3) e hipotiroideos (n=3) con el método d rojo oleoso. Abundante (+++), moderado (++) y escaso (+).

	<b>Rojo Oleoso</b>	
	<b>C</b>	<b>HT</b>
<b>Estroma</b>	+++	+
<b>Epitelio</b>	++	+
<b>Glándulas ováricas</b>	+	+
<b>Folículos primarios</b>	+	+
<b>Folículos secundarios</b>	++	+
<b>Folículos terciarios</b>	+++	+
<b>Ovocitos</b>	+	+
<b>Células del cumulus</b>	++	+



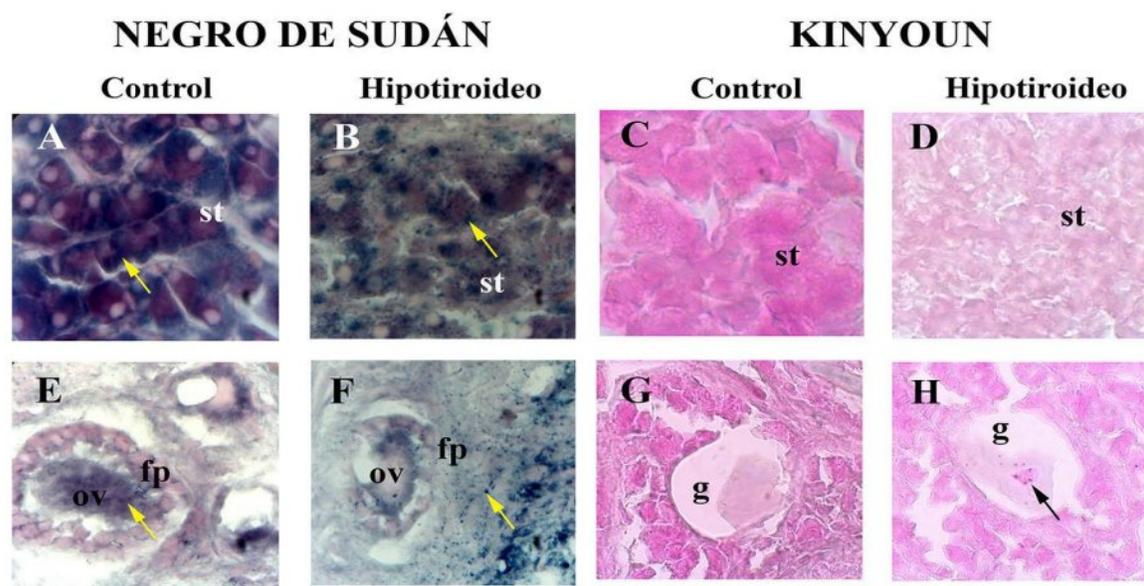
**Figura 1.** Contenido de grasa total (A) y colesterol (B) de ovarios de conejas controles (barras blancas) e hipotiroideas (barras negras). Localización de gotas de triglicéridos mediante la tinción de rojo oleoso en el ovario del grupo control (n=3, C) e hipotiroideo (n=3, D). Abreviaturas: estroma (st), las gotas de triglicéridos están indicadas con una flecha negra. La barra representa 20  $\mu$ . Contenido de triglicéridos (E) en ovarios del grupo control (n=6, barra blanca) e hipotiroideo (n=6, barra negra). Los datos fueron analizados con t-Student. Las diferencias entre grupos están representadas con asteriscos \*  $p \leq 0.05$ .

La presencia de lípidos oxidados mediante la técnica negro de Sudán se observó en el estroma ovárico, en el epitelio ovárico y en el contenido de las glándulas intersticiales, así mismo en todos los estadios foliculares se encontró disminuido con respecto a su grado de maduración (Tabla 2, Fig. 2 A y E). El grupo hipotiroideo mostró una aparente disminución en la cantidad de gotas presentes en el estroma (Tabla 2, Fig. 2 A y B), así como en los ovocitos (Tabla 2, Fig. 2 E y F), células de la granulosa y teca de folículos primarios y secundarios (Tabla

2, Fig. 2 E y F). En los folículos terciarios hubo un aumento en el número de gránulos en células de la granulosa y teca (Tabla 2). El contenido de lípidos oxidados presente en las glándulas de ovarios en animales controles e hipotiroideos fue similar (Tabla 2). Mediante la técnica de Kinyoun se encontró aumento en el número de gránulos de lípidos oxidados en las glándulas intersticiales de los animales hipotiroideos (Tabla 2); sin encontrarse diferencias en estroma (Fig. 2 C y D) y folículos ováricos (Tabla 2) de animales controles e hipotiroideos.

**Tabla 2.** Cuantificación de lípidos oxidados en el ovario de animales controles (n=6) e hipotiroideos (n=6) con los métodos Negro de Sudán y Kinyoun. Abundante (+++), moderado (++) y escaso (+).

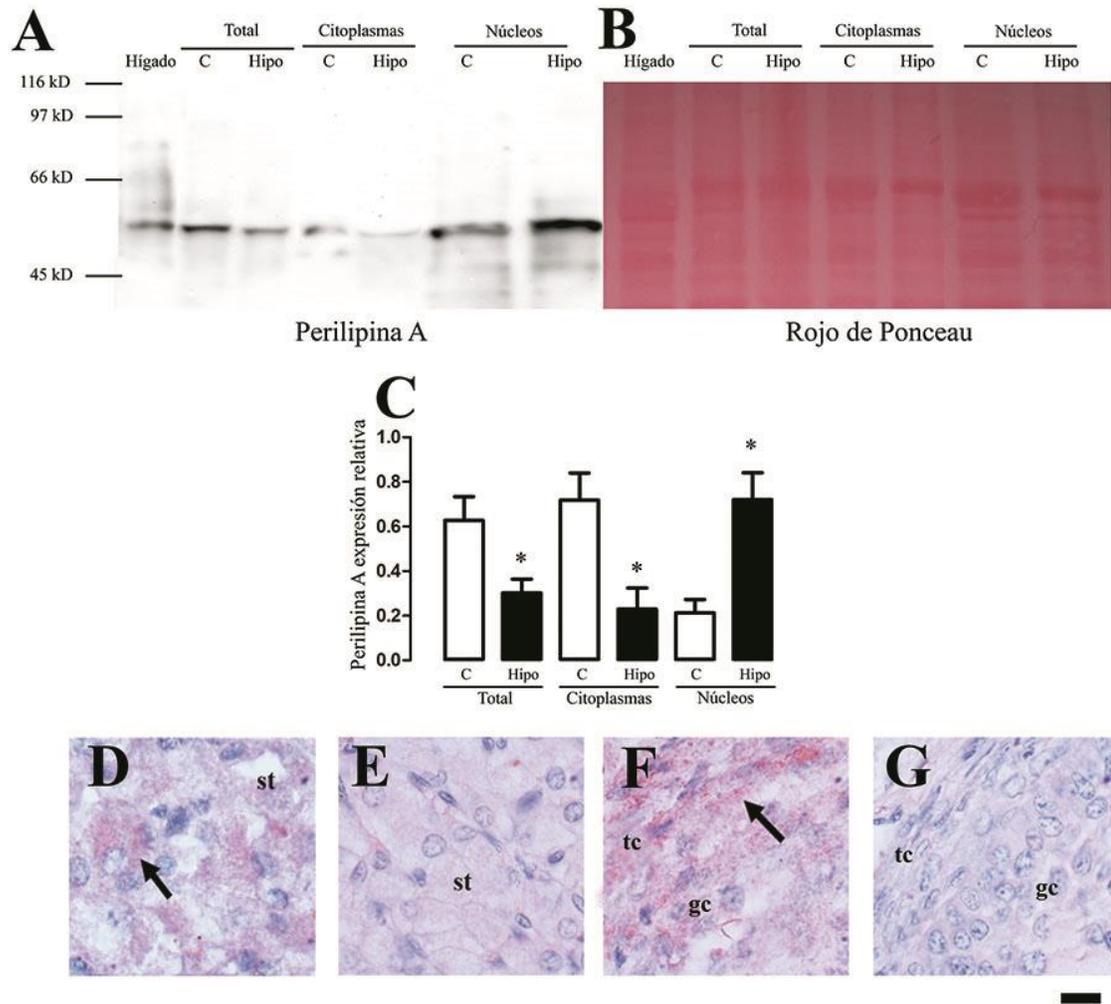
	NEGRO DE SUDÁN		KINYOUN	
	Control	Hipotiroideo	Control	Hipotiroideo
Estroma	+++	++	+	+
Epitelio	++	+	+	+
Folículos Primarios	++	+	+	+
Folículos secundarios	+	+	+	+
Folículos terciarios	+	+++	+	+
Ovocitos	+++	+	+	+
Células del cumulus	+++	++	+	+
Glándulas ováricas	+++	++	+	+



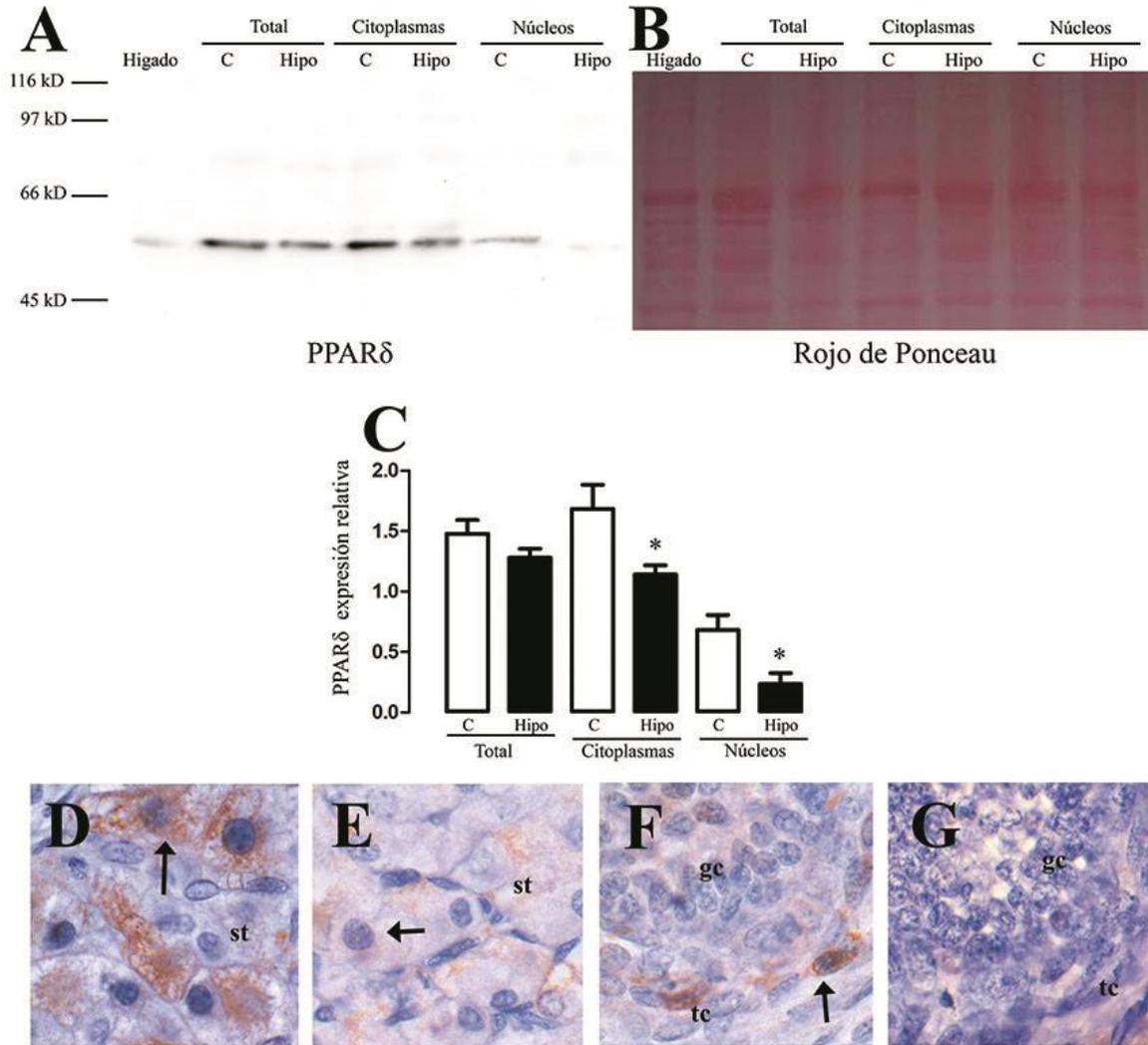
**Figura 2.** Microfotografías de ovarios teñidos con negro de Sudán en conejas controles (n=3, A y E) e hipotiroideas (n=3, B y F); y lipofuscina de hembras controles (C y G) e hipotiroideas (D y H). Abreviaturas: estroma (st), folículo primario (fp), ovocito (ov) y glándulas intersticiales (g). Las barras representan 20  $\mu$ .

**PLIN A.** Para la técnica de western blot, se utilizó la fracción total del hígado como control positivo (Fig. 3 A). Se observó que la PLIN se expresó en mayor cantidad en los extractos citoplasmáticos que en los nucleares (Fig. 3 A). El hipotiroidismo disminuyó la expresión de PLIN en los extractos totales y citoplasmáticos (Fig. 3 C), mientras que en extractos nucleares aumentó. Se detectó la expresión de PLIN A en los ovarios de conejas controles (Figs. 3 D y F) e hipotiroideas (Fig. 3 E-G). Esta fue localizada en núcleos y citoplasma del estroma (Fig. 3 A y D), en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios y secundarios; en los folículos terciarios se encontró en mayor cantidad comparado con los otros folículos (Fig. 3 F). Comparado con el control, PLINA no estuvo presente el estroma, folículos secundarios y terciarios (Figs. 3 D-G) de animales hipotiroideos; mientras que en folículos primarios fue mayor.

**PPAR $\delta$ .** La cuantificación de la proteína PPAR $\delta$ , se realizó mediante la técnica de western blot y se utilizaron fracciones totales de hígado como control. Se encontró que el PPAR  $\delta$  está presente no sólo en la fracción nuclear, sino que también en la citoplasmática (Fig. 4 A). La expresión de PPAR $\delta$  en fracciones totales y citoplasmáticas fue similar en ambos grupos (Fig. 4 A y C); mientras que fue mayor en la fracción nuclear de conejas hipotiroideas (Fig. 4 A y C). Se detectó la presencia de PPAR $\delta$  en los ovarios de conejas controles (Figs. 4 D y F) e hipotiroideas (Fig. 6E y G). El PPAR $\delta$  se encontró en núcleos y citoplasma del estroma (Fig. 4 D), en células de la granulosa y de la teca de folículos primarios; en los folículos terciarios se encontró en mayor cantidad en células de la teca con respecto a las células de la granulosa (Fig. 4 F), así mismo se encontraron núcleos inmunoreactivos en el epitelio ovárico. Además, se encontraron gránulos inmunomarcados en el contenido de las glándulas intersticiales. Comparado con el control el PPAR $\delta$  no estuvo presente en folículos primarios y secundarios así como en glándulas, mientras que en folículos terciarios se encontró únicamente en células de la teca aunque en menor cantidad que en grupo control (Fig. 4 E y F). Además, el inmunomarcaje del epitelio ovárico se observó disminuido.



**Figura 3. Arriba. (A)** Expresión de perilipina A (PLIN A) en fracciones totales, citoplasmáticas y nucleares de ovarios controles e hipotiroideos. Se usó la fracción total del hígado como control positivo. **(B)** Membrana teñida con rojo de Ponceu donde se observó el total de proteínas que fueron usadas como control de carga en fracciones totales, citoplasmáticas y nucleares de ovarios controles e hipotiroideos. Cuantificación de la expresión de PLIN A en fracciones totales, citoplasmáticas y nucleares **(C)** en ovarios de hembras controles (barras blancas) e hipotiroideas (barras negras). C, grupo control; HT, grupo hipotiroideo. Los datos fueron analizados con *t* de Student. Las diferencias estadísticas están representadas con asteriscos \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ . Abajo. **Microfotografías representativas de la inmunolocalización de PLIN A en ovarios controles (D y F) e hipotiroideos (E y G).** Las células positivas están señaladas con una flecha negra; estroma (st); células de la granulosa (gr), células de la teca (tc). La barra representa 20 $\mu$ m.



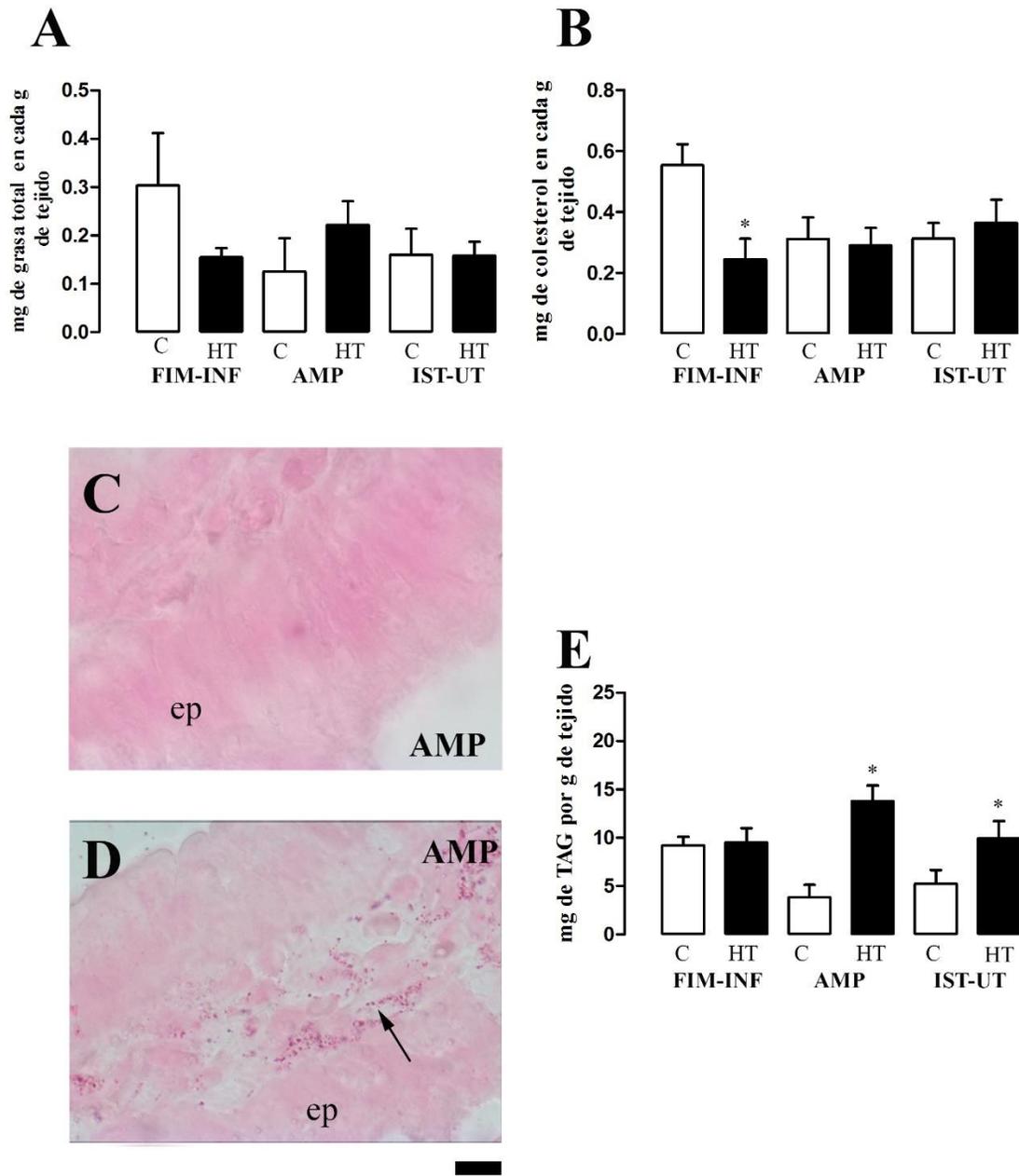
**Figura 4. Arriba.** (A) Expresión de PPAR $\delta$  en fracciones totales, citoplasmáticas y nucleares de ovarios controles e hipotiroides. Se usó la fracción total del hígado como control positivo. (B) Membrana teñida con rojo de Ponceau donde se observó el total de proteínas que fueron usadas como control de carga en fracciones totales, citoplasmáticas y nucleares de ovarios controles e hipotiroides. Cuantificación de la expresión de PPAR $\delta$  en fracciones totales, citoplasmáticas y nucleares (C) en ovarios de hembras controles (barras blancas) e hipotiroides (barras negras). Abreviaturas: C, grupo control; HT, grupo hipotiroides; RP, rojo de Ponceau. Los datos fueron analizados con *t* de Student. Las diferencias estadísticas están representadas con asteriscos \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ . **Abajo.** Microfotografías representativas de la inmunolocalización de PPAR $\delta$  en ovarios controles (D y F) e hipotiroides (E y G). Núcleos están señalados con una flecha negra y citoplasmas positivos con flechas amarillas; estroma (st); células de la granulosa (gr), células de la teca (tc). La barra representa 20  $\mu$ m.

## 7.2 Oviducto

**Lípidos.** La cuantificación de colesterol por el método enzimático mostró que el contenido de grasa total en las regiones FIM-INF, AMP e IST-UT de oviductos de animales controles e hipotiroideos fue similar (Fig. 5 A). Así mismo, el contenido de colesterol no mostró diferencias entre el grupo control y el hipotiroideo en las regiones AMP e IST-UT. Sin embargo, el hipotiroidismo redujo el contenido de colesterol en la región FIM-INF (Fig. 5 B). En los animales controles, se observaron gotas de triglicéridos en la submucosa de todas las regiones (Figs. 5 C, Tabla 3), siendo aparentemente mayor en la submucosa de FIM y UT, y menor en AMP. El hipotiroidismo aumentó el contenido de triglicéridos en la submucosa de AMP (Figs. 5 C y D, tabla 3). En cuanto al contenido de triglicéridos con el método enzimático se observó que conforme se avanza de la FIM a la región UT el contenido va disminuyendo (Fig. 5 E). El contenido de triglicéridos fue similar entre el grupo control y el hipotiroideo en las regiones FIM-INF; sin embargo, en la región AMP e IST-UT se encontró aumentado en el grupo hipotiroideo (Fig. 5 E).

**Tabla 3.** Cuantificación de triglicéridos en las regiones del oviducto de animales controles (n=3) e hipotiroideos (n=3) mediante la técnica rojo oleoso. Abundante (+++), Intermedio (++) y escaso (+).

		<b>Rojo oleoso</b>	
		<b>C</b>	<b>Hipo</b>
<b>FIM-INF</b>	Porción apical del epitelio	+	+
	Porción basal del epitelio	+	+
	Submucosa	++	++
<b>AMP</b>	Porción apical del epitelio	+	+
	Porción basal del epitelio	+	+
	Submucosa	+	+++
<b>IST</b>	Porción apical del epitelio	+	+
	Porción basal del epitelio	+	+
	Submucosa	+	++
<b>UT</b>	Porción apical del epitelio	+	+
	Porción basal del epitelio	+	+
	Submucosa	++	++



**Figura 5.** Contenido de grasa total (**A**) y colesterol (**B**) de las diferentes regiones (INF-FIM, AMP e IST-UT) de los oviductos de conejas controles (barras blancas) e hipotiroideas (barras negras). Microfotografías de la región AMP en oviductos teñidos con rojo oleoso provenientes del grupo control (**C**) y del grupo hipotiroideo (**D**). Las gotas de triglicéridos están señaladas con una flecha negra. Abreviaturas: epitelio (e). La barra representa 20µm. (**E**) Contenido total de triglicéridos en las diferentes regiones de oviductos controles (barras blancas) e hipotiroideas (barras negras). Los datos fueron analizados con *U* de Mann Whitney o *t* de Student dependiendo el caso. Las diferencias entre grupos están representadas con asteriscos \*  $p \leq 0.05$ .

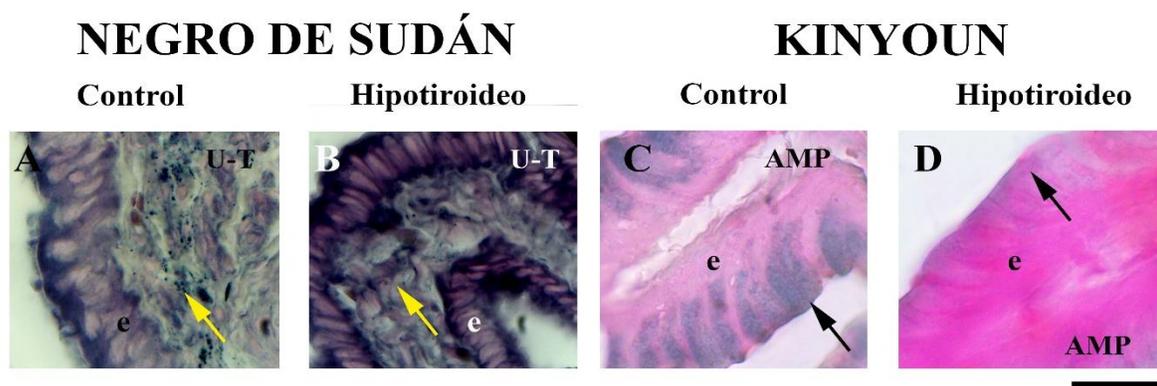
En animales controles, se observaron gránulos de lípidos oxidados teñidos con negro de Sudán en epitelio y submucosa de todas las regiones (Figs. 6 A). En el epitelio, la presencia de lípidos oxidados fue localizada en la porción apical y basal de las células, sin haber diferencias aparentes entre células ciliadas y secretoras (Figs. 6 A). Sin embargo, se observó una mayor cantidad de gránulos en la submucosa de la región UT (Tabla 4) seguido de la FIM (Tabla 4). Mientras que en las regiones AMP e IST, la presencia de gránulos de lipofucsina fue escasa (Tabla 4). En la región de la FIM-INF, el hipotiroidismo aumentó la cantidad y el tamaño de los gránulos en la submucosa con respecto a animales controles (Tabla 4). El contenido de lípidos oxidados en el epitelio se observó en la parte apical y basal de las células; particularmente en la porción apical se observó abundante en los animales hipotiroideos (Figs. 6 A y B, Tabla 4). En la región del AMP se observó aumentado el contenido de lípidos oxidados presentes en el epitelio apical en animales hipotiroideos, mientras que en epitelio basal y submucosa no se observaron diferencias en los gránulos entre ambos grupos (Tabla 4). En el IST, el hipotiroidismo aumentó los lípidos oxidados presentes en el epitelio basal y submucosa (Tabla 4), mientras que en la porción basal del epitelio no se observaron cambios (Tabla 4). En la región UT en animales controles, los gránulos de lipofucsina se encontraron abundantes en la submucosa y escasos en el epitelio (Tabla 4), mientras que en los animales hipotiroideos la presencia de gotas en la submucosa fue moderada y mayor en el epitelio apical (Fig. 6 A y B, Tabla 4). En cuanto a la presencia de lípidos oxidados con la técnica de Kinyoun, en la porción apical del epitelio oviductal se observó una coloración de lipofucsina en las regiones de AMP, IST y UT (Fig. 6 C, Tabla 4). Dicho marcaje no fue visible en la región FIM-INF (Tabla 4). El hipotiroidismo no modificó este contenido en la FIM-INF (Tabla 4) Se observó disminuida en AMP, IST y UT de animales hipotiroideos (Fig. 6 C y D, Tabla 4).

**PLIN A.** El ovario fue usado como control positivo (Fig. 7 A). Se observó que la PLIN se expresó en menor cantidad en los extractos citoplasmáticos que en los nucleares (Fig. 7 A y B-D). El hipotiroidismo disminuyó la expresión de PLIN en los extractos totales de la región FIM-INF (Fig. 7 B); en los extractos citoplasmáticos de la región IST-UT (Fig. 7 C), así como en los extractos nucleares de las regiones AMP y IST-UT (Fig. 7 D). Se detectó la presencia de PLIN A en el oviducto de conejas controles (Figs. 7 E y G) e hipotiroideas (Fig. 7 F y H). La PLIN se encontró en núcleos de células ciliadas y secretoras en FIM-INF, AMP, IST y UT (Fig. 7 E). En

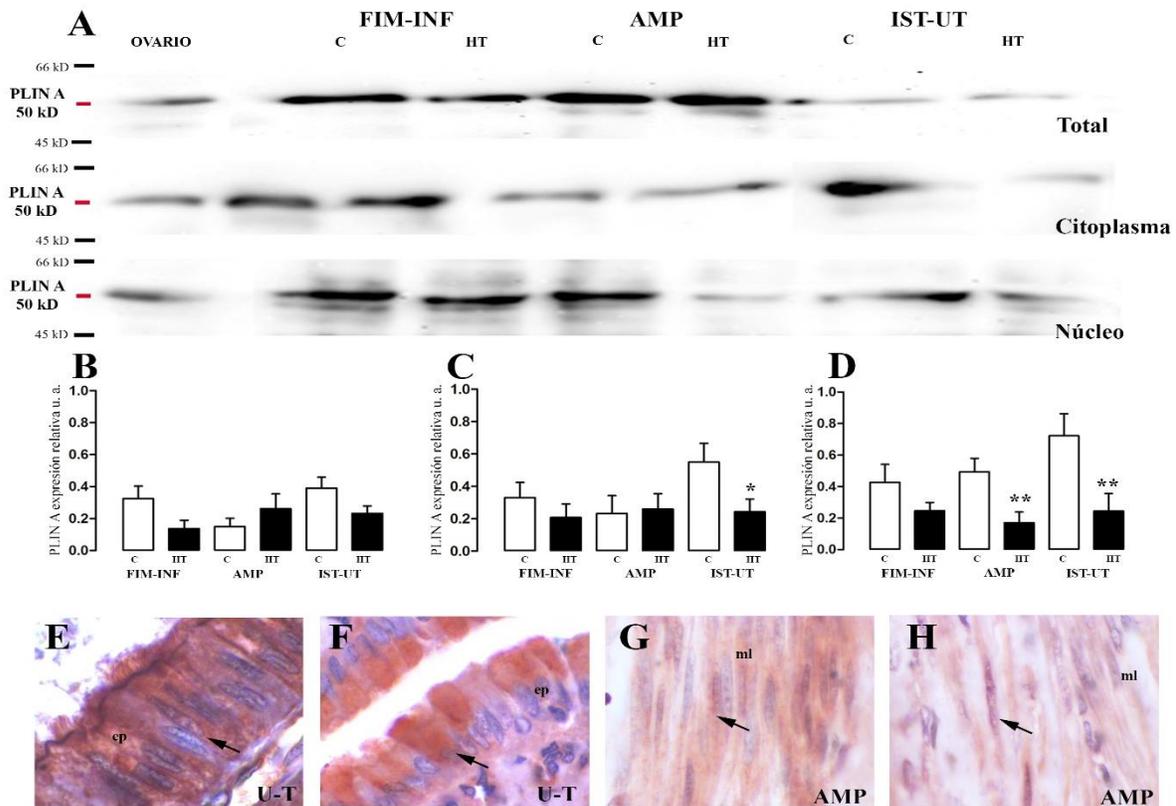
las regiones FIM-INF y UT, se encontró presente en todo el citoplasma mientras que en el AMP se encontró únicamente en la porción apical de las células (Fig. 7 E). En el istmo no se encontró en el citoplasma. Comparado con el grupo control PLIN A no estuvo presente en los núcleos del AMP (Fig. 7 E y F), así mismo se encontró en el citoplasma en la región del IST. En el citoplasma de células epiteliales en la región UT, se encontró únicamente en la porción apical de las células. La PLIN también fue expresada en el músculo liso en todas las regiones, en citoplasmas y núcleos (Fig. 7 G). Se encontró que el hipotiroidismo aumenta la expresión en el núcleo, mientras que disminuye en el citoplasma (Fig. 7 G y H).

**Tabla 4.** Cuantificación de lípidos oxidados en las regiones del oviducto de animales controles (n=6) e hipotiroideos (n=6) con los métodos Negro de Sudán y Kinyoun. Abundante (+++), Intermedio (++) y escaso (+).

		Negro de Sudán		Kinyoun	
		C	Hipo	C	Hipo
<b>FIM-INF</b>	Porción apical del epitelio	+	++	+	+
	Porción basal del epitelio	++	+	+	+
	Submucosa	++	+++	+	+
<b>AMP</b>	Porción apical del epitelio	+	++	+	+
	Porción basal del epitelio	+	+	+++	++
	Submucosa	+	+	+	+
<b>IST</b>	Porción apical del epitelio	++	+++	+	+
	Porción basal del epitelio	+	+	++	+
	Submucosa	+	++	+	+
<b>UT</b>	Porción apical del epitelio	+	+++	+	+
	Porción basal del epitelio	++	++	+++	+
	Submucosa	+++	++	+	+



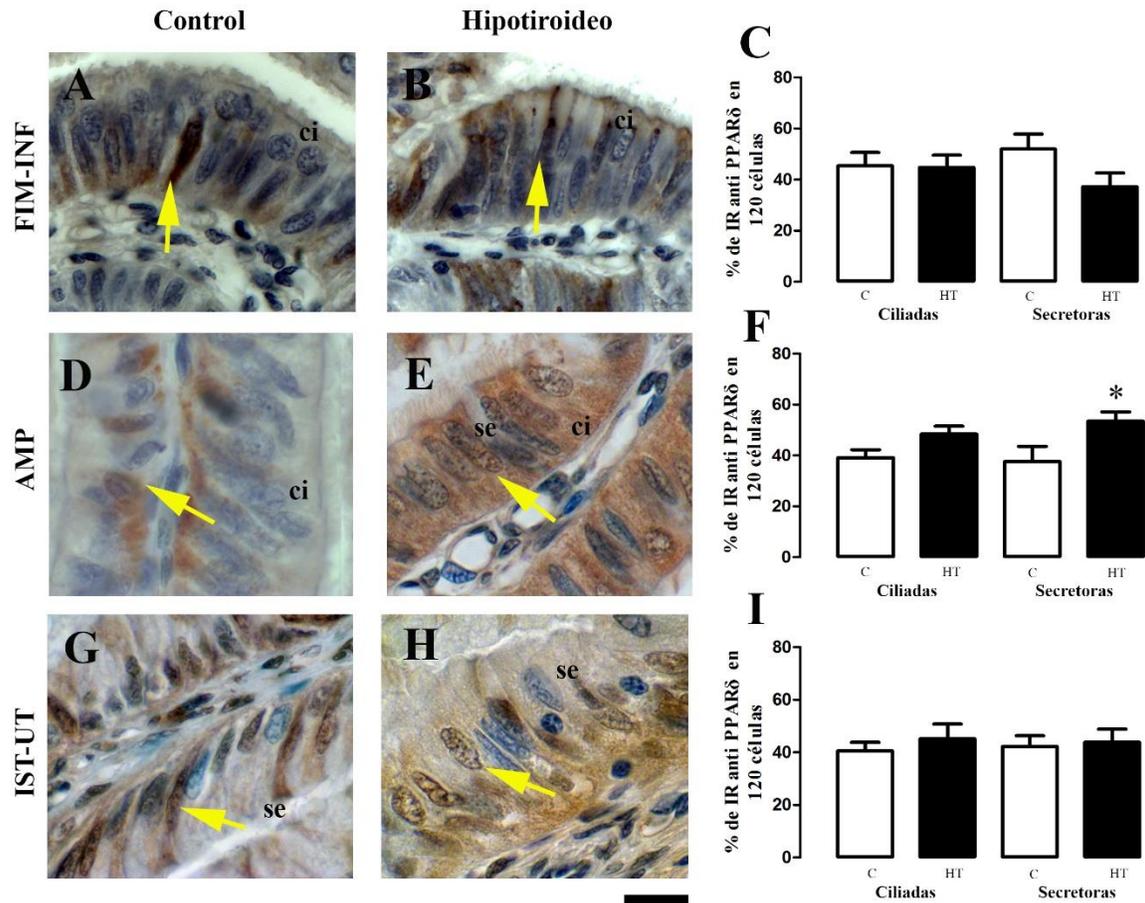
**Figura 6. (Izquierda)** Microfotografías de la región istmo en oviductos teñidos con negro de Sudán en conejas controles (A) y tratadas con metimazol (B); **(Derecha)** Kinyoun de hembras controles (C) e hipotiroideas (D). Abreviaturas: epitelio (e), gotas de lípidos oxidados en negro de Sudán están señalados con flecha amarilla, mientras que los de Kinyoun con flecha negra. La barra representa 20  $\mu$ .



**Figura 7. Arriba. (A)** Expresión de perilipina A (PLIN A) en fracciones totales, citoplasmáticas y nucleares de las diferentes regiones (FIM-INF, AMP e IST-UT) de oviductos controles (c) e hipotiroideos (ht). Se usó la fracción nuclear del ovario como control positivo. Cuantificación de la expresión de PLIN A en fracciones totales **(B)**, citoplasmáticas y nucleares en las diferentes regiones de oviductos de hembras controles (barras blancas) e hipotiroideas (barras negras). C, grupo control; HT, grupo hipotiroideo. Los datos fueron analizados con *t* de Student. Las diferencias estadísticas están representadas con asteriscos \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ . Microfotografías representativas de la inmunolocalización de perilipina A en la región útero-tubal de oviductos controles **(E y G)** e hipotiroideos **(F y H)**. Núcleos positivos están señalados con una flecha negra, citoplasmas positivos están indicados con una flecha amarilla. Abreviaturas: epitelio, ep; músculo liso, ml. La barra representa 20 $\mu$ m.

**PPAR $\delta$ .** Con respecto a la inmunodetección de núcleos positivos a PPAR $\delta$  en animales controles (Fig. 8 A, D y G) e hipotiroideos (Fig. 8 B, E y H), se observó que dicho receptor está presente en todas las regiones del oviducto, tanto en células secretoras como en células ciliadas (Fig. 8). Además, todas las regiones del oviducto mostraron una distribución similar (Fig. 8 C, F e I). No se observaron diferencias aparentes entre células secretoras y ciliadas (Fig. 8C, F e I). Se observó que el citoplasma de células epiteliales era positivo a PPAR $\delta$ , principalmente en las

regiones de la FIM y UT (Fig. 8A, D y G), y en la submucosa fue abundante en todas las regiones (Fig. 8 A, D y G). El hipotiroidismo aumentó la presencia de PPAR $\delta$  en las células secretoras de la región AMP, mientras que las células ciliadas muestran una distribución similar entre grupos (Fig. 8 F). En las células secretoras de la región FIM-INF se mostró una tendencia a disminuir ( $p= 0.07$ , Fig. 8 C), mientras que en células ciliadas de la AMP tendió a aumentar ( $p=0.09$ , Fig. 8 F). En la región IST-UT, el hipotiroidismo no afectó la inmunoreactividad a PPAR  $\delta$  en células ciliadas y secretoras (Fig. 8 I).



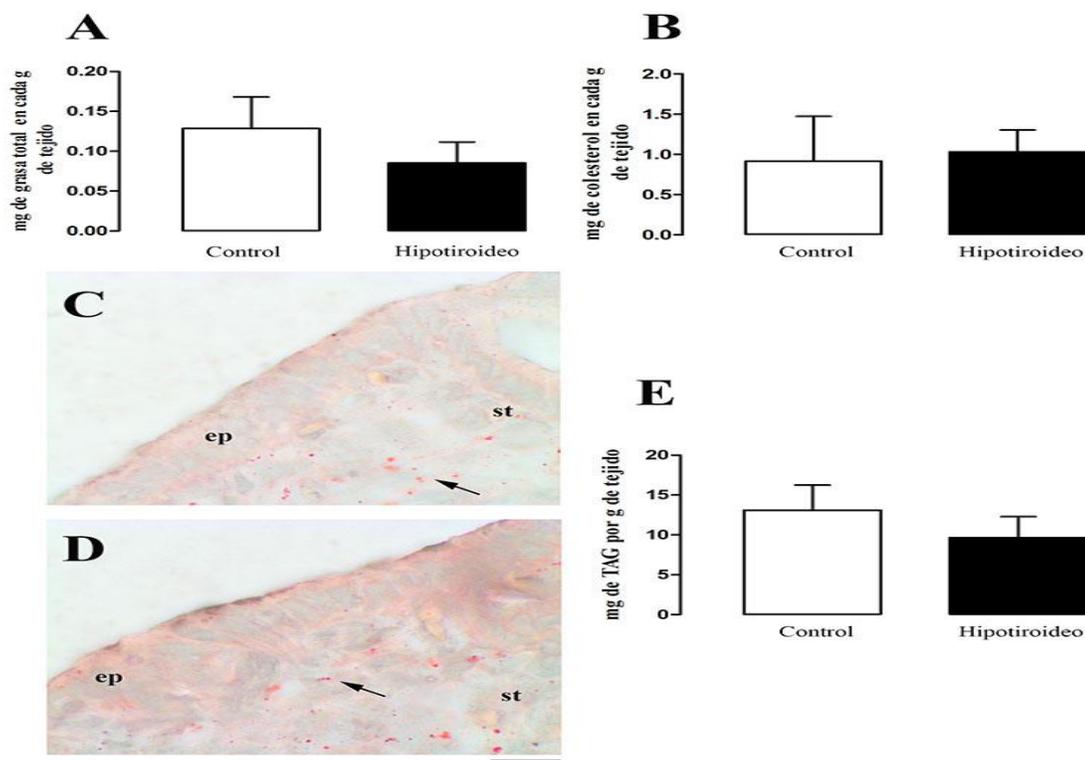
**Figura 8. Izquierda.** Microfotografías a 100x de la localización de núcleos inmunoreactivos para PPAR $\delta$  en las regiones oviductales (FIM-INF, AMP, IST-UT) de grupos controles (**A**, **D** y **G**) e hipotiroideos (**B**, **E** y **H**). Abreviaturas: núcleos inmunoreactivos (flechas amarillas), células secretoras (se) y células ciliadas (ci). Barra= 20  $\mu$ m. **Derecha.** Porcentaje de inmunoreactividad a PPAR $\delta$  para células ciliadas y secretoras en las regiones de FIM-INF (**C**), AMP (**F**) y IST-UT (**I**) de los grupos control (barras blancas) e hipotiroideo (barras negras). Los datos fueron analizados con *t* de Student. Las diferencias estadísticas están representadas con asteriscos \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

### 7.3. Útero

**Lípidos.** La cuantificación de colesterol por el método enzimático mostró que el contenido de grasa total en el útero de animales controles e hipotiroideos fue similar (Fig. 9 A). Así mismo, el contenido de colesterol por el método enzimático se encontró de forma similar en ambos grupos (Fig. 9 B, Tabla 5). Se observaron escasas gotas de triglicéridos con la técnica de rojo oleoso en el epitelio luminal; así como una mayor cantidad en el estroma uterino (Fig. 9 D, Tabla 5). En el epitelio glandular se observaron pocas gotas de triglicéridos, por otra parte, dentro de las glándulas se observó una secreción positiva a rojo oleoso (Tabla 5). Animales controles e hipotiroideos mostraron una distribución similar (Tabla 5); mientras que la secreción de las glándulas disminuyó en el útero de hembras hipotiroideas (Tabla 5). En la cuantificación enzimática, el contenido de triglicéridos (Fig. 9 C) en el útero de animales controles e hipotiroideos fue similar. Gránulos con lípidos oxidados se encontraron abundantes en epitelio luminal y glandular y en estroma (Fig. 10 A). En úteros hipotiroideos, el contenido de lípidos oxidados fue menor en el epitelio glandular y luminal así como en el estroma (Fig. 10 A y B, Tabla 6). En el interior de las glándulas uterinas se encontró una secreción con abundantes lípidos oxidados en las hembras hipotiroideas (Fig. 10 A y B, Tabla 6). En el útero, tanto de animales controles como hipotiroideos, los lípidos oxidados se encontraron escasos mediante el método de Kinyoun (Figs. 10 C y D, Tabla 6), así mismo dentro de las glándulas se encontraron gotas de lipofucsina únicamente en animales hipotiroideos (Tabla 6).

**PLIN A.** Se evaluó la presencia de PLIN A mediante la técnica de western blot en fracciones totales, nucleares y citoplasmáticas de úteros controles e hipotiroideos. Se utilizó la fracción nuclear del ovario como control positivo (Fig. 11 A). Se observó que la PLIN se expresó en mayor cantidad en los extractos citoplasmáticos que en los nucleares (Fig. 11 A). El hipotiroidismo disminuyó la expresión de PLIN en los extractos totales y nucleares (Fig. 9C). En los extractos citoplasmáticos no se observó ningún efecto (Fig. 11 A y C). Se detectó la presencia de PLIN A en los úteros de conejas controles (Figs. 11 A y B) e hipotiroideas (Fig. 11 C y D). La PLIN se encontró en núcleos y citoplasma de epitelio luminal (Fig. 11 A), en epitelio glandular (Fig. 11 B), así como en núcleos de células del estroma (Fig. 11 B). Comparado con

el grupo control PLIN A no estuvo presente en citoplasma de epitelio luminal y glandular y su expresión en núcleos fue menor en ambos epitelios así como en el estroma (Fig. 11 A-D).



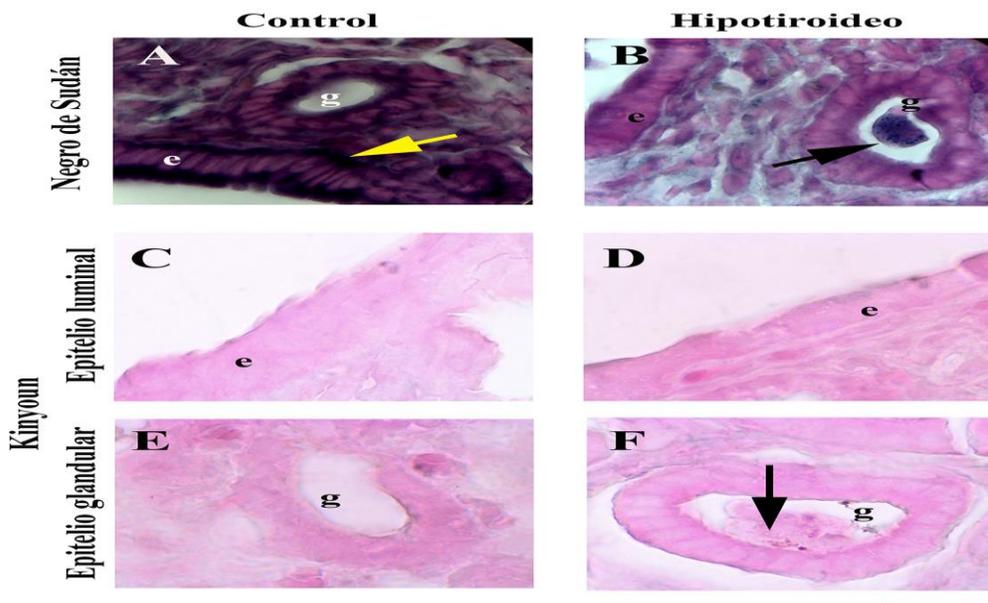
**Figura 9.** Contenido de grasa total (A) y colesterol (B) de úteros de conejas controles (barras blancas) e hipotiroideas (barras negras). Microfotografías de úteros teñidos con rojo oleoso provenientes del grupo control (C) y del grupo hipotiroideo (D). Abreviaturas: epitelio (ep), estroma (st). La barra representa 20  $\mu$ . (E) Contenido de grasa total en úteros medios del grupo control (barras blancas) e hipotiroideo (barras negras). (F). Los datos fueron analizados con *t* de Student.

**Tabla 5.** Cuantificación de triglicéridos en el útero de animales controles (n=3) e hipotiroideos (n=3) por medio de la técnica rojo oleoso. Abundante (+++), Intermedio (++) y escaso (+).

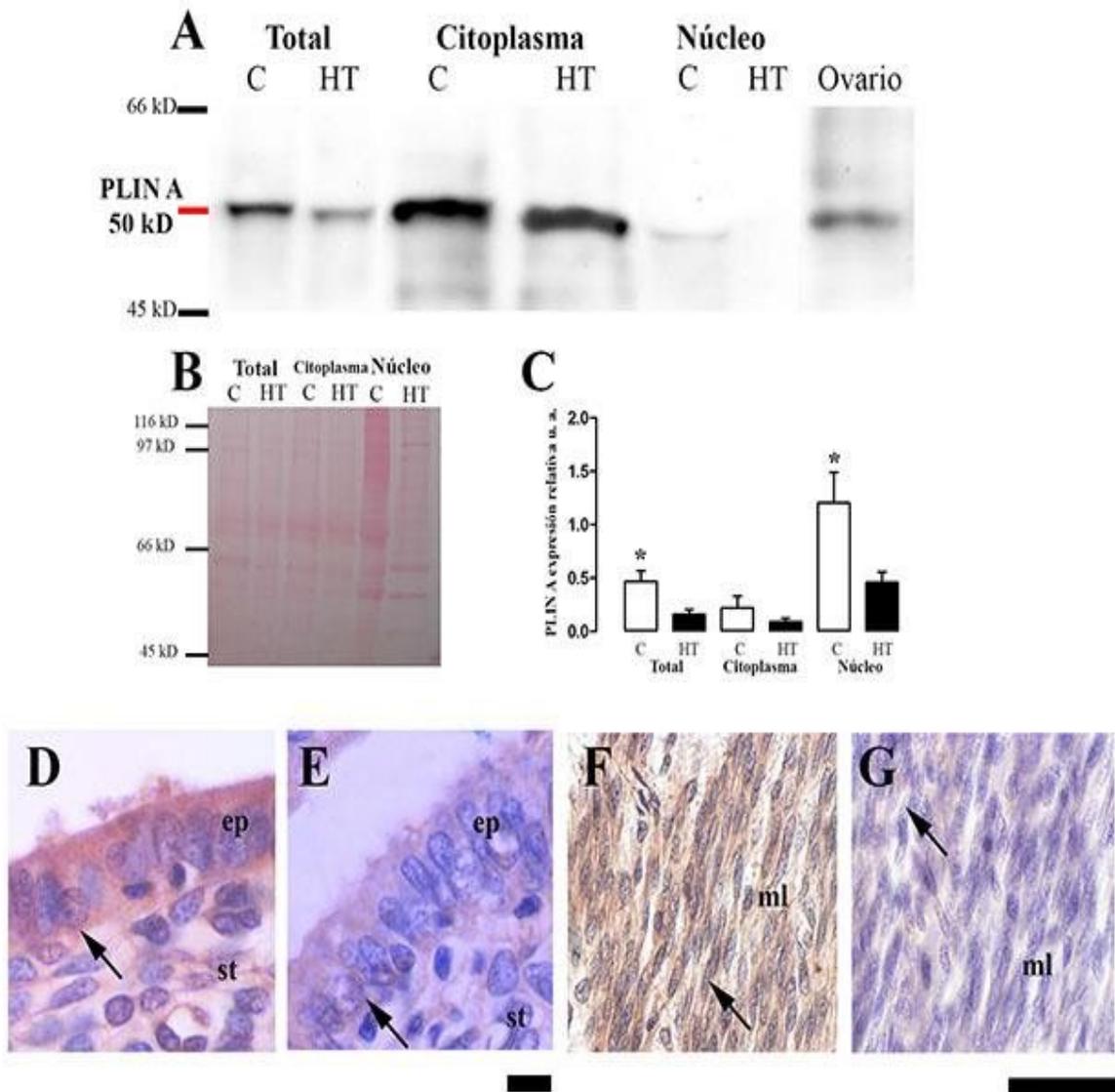
	Rojo oleoso	
	C	HT
Porción apical del epitelio luminal	+	+
Porción basal del epitelio luminal	+	+
Epitelio glandular	+	+
Secreción glandular	+++	++++
Estroma uterino	++	+

**Tabla 6.** Cuantificación de lípidos oxidados en el útero de animales controles (n=6) e hipotiroideos (n=6) con los métodos Negro de Sudán y Kinyoun. Abundante (+++), Intermedio (++) y escaso (+).

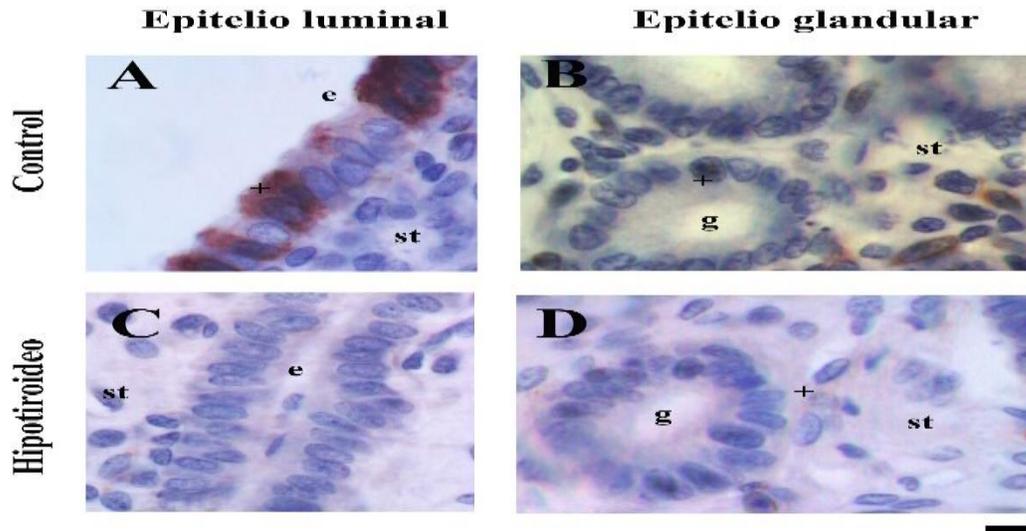
	Negro de Sudán		Kinyoun	
	C	HT	C	HT
Porción apical del epitelio luminal	+++	+	+	+
Porción basal del epitelio luminal	+++	+	+	+
Epitelio glandular	++	+	+	+
Secreción glandular	+	+++	+	++
Estroma uterino	+++	+	+	+



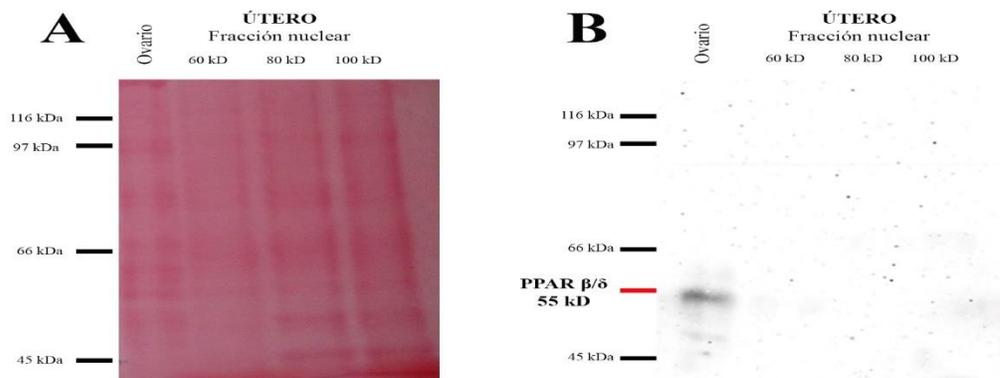
**Figura 10.** Microfotografías de úteros teñidos con negro de Sudán provenientes del grupo control (A) y del grupo hipotiroidico (B), y con el método Kinyoun en animales controles (C y E) e hipotiroidicos (D y F). Epitelio luminal (e), epitelio glandular (g), lípidos oxidados (lo). La barra representa 20  $\mu$ .



**Figura 9. Arriba.** (A) Expresión de perilipina A (PLIN A) en fracciones totales, citoplasmáticas y nucleares de úteros controles e hipotiroideos. Se usó la fracción nuclear de ovario como control positivo. (B) Membrana teñida con rojo de Ponceu donde se observó el total de proteínas que fueron usadas como control de carga en fracciones totales, citoplasmáticas y nucleares de úteros controles e hipotiroideos. Cuantificación de la expresión de PLIN A en fracciones totales, citoplasmáticas y nucleares (C) en úteros de hembras controles (barras blancas) e hipotiroideas (barras negras). C, grupo control; HT, grupo hipotiroideo; RP, rojo de Ponceau. Los datos fueron analizados con *t* de Student. Las diferencias estadísticas están representadas con asteriscos \*  $p \leq 0.05$ , ns=diferencias no significativas. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de PLIN A en úteros controles (D y F) e hipotiroideos (E y G). Núcleos positivos están señalados con una flecha negra, citoplasmas con flecha amarilla; estroma (st); epitelio luminal (e) y epitelio glandular (g). La barra representa 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12.** Microfotografías a 100x de la inmunolocalización de PPAR $\delta$  en úteros de hembras controles (A y B) e hipotiroides (C y D). El símbolo + representa los núcleos inmunoreactivos a PPAR  $\delta$ ; epitelio (e) estroma (st), glándulas uterinas (g). La barra representa 20  $\mu$ m.



**Figura 13.** (A) Membrana teñida con rojo de Ponceu donde se observa el total de proteínas que fueron usadas como control de carga en nucleares del útero control. Se usó la fracción nuclear del ovario como control positivo. (B) Expresión de PPAR  $\delta$  en nucleares de útero control.

**PPAR $\delta$ .** Se han encontrado núcleos inmunoreactivos en células del epitelio luminal (Fig. 12 A) y glandular (Fig. 12 B), así como en el estroma uterino (Fig. 12 A). En comparación con los animales controles, las hembras hipotiroides tuvieron una aparente menor inmunoreactividad de núcleos del epitelio luminal uterino (Figs. 12 A y C), así como en las

glándulas uterinas (Figs. 12 B y D). No fue posible realizar el conteo debido al tipo de marcaje que nos dieron dos anticuerpo que probamos (1 de Santa Cruz y otro de Abcam). Dicho marcaje era tenue y granuloso en algunos citoplasmas como se puede apreciar en la Fig. 12. A pesar de que no se realizó un conteo, se observó que los fibroblastos presentes en el estroma de útero hipotiroideos fueron más positivos a PPAR $\delta$  que en aquellos pertenecientes al grupo control (Figs. 12 C y D). Lo mismo ocurrió con las células inmunitarias (macrófagos, linfocitos y neutrófilos; Figs. 12 B y D). Mediante la técnica de western blot se intentó cuantificar la expresión de PPAR $\delta$ , fueron utilizados extractos nucleares en concentraciones ascendentes de útero control (Fig. 13A), el ovario fue utilizado como control positivo. Se observó que en las diferentes concentraciones de proteína no se reveló ninguna banda (Fig. 13 B).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Ovario

En el ovario, encontramos que el hipotiroidismo disminuyó la expresión de PLIN A en las fracciones totales y citoplasmáticas. Aunque el contenido de grasa total fue similar entre ambos grupos; el contenido de triglicéridos fue menor en los ovarios hipotiroideos. Estos resultados sugieren que en esta estructura la disminución del contenido de triglicéridos se asocia con la disminución de PLIN (Zhang y cols. 2014). Esta disminución en el contenido de triglicéridos podría deberse a un aumento en la lipólisis lo que generaría una mayor cantidad de ácidos grasos libres. Esto a su vez, permitiría un aumento en la beta-oxidación y en la generación de energía, lo cual es necesario para la meiosis y maduración folicular (Sánchez-Lazo y cols. 2014). Por otro lado, se encontró un aumento en el contenido de colesterol, el cual podría ser esterificado o no esterificado, y una mayor presencia de lípidos oxidados en los ovarios de los animales hipotiroideos. Dado que previamente ya evidenciamos que el hipotiroidismo aumenta los niveles de colesterol en sangre (Rodríguez-Castelán y cols. 2017a), esta podría ser la posible explicación de su aumento en el ovario. Curiosamente, el aumento en el contenido de colesterol en los folículos determina la calidad del ovocito y se relaciona positivamente con su concentración en suero (Leroy y cols. 2004). La mayor cantidad de colesterol en el ovario

explica el aumento en el contenido de progesterona por una mayor actividad enzimática de P450scc y 3 $\beta$  HSD (Chen y cols. 2003). Considerando que en un estudio previo encontramos que el hipotiroidismo disminuye la expresión de aromatasa en el ovario (Rodríguez-Castelán y cols. 2017b), es posible pensar que además se encuentra aumentada la testosterona. Aunque nosotros previamente medimos los niveles de testosterona circulante sin encontrar cambios por el hipotiroidismo (Anaya-Hernández y cols. 2015), es posible que a nivel ovárico la concentración de este esteroide cambie. Si así fuera, es sabido que la testosterona es capaz de modular al enzima ácido graso sintasa y a los transportadores de glucosa GLUT4 durante la fase lútea (Varlamov y cols. 2013), lo que generaría una mayor concentración de triglicéridos en el ovario. Por otra parte, previamente hemos descrito la presencia de receptores que unen sales biliares como es el receptor X de farnesoides (Anaya-Hernández y cols. 2014), por lo que probablemente el metabolismo de sales biliares se encuentre aumentado, generando su posible almacenamiento (Smith y cols. 2009). Respecto a los lípidos oxidados, su mayor presencia favorece el estrés oxidativo y la lipotoxicidad de las células. Así, el hipotiroidismo disminuye el estrés oxidativo en folículos en grados tempranos de maduración (primarios y secundarios) pero aumenta en folículos a término, generando óvulos de baja calidad (Meng y cols. 2016). Todo esto podría explicar por qué el hipotiroidismo disminuye la talla de los folículos preantrales y antrales (Rodríguez-Castelán y cols. 2017b), lo cual se ha relacionado con mala calidad de los folículos (Dadarwal y cols. 2015). Además, los ácidos grasos no esterificados (sin convertirse en triglicéridos) pueden originar atresia folicular (Van Hoeck y cols. 2014).

El hipotiroidismo también disminuyó la expresión de PPAR $\delta$  en el ovario, tal como se ha visto en otros tejidos como el hígado (Graselli y cols. 2011), lo que sugiere que la deficiencia de hormonas tiroideas disminuye la expresión de este receptor. Si consideramos el aumento de los lípidos oxidados observado en los ovarios de conejas hipotiroideas, se ha mostrado que la administración de 20(S)-hidroxicolesterol inhibe la expresión PPAR $\gamma$  en células de hueso (Kim y cols. 2007). Es decir, un aumento en el contenido de oxisteroles (aun no cuantificado) podría promover la reducción en la expresión de PPAR $\delta$ . Ya sea que la reducción de este receptor haya sido producida de manera directa por las hormonas tiroideas o indirecta a través de los oxisteroles, este hecho podría alterar la señalización y almacenamiento de los ácidos grasos en el ovario, como ya se ha mencionado para el hígado (Graselli y cols. 2011). A este respecto, se

ha descrito que el PPAR $\delta$  y  $\gamma$  regulan diversos procesos como son la maduración de los folículos, ovulación y esteroidogénesis (Vélez y cols. 2013). Así mismo, el PPAR $\alpha$  favorece la síntesis de PLIN 2 en hígado (Grasselli y cols. 2011), con lo que probablemente la disminución de PPAR $\delta$  en el ovario esté relacionada con la disminución en la síntesis de perilipina y con el almacenamiento de triglicéridos. Considerando otros resultados de nuestro laboratorio, donde los animales hipotiroideos presentan un retardo en la maduración folicular (Rodríguez-Castelán y cols. 2017b), es posible que la afectación en la maduración folicular que induce el hipotiroidismo pudiera deberse a los cambios observados tanto en el contenido de lípidos como en la expresión del PPAR $\delta$ . Aunque este receptor ha sido escasamente estudiado, la activación del isotipo de PPAR $\gamma$  regula la expresión de la aromatasa, teniendo efecto en la esteroidogénesis ovárica y modulando la proliferación de los tejidos y la angiogénesis en ovario (Komar 2005).

## 8.2 Oviducto

A diferencia del ovario, el oviducto parece ser una estructura poco dependiente del contenido de lípidos. Además, el oviducto es una estructura compleja con varios tipos de células (ciliadas, secretoras, y musculares) y varias regiones, lo cual diversifica aún más las posibilidades de acción de los lípidos y el PPAR $\delta$ . Si dividimos la discusión por regiones del oviducto considerando la función que cada una tiene, podemos ver que la concentración de triglicéridos, colesterol y PLIN es mayor en las regiones FIM-INF (captura al ovocito) y en el AMP (donde ocurre la fertilización), mientras que en las regiones IST-UT (donde ocurre la capacitación espermática) fue menor. Aunque algunos estudios *in vitro* han evidenciado que el contenido de triglicéridos varía entre células secretoras y ciliadas (Killian y cols. 2011), nosotros no lo observamos. El hipotiroidismo disminuyó la expresión de PLIN en las fracciones citoplasmáticas de la región IST-UT, lo cual podría relacionarse con el aumento en el contenido de triglicéridos observado en esta misma región, debido a que probablemente está disminuida su hidrólisis. Así mismo, la expresión de PLIN se encuentra disminuida en los núcleos de las regiones AMP y IST-UT, con lo que su síntesis está alterada (Brasaemle y cols. 2014). Por otra parte, el colesterol se encontró disminuido en la región FIM-INF, lo cual podría deberse a tasa de oxidación incrementada. Estos cambios en la acumulación de lípidos en la región de FIM-

INF y AMP podría afectar el transporte del huevo y su fertilización (Nahar y cols. 2013). Mientras que en las regiones de IST y UT podría afectar la capacitación espermática (Huang y cols. 2016). A este respecto, se ha descrito que los triglicéridos les brindan más capacidad a los espermatozoides para poder fertilizar (Jiang y cols. 2001).

Los gránulos de lípidos oxidados se encontraron principalmente en la submucosa y en el epitelio apical en todas las regiones del oviducto de animales controles. El hipotiroidismo alteró de manera diferencial el contenido de lipofucsina dependiendo de la región del oviducto. Así, los animales hipotiroideos mostraron un mayor número de gránulos de lípidos oxidados en la FIM, siendo menor en el epitelio y mayor en la submucosa. No se observaron cambios en la presencia de gránulos de lipofucsina en el epitelio o submucosa del AMP. El aumento de lípidos oxidados en la FIM explica la disminución de colesterol observada, por lo que se sugiere que se está metabolizando, probablemente convirtiéndose a oxisterol o prostaglandinas, lo que podría explicar la infiltración de células inmunes previamente observada (Poli y cols. 2013; Rodríguez-Castelán y cols. en proceso b). Por su parte, los lípidos oxidados, como la ceramida, presentes en el moco oviductal del AMP mejoran la captación del calcio permitiendo la reacción acrosomal (Petcoff y cols. 2008). Mientras que altas cantidades de ceramida inducen apoptosis en la vida media del huevo fecundado (Petcoff y cols. 2008). Además, modificaciones en el colesterol puede ser tóxico para el espermatozoide, disminuyendo su motilidad y la respuesta acrosomal (Butts y cols. 2015). Además, el exceso de lípidos oxidados podría afectar la motilidad y la respuesta acrosomal de los espermatozoides (Morakinyo y cols. 2011). Los niveles de antioxidantes así como de ROS en el oviducto deben estar en niveles óptimos ya que regulan la motilidad del espermatozoide así como su capacidad de fusionarse con el óvulo en las regiones AMP e IST, por lo que una alta cantidad de estrés oxidativo disminuye la capacidad de fertilización (Wojsiat y cols. 2017); a este respecto si bien no se ha medido estrés oxidativo, los lípidos oxidados son una manera indirecta de medirlo.

La expresión del PPAR $\gamma$  en el oviducto de rana fue ya descrito (Liu y cols. 2014). Ahora, nosotros estamos mostrando la presencia del PPAR $\delta$  en el oviducto de la coneja. Teniendo una localización similar en células ciliadas y secretoras en todas las regiones. Las variaciones antes mencionadas podrían estar relacionadas con las funciones reproductivas propias de cada región

(Pedrero-Badillo y cols. 2013; Liu y cols. 2014). Los resultados encontrados en el presente estudio podrían relacionarse con la mayor talla de las células epiteliales (Anaya-Hernández y cols. 2015) y los cambios en la infiltración de las células inmunes (Rodríguez-Castelán y cols. en proceso b) observadas previamente en animales hipotiroideos. A este respecto, PPAR $\delta$  señala y modula la supervivencia, activación y diferenciación del sistema inmunitario, particularmente de macrófagos y linfocitos (Clark 2002). La realización de más estudios es necesario para establecer cuáles podrían ser las funciones específicas de este receptor en el oviducto.

### 8.3 Útero

En los úteros controles se encontraron escasas gotas de triglicéridos, mientras que en los úteros hipotiroideos se encontraron algunas gotas en el estroma y cercanas a las glándulas uterinas. Esto muestra que, aunque el contenido de triglicéridos no es afectado por el hipotiroidismo, la distribución de las gotas en las diferentes capas de tejidos y tipos celulares sí. Esto es interesante dada la función que cada capa de tejido y tipo de célula tiene. Particularmente, el estroma y las glándulas uterinas participan en la decidualización, en la nutrición temprana de los embriones, así como en la señalización de células inmunes, principalmente inhibiéndolas (Blanks y Brossen 2012). Por otra parte, la expresión de PLIN en el citoplasma de úteros controles e hipotiroideos fue similar con lo cual se explica que el almacenamiento de triglicéridos y colesterol no se haya encontrado alterado. El contenido de PLIN en núcleos se encontró disminuido, por lo que, aunque aún no se observan cambios en la función, se observaron modificaciones en la síntesis. Aunado a lo anterior se ha descrito ampliamente que las funciones de los lípidos en el endometrio son a través de fosfolípidos (Desvasagayam 1986), mientras que enzimas en esta vía metabólica como fosfolipasa A y peroxidasa con reguladas por receptores como el de progesterona y estrógenos  $\alpha$ , los cuales son modificados por el hipotiroidismo (datos no mostrados). La disminución de lípidos oxidados podría indicar que los niveles de prostaglandinas se encuentran disminuidos ya que el hipotiroidismo disminuye la actividad de ciclooxigenasa 2 (Silva y cols. 2013), de tal manera que los fosfolípidos generan lipoperoxidación en el endometrio uterino (Kong y cols. 2015).

Dado que enzimas antioxidantes como CAT, SOD y GHS están disminuidas (Kong y cols. 2015), el hipotiroidismo en el útero podría estar generando estrés oxidativo. En apoyo a estos resultados, el epitelio glandular de conejas hipotiroideas tuvo poca presencia de gránulos con lípidos oxidados. Por el contrario, el epitelio luminal tuvo más. Además de prostaglandinas, otros lípidos oxidados como ceramidas se podrían estar disminuyendo, generando apoptosis (Petcoff y cols. 2008).

Aunque no se pudo realizar la técnica de western blot, con un análisis descriptivo por medio de inmunohistoquímica se observó que el hipotiroidismo disminuye el número de núcleos positivos para PPAR $\delta$  en epitelio y en las glándulas uterinas. Al igual que las ceramidas, los PPAR $\delta$  han sido relacionados con un bloqueo de la apoptosis y un aumento en la proliferación celular del útero (Huang y cols. 2008). Así, una relación entre el contenido de lípidos oxidados y la presencia de PPAR $\delta$  podría darse en el epitelio luminal del útero. A este respecto, se sabe que la activación de PPAR $\delta$  por sus agonistas (L-165041, GW501516 o GW0742) promueve la oxidación de ácidos grasos de cadena larga en células cardíacas de la rata (Gilde y cols. 2003; Cheng y cols. 2004). Además, la activación de PPAR $\delta$  también disminuye la inflamación de cardiomiocitos (Ding y cols. 2006). De manera que su aumento en el epitelio luminal del útero podría ser en respuesta al proceso inflamatorio observado en ratas con hipotiroidismo farmacológico (Inuwa y Williams 1996). Aunado a lo anterior, se ha evidenciado que en epitelio uterino el PPAR $\delta$  aumenta conforme aumentan los niveles de progesterona favoreciendo la implantación. Sin embargo, su aumento antes de tiempo podría impedir la implantación y favorecer abortos (Froment y cols. 2006). De manera que, de acuerdo con los trabajos antes descritos, el útero de animales hipotiroideos al sufrir de inflamación mostraría un aumento de PPAR $\delta$ .

## 9. CONCLUSIONES

1. El hipotiroidismo reduce el contenido de PLIN y triglicéridos en el ovario de conejas. Al mismo tiempo que aumenta la presencia de colesterol y gránulos oxidados (ceramidas, oxiesteroles). Estos cambios en el contenido de lípidos fueron asociados con una menor expresión de PPAR $\delta$ , lo que podría afectar la esteroidogénesis, desarrollo folicular y la ovulación. Dichos efectos podrían explicar la reducción en la expresión de aromatasas y menor talla de folículos, observadas previamente en animales hipotiroideos.
2. El hipotiroidismo afecta de manera diferencial el contenido de PLIN y triglicéridos, la presencia de colesterol y lípidos oxidados y la expresión de PPAR $\delta$  en las regiones del oviducto de la coneja, lo cual podría relacionarse con las funciones que cada región tiene. Lo anterior podría relacionarse con la mayor talla de las células epiteliales y los cambios en la infiltración de las células inmunes observadas previamente en animales hipotiroideos.
3. El hipotiroidismo afecta el contenido de PLIN y lípidos oxidados en el útero de conejas, lo que podría relacionarse con el epitelio proliferativo desordenado y sangrados uterinos anormales observados en mujeres con hipotiroidismo.

## 10. PERSPECTIVAS

### Ovario

Dado que el hipotiroidismo aumentó el contenido de colesterol en el ovario y tenemos el antecedente de aromatasa disminuida (Rodríguez-Castelán y cols. 2017b), se sugiere que se evalúe el contenido de testosterona y estradiol en el ovario junto con la actividad enzimática de  $17\beta$  HSD. Otras posibles rutas del metabolismo de colesterol surgen como un posible blanco del hipotiroidismo en el ovario como son la formación de sales biliares (Watanabe y cols. 2006, Smith y cols. 2009), su activación a través de receptores específicos como el receptor X de farnesoides (que ha sido descrita su inmunolocalización en ovario) (Anaya-Hernández y cols. 2014). Así mismo, la duda con respecto a de dónde surge el colesterol encontrado sería resuelta si se miden receptores de LDL que son los que internalizan el colesterol (Brasaemle y cols. 2014), esto en caso de que fuera como resultado del aumento en los niveles séricos (Rodríguez-Castelán y cols. 2017a); o medir enzimas como 3-hidroxi-metilglutaril-CoA reductasa y escualeno ciclasa para verificar su síntesis de Novo. Debido a que se encontró disminuida la expresión de PLIN y el contenido de triglicéridos, sería adecuado medir la actividad de la lipasa sensible a hormona para ver si es que probablemente en realidad no se están almacenando los triglicéridos o es que se están hidrolizando rápidamente (Schuldiner y Bohner 2017). En el presente trabajo encontramos que la expresión de PPAR $\delta$  está disminuida, y lo relacionamos con otras alteraciones en el almacenamiento de lípidos, para verificar nuestra propuesta, sería importante medir la actividad de este receptor y verificar por medio de ensayos de transcripción los posibles blancos en el ovario de la coneja.

### Oviducto

A diferencia del ovario, encontramos disminuido el colesterol en la región fimbria-infundíbulo, por lo que se sugiere al igual que en el ovario encontrar la fuente de alteración por: a) disminución de LDLR, b) síntesis de Novo, c) aumento de esteroidogénesis y d) síntesis de sales biliares. Además, medir otras proteínas de almacenamiento de lípidos como sería la adipofilina, que se ha relacionado con alteraciones en el almacenamiento de colesterol en líneas celulares

de macrófagos (Qiao y cols. 2015). En cuanto al aumento de triglicéridos encontrado en las regiones AMP e IST-UT sería recomendable medir FAT/CD36, con el antecedente de que el hipotiroidismo lo disminuye en músculo (Lombardi et al. 2012), así mismo, enzimas que regulen su hidrólisis como la lipasa sensible a hormonas o acil transferasas que modulen su síntesis a través de ácidos grasos, y que son modificadas por el estado tiroideo (Cao y cols. 2009). En todas las regiones encontramos aumentado el contenido de lípidos oxidados por lo que sería conveniente analizar los que se encuentran más frecuentemente y ejercen funciones importantes en el oviducto como prostaglandinas y oxisteroles (Huang y cols. 2018); así mismo se sugiere medir el estado oxidativo de este tejido, porque este almacenamiento de lípidos podría estar generando lipoperoxidación como en el ovario (Meng y cols. 2016) y útero (Kong y cols. 2015). En cuanto a la inmunolocalización del PPAR $\delta$  y debido a ciertas complicaciones en el conteo, se sugiere que los datos sean verificados por medio de western blot.

## Útero

De acuerdo con los resultados obtenidos y dado al nulo efecto del hipotiroidismo sobre el almacenamiento de colesterol y triglicéridos se sugiere se evalúen otros lípidos que tengan una mayor importancia en la fisiología uterina como los fosfolípidos (Desvasagayam 1986). Encontramos que la cantidad de perilipina sólo es alterada a nivel nuclear, sin embargo sería adecuado medir la lipasa sensible a hormonas con la finalidad de ver si es que los triglicéridos almacenados se están hidrolizando o no. Así mismo y dada la relevancia que tienen las prostaglandinas en la decidualización, angiogénesis y señalización del sistema inmune (Blesson 2014), sería importante evaluar si la disminución de lípidos oxidados es a través de estas o de otros eicosanoides. Al igual que en el ovario, se sugiere medir la actividad de ciclooxigenasa 2 y peroxidasa. Dado que tuvimos dificultades para cuantificar la expresión de PPAR $\delta$ , sería importante tratar de estandarizar nuevamente con modificaciones en la técnica (cargar mayor concentración de proteína o de anticuerpo) o en su defecto conseguir un nuevo anticuerpo que detecte este receptor por western blot.

## 11. REFERENCIAS

- Aghajanova L**, Straveus A, Lindeberg M, Landgren BM, Sparre LS, Hovatta O. 2011. Thyroid-stimulating hormone receptor and thyroid hormone receptors are involved in human endometrial physiology. *Fertil Steril*. 95: 230–237.
- Ajmani NS**, Sarbhai V, Yadav N, Paul M, Ahmad A, Ajmani AK. 2016. Role of thyroid dysfunction in patients with menstrual disorders in tertiary care center of allied city of Delhi. *J Obstet Gynaecol India*. 66:115-9.
- Anaya-Hernández A**, Méndez-Tepepa M, Hernández-Aragón LG, Pachecho P, Martínez-Gómez M, Castelán F, Cuevas E. 2014. Farnesoid X receptor immunolocalization in reproductive tissues of adult female rabbits. *Acta Histochem*. 116:1068-74.
- Anaya-Hernández A**, Rodríguez-Castelán J, Nicolás L, Martínez-Gómez M, Jiménez-Estrada I, Castelán F, Cuevas E. 2015. Hypothyroidism affects differentially the cells size of epithelial cells among oviductal regions of rabbits. *Reprod Domest Anim*. 50:104-11.
- Anzaldúa SR**, Camacho-Arroyo I, Cerbón MA. 2002. Histomorphological changes in the oviduct epithelium of the rabbit during early pregnancy. *Anat Histol Embryol*. 31:308-12.
- Babenko NA**. 2005. Long- and short-term effects of thyroxine on sphingolipid metabolism in rat liver. *Med Sci Monit*. 11:BR131-8.
- Baerwald A**, Vanden Brink H, Hunter C, Beuker D, Lim H, Lee CH, Chizan D. 2017. Age-related changes in luteal dynamics: preliminary associations with antral follicular dynamics and hormone production during the human menstrual cycle. *Menopause*. En prensa. Doi: 10.1097/GME.0000000000001021.
- Barbosa AD**, Siniossoglou S. 2017. Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 1864:1459-68.
- Bazer FW**, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K. 2010. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy. *Mol Hum Reprod*. 16:135-52.
- Beck-Peccoz P**, Rodari G, Giavoli C, Lania A. 2017. Central hypothyroidism – a neglected thyroid disorder. *Nat Rev Endocrinol*. 13:588-98.

**Bellver J**, Melo MA, Bosch E, Serra V, Remohí J, Pellicer A. 2007. Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. *Fertil Steril*. 88:446-51.

**Blanks AM**, Brosens JJ. 2012. Progesterone action in the myometrium and decidua in preterm birth. *Facts Views Vis Obgyn*. 4:188-94.

**Blennemann B**, Moon YK, Freake HC. 2011. Tissue-specific regulation of fatty acid synthesis by thyroid hormone. *Endocrinology*. 130:637-43.

**Brasaemle D**. 2014. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*. 48:2547-59.

**Burton GJ**, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. 2002. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 87:2954-9.

**Butts IA**, Baeza R, Stottrup JG, Krüger-Johnsen M, Jacobsen C, Pérez L, Asturiano JF, Romkiewicz J. 2015. Impact of dietary fatty acids on muscle composition, liver lipids, milt composition and sperm performance in European eel. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 183: 87-96.

**Brunk UT**, Terman A. 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cells function. *Free Radic Biol Med*. 33:611-9.

**Bylander A**, Lind K, Goksör M, Billig H, Larsson DJ. 2013. The classical progesterone receptor mediates the rapid reduction of fallopian tube ciliary beat frequency by progesterone. *Reprod Biol Endocrinol*. En prensa. Doi: 10.1186/1477-7827-11-33.

**Cao J**, Shen W, Chan Z, Shi Y. 2009. ALCAT1 is a polyglycerophospholipid acyltransferase potently regulated by adenine nucleotide and thyroid status. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296:E647-53.

**Chan SH**, Chu PM, Kao CL, Cheng YH, Hung CH, Tsai KL. 2016. Oleic acid activates MMPs up-regulation through SIRT1/PPAR- $\gamma$  inhibition: a probable linkage between obesity and coronary arterial disease. *J Biochem*. 160:217-225.

- Chang EM**, Kim YS, Won HJ, Yoon TK, Lee WS. 2014. Association between sex steroids, ovarian reserve, and vitamin D levels in healthy nonobese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 99:2526-32.
- Chehaibi K**, Cedó L, Metso J, Palomer X, Santos D, Quesada H, Naceur Slimane M, Wahli W, Julve J, Vázquez-Carrera M, Jauhainen M, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. 2015. PPAR- $\beta/\delta$  activation promotes phospholipid transfer protein expression. *Biochem Pharmacol.* 94:101-8.
- Chen JJ**, Wang SW, Chien EJ, Wang PS. 2003. Dose effect of propylthiouracil on progesterone release in rat granulosa cells. *Br J Pharmacol.* 139:1564-70.
- Cheng L**, Ding G, Quin Q, Xiao Y, Woods D, Chen YE, Yang Q. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor delta activates fatty acid oxidation in cultured neonatal and adult cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 313:277-86.
- Chinetti G**, Fruchart JC, Staels B. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr Opin Lipidol.* 14:459-68.
- Chu K**, Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM. 2006. Stearoyl coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol.* 26:6786-98.
- Clark RB**. 2002. The role of PPARs in inflammation and immunity. *J Leukoc Biol.* 71:388-400.
- Covington JD**, Bajpeyi S, Moro C, Tchoukalova YD, Ebenezer PJ, Burk DH, Ravussin E, Redman LM. 2015. Potential effects of aerobic exercise on the expression of perilipin 3 in adipose tissue of women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Eur J Endocrinol.* 172:47-58.
- Cui Y**, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, González FJ, Flaws J, Wagner KU, Hennighausen L. 2002. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) Does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J Biol Chem.* 277:17830-17835.

- Dadarwal D**, Adams GP, Hyttel P, Brogliatti GM, Caldwell S, Singh J. 2015. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. *Reprod Biol Endocrinol.* 13:124.
- Dal Bosco A**, Rebollar PG, Boiti C, Zerani M, Castellini C. 2011. Ovulation induction in rabbit does: current knowledge and perspectives. *Anim Reprod Sci.* 129:106-17.
- Darras VMn**, Houbrechts AM, Van Herck SL. 2015. Intracellular thyroid hormone metabolism as a local regulator of nuclear thyroid hormone receptor-mediated impact on vertebrate development. *Biochim Biophys Acta.* 1849:130-41.
- Davis BK**. 1980. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization of cholesterol. *Arch Androl.* 5:249-54.
- DeAngelis AM**, Roy-O'Reilly M, Rodriguez A. 2014. Genetic alterations affecting cholesterol metabolism and human fertility. 91:117.
- Deng R**, Yang D, Yang J, Yan B. 2006. Oxysterol 22(R)-hydroxycholesterol induces the expression of the bile salt export pump through nuclear receptor farnesoid X receptor but not liver X receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 317:317-25.
- Desvasagayam TP**. 1986. Lipid peroxidation in rat uterus. *Biochim Biophys Acta.* 876:507-14.
- Ding G**, Cheng L, Qin Q, Frontin S, Yang Q. 2006. PPAR delta modulates lipopolysaccharide-induced TNFalpha inflammation signaling in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 40:821-8.
- Dunning KR**, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. 2010. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod* 83:909-918.
- Dupont J**, Chabrolle C, Ramé C, Tosca L, Coyral-Castel S. 2008. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors, adenosine monophosphate-activated kinase, and adiponectin in ovary. *PPAR Res.* 2008:176275.
- Ferguson EM**, Leese HJ. 2006. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev.* 73:1195–201.

**Froment P**, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J, Monget P. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J Endocrinol.* 189:199-209.

**Gagnon A**, Antunes TT, Pongsuwan P, Gavin C, Lochnan HA, Sorisky A. 2010. Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels in vivo. *Metabolism.* 59:547-53.

**Ganie MA**, Laway BA, Wani TA, Zargar MA, Nisar S, Ahamed F, Khurana ML, Ahmed S. 2011. Association of subclinical hypothyroidism and phenotype, insulin resistance, and lipid parameters in Young women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 95:2039-43.

**Ghavideldarestani M**, Atkin SL, Leese HJ, Sturmey RG. 2016. Expression and function of transient receptor potential channels in the female bovine reproductive tract. *Theriogenology.* 86:551-61.

**Gibson GA**, Greaves E, Critchley HOD, Saunders PTK. 2015. Estrogen-dependent regulation of human uterine natural killer cells promotes vascular remodeling via secretion of CCL2. *Hum Reprod.* 30:1290-301.

**Gilde AJ**, van del Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPAR beta/delta, but not gamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res.* 92:518-24.

**Goldstein JL**, Brown MS. 2009. History of discovery: the LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:431-8.

**Graselli E**, Voci A, Canesi L, De Matteis R, Goglia F, Cioffi F, Fugassa E, Gallo G, Vergani L. 2011. Direct effects of iodothyronines on excess fat storage in rat hepatocytes. *J Hepatol.* 54:1230-6.

**Gryciel-Górniak B**. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional clinical implications – a review. *Nutr J.* 13:17.

- Grippo AA**, Anderson SH, Chapman DA, Henault MA, Killian GJ. 1994. Cholesterol, phospholipid and phospholipase activity of ampullary and isthmic fluid from the bovine oviduct. *J Reprod Fertil.* 102:87-93.
- Gulbins E**. 2003. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol Res.* 47:393-9.
- Gunin AG**, Emelianov V, Tolmache AS, Tolmacheva A. 2002. Effect of prolactin and dopaminergic drugs on uterine response to chronic estrogen exposure. *J Endocrinol.* 172:61-9.
- Hapon MB**, Motta AB, Ezquer M, Bonafede M, Jahn GA. 2007. Hypothyroidism prolongs corpus luteum function in the pregnant rats. *Reproduction.* 133:197-205.
- Hashemitabar M**, Bahmanzadeh M, Mostafaie A, Orazizadeh M, Farimani M, Nikbakht R. 2014. A proteomic analysis of human follicular fluid: comparison between younger and older women with normal FSH levels. *Int J Mol Sci.* 15:17518-40.
- Hayama SI**, Kamiya S, Yamazaki A, Daigo M, Nigi H. 1992. Lipofuscin in the corpus luteum of macaque ovaries. *Primates.* 33:133-7.
- Henault MA**, Killian GJ. 1993a. Synthesis and secretion of lipids by bovine oviduct mucosal explants. *J Reprod Fertil.* 98:431-8.
- Henault MA**, Killian GJ. 1993b. Neutral lipid droplets in bovine oviductal epithelium and lipid composition of epithelial cell homogenates. *J Dairy Sci.* 76:691-700.
- Henault MA**, Killian GJ. 1993c. Composition and morphology of lipid droplets from oviduct epithelial cells. *Anat Rec.* 237:466-74.
- Hommelberg PP**, Plat J, Langen RC, Schols AM, Mensink RP. 2009. Fatty acid-induced NFkappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metb.* 296:114-20.
- Hu Y**, Wang Q, Li G, Sun X, Liu C. 2013. Ultrasonic morphology of uterus and ovaries in girls with pituitary hyperplasia secondary to primary hypothyroidism. *Horm Metab Res,* 45:669-74.

- Huang A**, Isobe N, Obitsu T, Yoshimura Y. 2016. Expression of lipases and lipid receptors in sperm storage tubules and possible role of fatty acids in sperm survival in the hen oviduct. *Theriogenology*. 85:1334-42.
- Huang JC**. 2008. The potential applications of peroxisome proliferator-activated receptor delta ligands in assisted reproductive technology. *PPAR Res*. 2008:794814.
- Huang N**, Wang C, Zhang N, Mao W, Liu B, Shen Y, Gao Y, Zhao Y, Cao J. 2018. Effect of estrogen on prostaglandin synthetase in bovine oviduct smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 818:287-93.
- Hsieh K**, Lee YK, Londos C, Raaka BM, Dalen KT, Kimmel AR. 2012. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. *J Cell Sci*. 125:4067-76.
- Hyyti OM**, Portman MA. 2006. Molecular mechanism of cross-talk between thyroid hormone and peroxisome proliferator activated receptors: focus on the heart. *Cardiovasc Drugs Ther*. 20:463-9.
- Ikonen E**. 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:125-38.
- Inuwa I**, Williams MA. 1996. Morphometric study on the uterine horn and thyroid gland in hypothyroid, and thyroxine treated hypothyroid rats. *J Anat*. 188:383-93.
- Iqbal J**, Hussain MM. 2009. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296:E1183-94.
- Itabe H**, Yamaguchi T, Nimura S, Sasabe N. 2017. Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids Health Dis*. 16:83.
- Ito S**, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K. 2016. Remodeling of bovine oviductal epithelium by mitosis of secretory cells. *Cell Tissue Res*. 366:403-10.
- Jiang JY**, Imai Y, Umezu M, Sato E. 2001. Characteristics of infertility in female hypothyroid (hyt) mice. *Reproduction* 122:695-700.

**Jiang JY**, Miyabayashi K, Nottola SA, Umezu M, Cecconi S, Sato E, Macchiarelli G. 2008. Thyroxine treatment stimulated ovarian follicular angiogenesis in immature hypothyroid rats. *Histol Histopathol.* 23:1387-98.

**Kajita K**, Mune T, Kanoh Y, Natsume Y, Ishizawa M, Kawai Y, Yasuda K, Sugiyama C, Ichizuka T. 2004. TNF $\alpha$  reduces the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) via the production of ceramide and activation of atypical PKC. *Diabetes Res Clin Pract. Suppl 1*:S79-83.

**Kakuta H**, Matsushita A, Arikawa K, Iguchi T, Sato T. 2013. Cholesterol homeostasis in the ovaries of neonatally diethylstilbestrol-treated mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 121:94-101.

**Kannisto K**, Rehnmark S, Slätis K, Webb P, Larsson L, Gáfyels M, Eggertsen G, Parini P. 2014. The thyroid receptor  $\beta$  modulator GC-1 reduces atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Atherosclerosis.* 237: 544-54.

**Kawai K**, Sasaki S, Morita H, Ito T, Suzuki S, Misawa H, Nakamura H. 2004. Unliganded thyroid hormone receptor-beta 1 represses liver X receptor alpha/oxysterol-dependent transactivation. *Endocrinology.* 145:5515-24.

**Killian GJ.** 2004. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci.* 82-83:141-53.

**Killian GJ.** 2011. Physiology and endocrinology symposium: evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock. *J Anim Sci.* 89:1315-22.

**Kim WK**, Meliton V, Amantea CM, Hahn TJ, Parhami F. 2007. 20(S)-hydroxycholesterol inhibits PPAR $\gamma$  expression and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells through a hedgehog-dependent mechanism. *J Bone Miner Res.* 22:1711-9.

**Komar CM**, Braissant O, Wahli W, Curry TE Jr. 2001. Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology* 142:4831-8.

**Komar C.** 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol.* 30:3-41.

**Kong L,** Wei Q, Fedail JS, Shi F, Nagaoka K, Watanabe G. Effects of thyroid hormones on the antioxidative status in the uterus of young adults rats. *J Reprod Dev.* 61:219-27.

**Krassas GE,** Poppe K, Glinoe D. 2010. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev.* 31:702-55.

**Krause K,** Weiner J, Hönes S, Klötting N, Rijintjes E, Heiker JT, Gebhardt C, Köhrle J, Führer D, Steinhoff K, Hesses S, Moeller LC, Tönjes A. 2015. The effects of thyroid hormones on gene expression of Acyl-Coenzyme A thioesterases in adipose tissue and liver of mice. *Eur Thyroid J.* 4:59-66.

**Kriseman M,** Mills C, Kovanci E, Sangi-Haghpeykar H, Gibbons W. 2015. Antimullerian hormone levels are inversely associated with body mass index (BMI) in women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 32:1313-16.

**Kurzynska A,** Bogachi M, Chojnowska K, Bogacka I. 2014. Peroxisome proliferator activated receptor ligands affect progesterone and 17 $\beta$ -estradiol secretion by porcine corpus luteum during early pregnancy. *J Physiol Pharmacol.* 65:709-17.

**Lai WA,** Yeh YT, Lee MT, Wu LS, Ke FC, Hwang JJ. 2013. Ovarian granulosa cells utilize scavenger receptor SR-B1 to evade cellular cholesterol homeostatic control for steroid synthesis. *J Lipid Res.* 54:365-78.

**Lapointe S,** Sirard MA. 1998. Catalase and oviductal fluid the decrease motility of bovine sperm in culture medium containing specific amino acids. *J Androl.* 19: 31-6.

**Leaver HA,** Howie A, Wilson NH, Yap PL, Aitken ID. 1992. Developmental changes in the fatty acids of the rat uterus and the influence of dietary essential fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 46:123-31.

- Leroy JL**, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, de Kruif A. 2004. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentration in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 80:201-11.
- Leese HJ**, Tay JI, Reischl J, Downing SJ. 2001. Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction.* 121:339-46.
- Lessey B**, Young S. 2014. The structure, function, and evaluation of the female reproductive tract. En Strauss y Barbieri. *Yen and jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management (7<sup>th</sup> ed.)*. (Pp. 458-93). USA: Elsevier.
- Liu Y**, Weng J, Huang S, Shen Y, Han Y, Xu M, Weng Q. 2014. Immunoreactivities of PPAR $\gamma$ 2, leptin and leptin receptor in oviduct of Chinese brown frog during breeding period and pre-hibernation. *Eur J Histochem* 59:2422.
- Lombardi A**, Matteis R, Moreno M, Napolitano L, Busiello RA, Senes R, Lange P, Lanni A, Goglia F. 2012. Responses of skeletal muscle lipid metabolism in rat gastrocnemius to hypothyroidism and iodothyronine administration: a putative role of FAT/CD36. *Am H Physiol Endocrinol Metab.* 303:E1222-33.
- Londos C**, Sztalryd C, Tansey JK, Kimmel AR. 2005. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie.* 87:45-9.
- Lu C**, Cheng SY. 2009. Thyroid hormone receptors regulate adipogenesis and carcinogenesis via crosstalk signaling with peroxisome proliferation-activated receptors. *J Mol Endocrinol.* 44(3):143-54.
- Lutsyk A**, Sogomonian E. 2012. Structural, functional, and lectin histochemical characteristics of rat ovaries and endometrium in experimental hyper- and hypothyroidism. *Folia Histochem Cytobiol.* 50:331-9.
- Luu W**, Sharpe LJ, Capell-Hattam I, Gelissen IC, Brown AJ. 2016. Oxysterols: old tale, new twists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 56:447-67.
- Lyons RA**, Saridogan E, Djahanbakhch O. 2006. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update.* 12:363-72.

- Mahfouz R**, Khoury R, Blachnio-Zabielska, Turban S, Loiseau N, Lipina C, Stretton C, Bourron O, Ferré P, Foufelle F, Hundal HS, Hajduch E. 2014. Characterizing the inhibitory actions of ceramide upon signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight. *PLoS One*. 9:e101865.
- Maki S**, Kadokawa H. 2014. Increased ectopic fat cells in the longitudinal muscularis layer of the oviduct isthmus in obese Japanese Black cows. *Anim Sci J*. 85:207-12.
- McClure TD**, Young ME, Taegtmeier H, Ning XH, Buroker NE, López-García J, Portman MA. 2005. Thyroid hormone interacts with PPAR alpha and PGC-1 during mitochondrial maturation in sheep heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289:H2258-64.
- Meng L**, Rijntjes E, Stwarts HJM, Keijer J, Teerds KJ. 2017 Prolonged hypothyroidism severely reduces ovarian follicular reserve in adult rats. 2017. *J Ovarian Res*. 10:19.
- Miklosz A**, Chabowski A, Zendzian-Piotrowska M, Gorski J. 2012. Effects of hyperthyroidism on lipid content and composition in oxidative and glycolytic muscles in rats. *J Physiol Pharmacol*. 63:403-10.
- Monk JM**, Hou TY, Turk HF, Weeks B, Wu C, McMurray DN, Chapkin RS. 2012. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) decrease obesity-associated Th17 cell mediated inflammation during colitis. *PLoS One*. 7:e49739.
- Morakinyo A**, Bolanle I, Adegoke O. 2011. Calcium antagonist modulate oxidative stress and acrosomal reaction in rat spermatozoa. *Arch Med Sci*. 7:613-8.
- Mouzat K**, Prod'homme M, Volle DH, Sion B, Déchelotte P, Gauthier K, Vanacker JM, Lobaccaro JM. 2007. Oxysterol nuclear receptor LXR beta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem*. 282:4693-701.
- Mu YM**, Yanase T, Nishi Y, Waseda N, Oda T, Tanaka A, Takayanagi R, Nawata H. 2000. Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 271:710-3.
- Murray MK**. 1996. Changes in secretory status, cell height and percentage ciliation of epithelial lining of sheep fimbria oviduct during early pregnancy. *J Reprod Fertil*. 106:173-83.

- Nagaraju GP**, Rajitha B, Aliya S, Kotipatruni RP, Madanraj AS, Hammond A, Park D, Chigurupati S, Alam A, Pattnik S. 2016. The role of adiponectin in obesity-associated female-specific carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 31:37-48.
- Nahar A**, Maki S, Kadokawa H. 2013. Suppressed expression of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in oviduct ampullae of obese cows. *Anim Reprod Sci.* 139:1-8.
- Nahar A**, Kadokawa H. 2016. Suppressed expression of macrophage migration inhibitory factor in the oviducts of lean and obese cows. *Reprod Fertil Dev.* 28:655-62.
- Nelson ER**, DuSell CD, Wang X, Howe MK, Evans G, Michalek RD, Umetani M, Rathmell JC, Khosla S, Gesty-Palmer D, McDonnell DP. 2011. The oxysterol, 27-hydroxycholesterol, links cholesterol metabolism to bone homeostasis through its actions on the estrogen and liver X receptors. *Endocrinology.* 152:4691-705.
- Okumura T**. 2011. Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *J Physiol Biochem.* 67:629-36.
- Öner J**, Öner. 2007. Immunodetection of thyroid hormone receptor (Alpha1/Alpha2) in the rat uterus and oviduct. *Acta Histochem Cytochem.* 40:77-81.
- Otsuki J**, Nagai Y, Chiba K. 2007. Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *J assist Reprod Genet.* 24:263-70.
- Ott J**, Kurz C, Braun R, Promberger R, Seemann R, Vytiska-Binstorfer E, Walch K. 2014. Overt hypothyroidism is associated with the presence of uterine leiomyoma: a retrospective analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 177:19-22.
- Pageaux JF**, Joulain C, Fayard JM, Lagarde M, Laugier C. 1992. Changes in fatty acid composition of plasma and oviduct lipids during sexual maturation of Japanese quail. *Lipids.* 27:518-25.
- Petcoff DW**, Holland WL, Stith BJ. 2008. Lipid levels in sperm, eggs, and during fertilization in *Xenopus Laevis*. *J Lipid Res.* 49:2365-78.

**Pedrero-Badillo F**, Anaya-Hernández A, Corona-Quinatnilla DL, Castelán F, Pacheco P, Martínez-Gómez M, Cuevas E. 2013. Morphohistological characteristics of rabbit oviduct; a proposal for a single regionalization. *Anim Reprod Sci.* 143:102-11.

**Poli G**, Biasi F, Lonarduzzi G. 2013. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biol.* 1:125-30.

**Qiao Y**, Guo D, Meng L, Liu Q, Liu X, Tang C, Yi G, Wang Z, Yin W, Tian G, Yuan Z. 2015. Oxidized-low density lipoprotein accumulates cholesterol esters via the PKCa-adipophilin, ACT1 pathway in RAW264.7 cells. *Mol Med Rep.* 12:3599-606.

**Rivero-Gutiérrez B**, Anzola A, Martínez-Augustin O, de Medina FS. 2014. Stain free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal Biochem.* 467:1-3.

**Rizos CV**, Elisaf MS, Liberopoulos EN. 2011. Effects of thyroid dysfunction on lipid profile. *Open Cardiovasc Med J.* 5:76-84.

**Robker RL**, Akison LK, Bennett BD, Thrupp PN, Chura LR, Russell DL, Lane M, Norman RJ. 2009. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:1533-40.

**Rodríguez-Castelán J**, Nicolás L, Morimoto S, Cuevas E. 2015. The Langerhans islet cells of female rabbits are differentially affected by hypothyroidism depending on the islet size. *Endocrine.* 48:811-7.

**Rodríguez-Castelán J**, Anaya-Hernández A, Méndez-Tepepa M, Martínez-Gómez M, Castelán F, Cuevas E. 2016. Thyroid hormone and thyrotropin receptors immunolocalization in reproductive tissues of adult female rabbits. *Endocr Res.* 42:59–70.

**Rodríguez-Castelán J**, Corona-Pérez A, Nicolás-Toledo L, Martínez-Gómez M, Castelán F, Cuevas E. 2017a. Hypothyroidism induces a moderate steatohepatitis accompanied by liver regeneration, mas cells infiltration, and changes in the expression of the farnesoid receptor. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 125:183-90.

**Rodríguez-Castelán J**, Méndez-Tepepa M, Carrillo-Portillo Y, Anaya-Hernández A, Rodríguez-Antolín J, Zambrano E, Castelán F, Cuevas-Romero E. 2017b. Hypothyroidism reduces the size of ovarian follicles and promotes visceral adiposity with activation of macrophages in females rabbits. *BioMed Res Int*. 2017.

**Rodríguez-Castelán J**, Méndez-Tepepa M, Zepeda-Pérez D, Pacheco P, Nicolás-Toledo L, Cuevas-Romero E (En proceso a). Lipid content among oviductal regions in rabbits is affected by hypothyroidism.

**Rodríguez-Castelán J**, Espíndola-Lozano M, Zepeda-Pérez D, Méndez-Tepepa M, Anaya-Hernández A, Berbel P, Cuevas-Romero E (En proceso b). Hypothyroidism promotes a low size of progeny associated with changes in lipids levels of dams.

**Sánchez-Lazo L**, Brisard D, Elis S, Maillard V, Uzbekov R, Labas V, Desmarchais A, Papillier P, Monget P, Uzbekova S. 2014. Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Mol Endocrinol*. 28(9):1502-21.

**Schuldiner M**, Bohner M. 2017. A different kind of love – lipid droplet contact sites. *Biochim Biophys Acta*. S1388-1981: 30109-9.

**Shan L**, Chen YA, Davis L, Han G, Zhu W, Molina AD, Arango H, LaPolla JP, Hoffman MS, Sellers T, Kirby T, Nicosia SV, Sutphen R. 2012. Measurement of phospholipids may improve diagnostic accuracy in ovarian cancer. *PLoS One*. 7:e46846.

**Shiomi Y**, Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Nakayama R, Orikawa Y, Yoshioka Y, Tanaka K, Ueki K, Kadowaki T. 2015. A novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$  agonist and PPAR $\gamma$  antagonist, Z-551, ameliorates high-fat diet-induced obesity and metabolic disorders in mice. *J Biol Chem*. 290:14567-81.

**Shu H**, Wong B, Zhou G, Li Y, Berger J, Woods JW, Wright SD, Cai TQ. 2000. Activation of PPAR $\alpha$  or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 267:345-9.

**Silva JF**, Ocarino NM, Vieira AL, Nascimento EF, Serakides R. 2013. Effects of hypo- and hyperthyroidism on proliferation, angiogenesis, apoptosis and expression of COX-2 in the corpus luteum of female rats. *Reprod Domest Anim*. 48:691-8.

**Sinha RA**, You SH, Zhou J, Siddique MM, Bay BH, Zhu X, Privalsky ML, Cheng SY, Stevens RD, Summers Newgard CB, Lazar MA, Yen PM. 2012. Thyroid hormone stimulates hepatic lipid catabolism via activation of autophagy. *J Clin Invest.* 122:2428:38.

**Smith LP**, Nierstenhoefer M, Yoo SW, Penzias AS, Tobiasch E, Usheva A. 2009. The bile acid synthesis pathway is present and functional in the human ovary. *PLoS One.* 4:e7333.

**Smith RD**, Babiychuk EB, Noble K, Draeger A, Wray S. 2005. Increased cholesterol decreases uterine activity: functional effects of cholesterol alteration in pregnant rat myometrium. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288:C982-8.

**Soleymani E**, Ziari K, Rahmani O, Dadpay M, Taheri-Dolatabadi M, Alizadeh K, Ghanbarzadeh N. 2014. Histopathological findings of endometrial specimens in abnormal uterine bleeding. *Arch Gynecol Obstet.* 189:845-9.

**Stacey K**, Beasley B, Wilce PA, Martin L. 1991. Effects of female sex hormones on lipid metabolism in the uterine epithelium of the mouse. *Int J Biochem.* 23:371-6.

**Stelzner K**, Herbert D, Popkoya Y, Lorz A, Schiller J, Gericke M, Klötting N, Blüher M, Franz S, Simon JC, Saalbach A. 2016. Free fatty acids sensitize dendritic cells to amplify TH1/TH17-immune responses. *Eur J Immunol.* 46:2043-53.

**Straveus A.** 2012. Paracrine interactions of thyroid hormones and thyroid stimulation hormone in the female reproductive tract have an impact on female fertility. *Front Endocrinol.* 3:50.

**Sumathi S.** 2016. Endometrial cholesterol granuloma associated with prolapsed uterus- a rare case report with unusual clinical presentation. *J Clin Diagn Res.* 10:ED05-6.

**Tauchi-Sato K**, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem.* 277:44507-12.

**Tsai JH**, Chi MMY, Schulte MB, Holey KH. 2014. The fatty acid beta-oxidation pathway is important for decidualization of endometrial stromal cells in both humans and mice. 90:34.

**Tsiligianni T**, Saratsi A, Besenfelder U, Anastasiadis A, Vainas E, Saratsis P, Brem G. 2004. The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation. *Theriogenology.* 61:989-95.

**Van Hoeck V**, Bols PE, Binelli M, Leroy JL. 2014. Reduced oocyte and embryo quality in response to elevated non-esterified fatty acid concentrations: a possible pathway to subfertility? *Anim Reprod Sci.* 149:19-29.

**Varlamov O**, Chu MP, McGee WK, Cameron JL, O'Rourke RW, Meyer KA, Bishop CV, Stouffer RL, Roberts CT Jr. 2013. Ovarian cycle-specific regulation of adipose tissue lipid storage by testosterone in female nonhuman primates. *Endocrinology.* 154(11): 4126-35.

**Velazquez MA**, Hermann D, Kues WA, Niemann H. 2011. Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. *Reproduction.* 141:91-103.

**Vélez LM**, Abruzzese GA, Motta AB. 2013. The biology of the peroxisome proliferator-activated receptor system in the female reproductive tract. *Curr Pharm Des.* 19:4641-6.

**Vrablick TL**, Watts JL. 2013. Polyunsaturated fatty acid derived signaling in reproduction and development: insights from *Caenorhabditis elegans* and *drosophila melanogaster*. 2013. *Mol Repro Dev.* 80: 244-59.

**Wakim AN**, Polizotto SL, Buffo MJ, Marrero MA, Burholt DR. 1993. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil. Steril.* 59, 1187–90.

**Watanabe M**, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J. 2006. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature.* 439:484-9.

**Wojsiat J**, Korczynski J, Borowiecka M, Zbikowska HM. 2017. The role of oxidative stress in female infertility and in vitro fertilization. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 71:359-66.

**Wu LL**, Dunning KR, Yang X, Russell DL, Lane M, Norman RJ, Robker RL. 2010. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology.* 151:5438-45).

**Yamakawa K**, Hosoi M, Koyama H, Tanaka S, Fukumoto S, Morii H, Nishizawa Y. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist increase vascular endothelial growth

factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 271:571-4.

**Yang X**, Dunning KR, Wu LL, Hickey TE, Norman RJ, Russell DL, Liang X, Robker RL. 2010. Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reprod Fertil Dev.* 22:1262-71.

**Yin Y**, Lin C, Veith GM, chen H, Dhandha M, Ma L. 2012. Neonatal diethylstilbestrol exposure alters the metabolic profile of uterine epithelial cells. *Dis Model Mech.* 5:870-80.

**Zhang RN**, Fu XW, Jia BY, Liu C, Cheng KR, Zhu SE. 2014. Expression of perilipin 2 (PLIN2) in porcine oocytes during maturation. *Reprod Domest Anim.* 49:875-80.

**Zhang Y**, Cui Y, Wang XL, Shang X, Qi ZG, Xue J, Zhao X, Deng M, Xie ML. 2015. PPAR $\alpha/\gamma$  agonist and antagonist differently affect hepatic lipid metabolism, oxidative stress and inflammatory cytokine production in steatohepatic rats. *Cytokine.* 75:127-35.

**Zhao N**, Wang L, Guo N. 2016. A-Linolenic acid increases the G0/G1 switch gene 2 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from obese patients: a pilot study. *Lipids Health Dis.* 15:36.

## 12. GLOSARIO DE TÉRMINOS

1. Lípidos neutros o acilglicéridos: ácidos grasos unidos con glicerol (monoglicéridos, diacilglicéridos y triglicéridos).
2. Fosfolípidos: tipo de lípidos anfipático compuesto por glicerol, ácidos grasos y grupo fosfato; y son el componente fundamental de las membranas celulares.
3. Adipofilina: proteína de diferenciación de adipocitos, que regula el transporte de lípidos en las gotas lipídicas.
4. Lipólisis: también nombrada hidrólisis de los triglicéridos es un proceso mediante el cual los triglicéridos se hidrolizan y se convierten en ácidos grasos y colesterol.
5. Citocinas: Proteínas secretadas por linfocitos y macrófagos principalmente; su acción incluye la comunicación celular, quimiotaxis, modulan la secreción de inmunoglobulinas, y tienen una participación fundamental en el mecanismo de la inflamación.
6. Lipasa sensible a hormonas (HSL): enzima que cataliza el desdoblamiento de los triacilglicéridos almacenados en las gotas lipídicas en glicerol y ácidos grasos.
7. Ceramidas: ácidos grasos unidos mediante un enlace amida a una esfingosina.
8. Lipofucsina:
9. Oxisterol: es el producto resultante de la oxidación del colesterol durante su metabolismo.
10. Gen G0S2: gen que inicia el proceso de proliferación celular, modulando el paso del estado G0 a G1.
11. Metaloproteasas: enzima en cuya molécula contiene metales como el zinc y el cobalto que promueve la lisis de las proteínas.
12. Dislipidemias: patologías en donde los niveles séricos de colesterol y/ triglicéridos se encuentran elevados.
13. Oocito: también llamado ovocito, es la célula germinal para el desarrollo del óvulo.
14. Glicoproteínas: son moléculas compuestas por una proteína y uno o más glúcidos; las cuales cumplen diversas funciones dependiendo de su localización en el compartimento

celular. Principalmente se encuentran ancladas a la membrana celular en donde se relacionan con la estructura y el reconocimiento celular.

15. Mucopolisacáridos: también llamados glucosaminoglicanos, son cadenas largas de azúcares complejos, que en ocasiones se encuentran unidos a proteínas (proteoglicanos). En la célula se encuentran anclados a la membrana celular y dentro de la matriz extracelular.
16. Respuesta o reacción acrosomal: es un proceso mediante el cual las membranas plasmática y acrosomal (localizada en la cabeza del espermatozoide) se fusionan, y está dada por la interacción con la zona pelúcida permitiendo la fertilización.
17. Gonadotropina coriónica humana (cGH): hormona glicoproteica producida durante el embarazo que tiene la finalidad de mantener el cuerpo lúteo para continuar con la síntesis de progesterona.
18. Blastocisto: (Blástula) Fase del desarrollo del embrión en mamíferos, que constituye una estructura celular compleja derivada de la mórula. Está formada por una masa celular interna de la que se origina el embrión y de una capa periférica de células que formará la placenta.
19. Células deciduales: son las células que van a dar lugar a la invasión del trofoblasto y que constituyen la placenta materna.
20. Glucógeno: es un polisacárido formado por cadenas ramificadas de glucosa y conocido por su cualidad de ser una reserva energética, es sintetizado cuando la glucosa entra en el organismo gracias a la intervención de la insulina, mientras que es degradado por acción del glucagón.
21. Decidualización: (diferenciación) de las células del estroma en células secretoras epiteliales.
22. Células T: también llamadas linfocitos, son un tipo de célula inmune que son las encargadas de producir anticuerpos o de atacar a organismos patógenos.
23. Endometriosis: enfermedad en la cual el endometrio (epitelio que normalmente cubre el útero) crece en otro sitio por ejemplo los ovarios, detrás del útero, intestino o vejiga; ocasionando dolor, infertilidad y periodos menstruales muy abundantes.

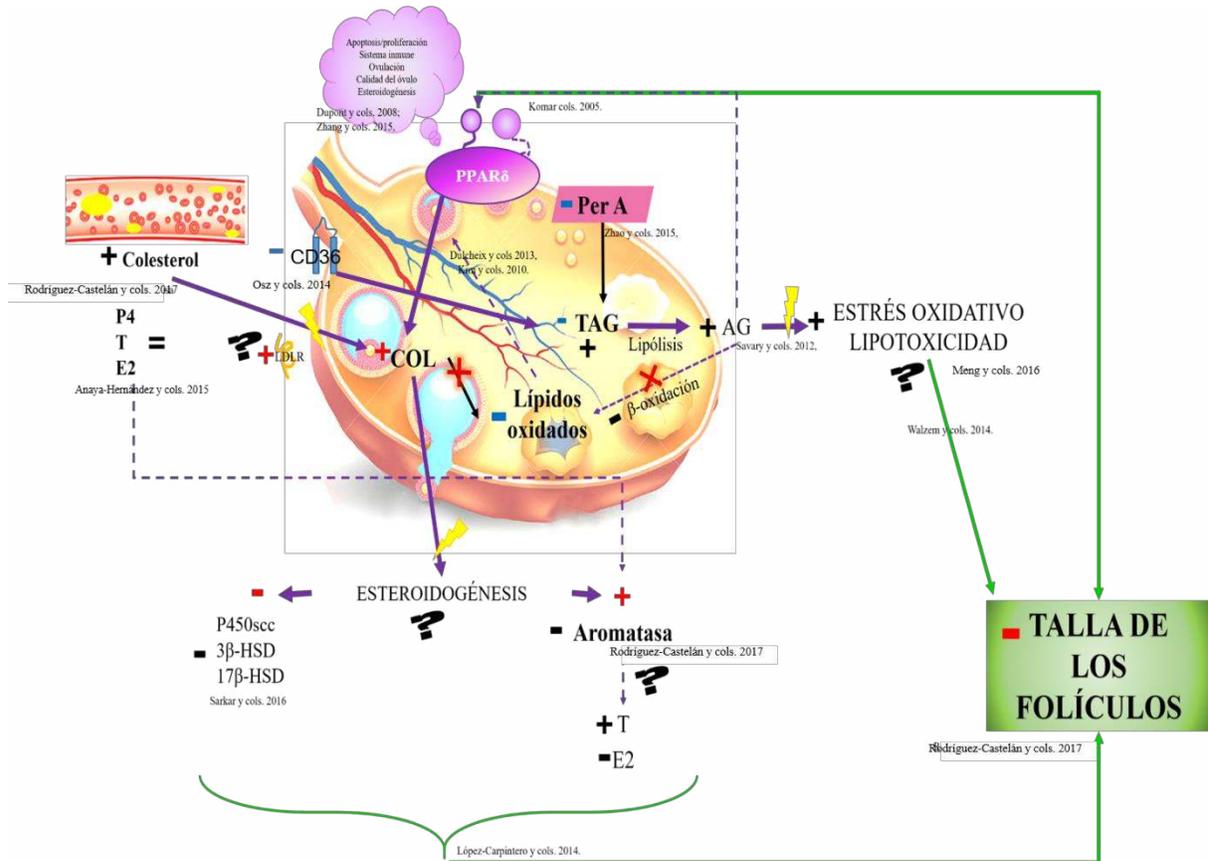
24. Síndrome de ovario poliquístico: Enfermedad causada por el desequilibrio de las hormonas sexuales (Progesterona y estrógenos) y de andrógenos en la mujer, que puede generar desequilibrios en el ciclo menstrual, aumento del vello corporal, marcas oscuras en los pliegues cutáneos, caída de cabello, quistes ováricos, dificultad para embarazarse o infertilidad.
25. Angiogénesis: proceso fisiológico de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, involucrando proliferación, migración, crecimiento y diferenciación de células endoteliales.
26. Catalasa: enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.
27. Dominancia folicular. Está dada por la cantidad de lípidos que contengan los folículos durante su desarrollo así como por receptores para LH; lo cual les confiere cierto grado de preferencia para llegar a la ovulación.
28. Gonadotropinas: son un conjunto de hormonas liberadas por la hipófisis en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas secretada por el hipotálamo. Están formadas por la hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH) y la gonadotropina coriónica humana (cGH).
29. Factor de crecimiento epidermal: es una proteína que señala a células inmunitarias y que tiene una gran importancia en el proceso de cicatrización.
30. Lipogénesis: proceso mediante el cual los ácidos grasos se unen con glicerol y general triglicéridos.
31. Especies reactivas de oxígeno (ROS): son aquellos iones de oxígeno, radicales libres o peróxidos producidos por las mitocondrias durante la respiración celular y que tienen papel durante la señalización celular; sin embargo el aumento excesivo de estos puede generar estrés oxidativo y generar un daño celular.
32. Fosfolipasa C: enzimas intracelulares pertenecientes a la familia de las hidrolasas, que actúa rompiendo enlaces diéster a través de moléculas de agua.
33. Fosfodiesterasa: enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster como los que se establecen entre la pentosa y los ácidos nucleicos.

34. Fase folicular: Es la fase de desarrollo de los folículos ováricos y está caracterizada por el aumento en los niveles de estrógenos.
35. Etapa secretora: También conocida como etapa lutea, en la cual los niveles de progesterona se encuentran elevados, debido a la producción excesiva de cuerpos lúteos en el ovario.
36. Ciclo estral: También denominado ciclo reproductivo, son modificaciones que se producen en los ovarios en lapsos de tiempo determinados y como consecuencia de variaciones hormonales. Está dividido por dos periodos o etapas: la fase folicular y la secretora.
37. Adiponectina: hormona sintetizada en el tejido adiposo y que regula el metabolismo de ácidos grasos y glucosa en el adipocito.
38. Apoproteínas: proteínas unidas a un grupo lipídico funcional que realizan principalmente el transporte de los lípidos en la sangre y en los tejidos (lipoproteínas).



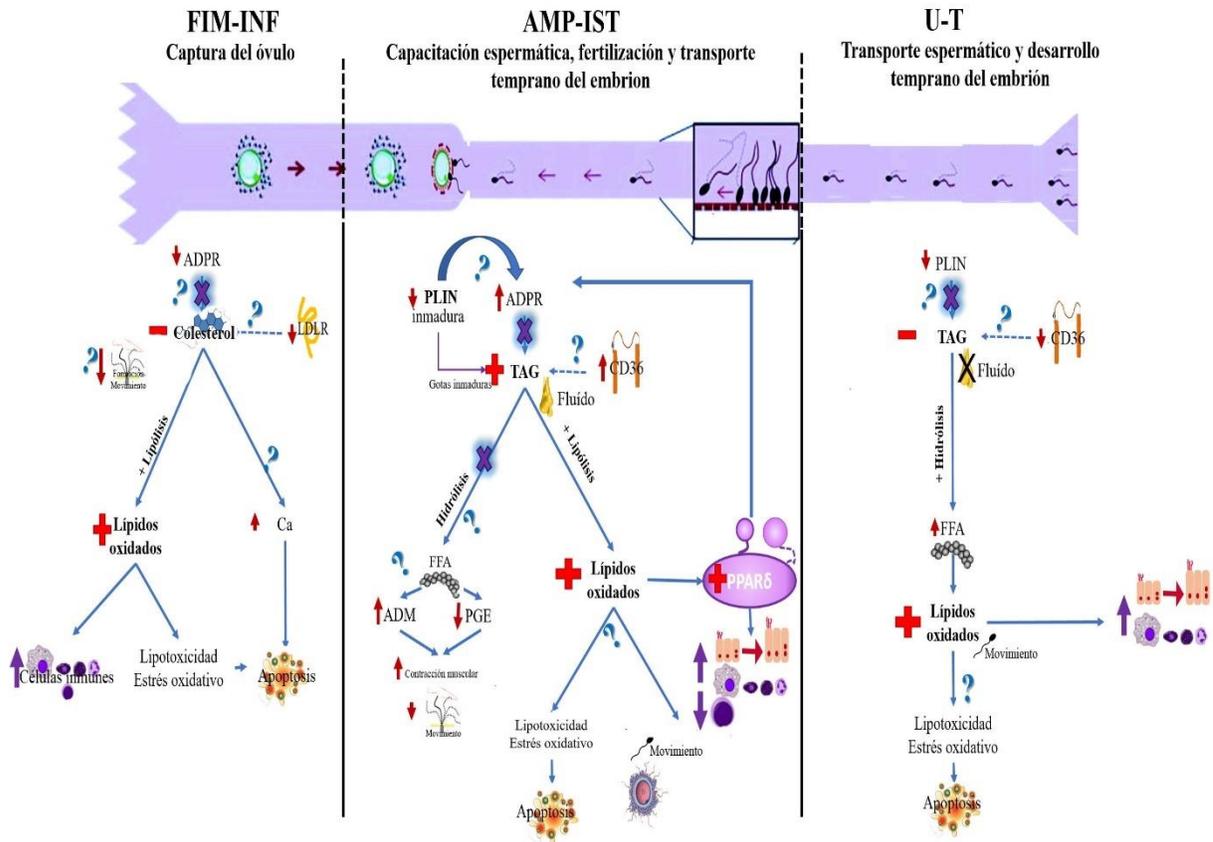
## 13. ANEXOS

### Anexo 1. Modelo del efecto del hipotiroidismo sobre el metabolismo de lípidos en el ovario



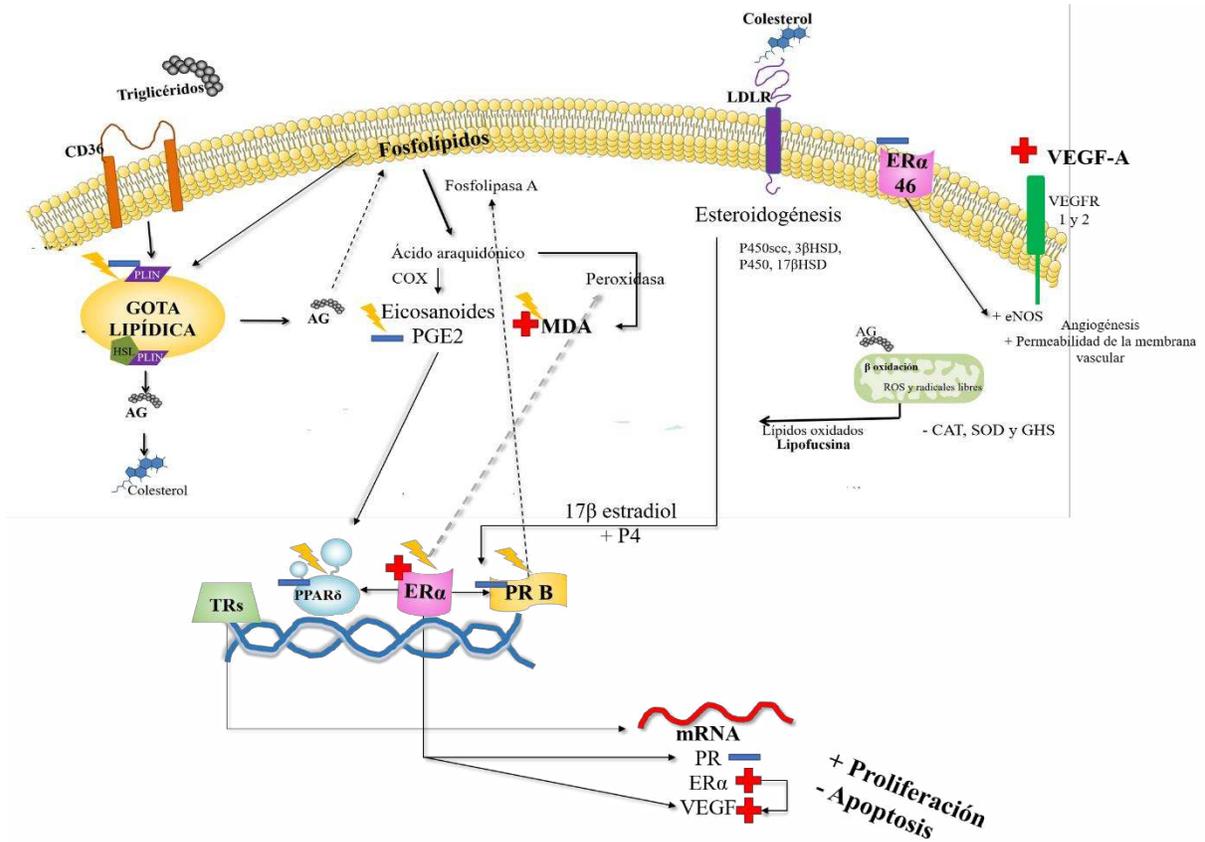
**Figura 14.** Efecto del hipotiroidismo en el metabolismo de lípidos en el ovario. El hipotiroidismo genera dislipidemias, particularmente a través de colesterol, el genera el aumento de colesterol en el ovario. Así mismo, y dado que las hormonas tiroideas regulan la expresión y actividad de genes y proteínas relacionadas con la esteroidogénesis (P450scc, 3βHSD y aromatasa), se genera un aumento en los niveles locales de progesterona y testosterona, lo cual repercute en la maduración folicular, generando una menor talla de los folículos. Así mismo, el almacenamiento de triglicéridos se encuentra disminuido por una menor expresión de PLIN y un aumento en la actividad de lipasa sensible a hormonas, lo cual genera un aumento de ácidos grasos no esterificados que lleva al ovario a aumentar su lipoperoxidación y estrés oxidativo. Los ácidos grasos no ingresan a la β-oxidación, por lo cual se disminuye el contenido de lípidos oxidados y esto explica la disminución de PPARδ.

## Anexo 2. Modelo del efecto del hipotiroidismo sobre el metabolismo de lípidos en el oviducto



**Figura 15.** Efecto del hipotiroidismo sobre el metabolismo de lípidos en cada región del oviducto. **Izquierda.** Las hormonas tiroideas regulan la expresión del receptor a LDL por lo que disminuye la entrada de colesterol en la región fimbria-infundíbulo, además su almacenamiento disminuye por que las gotas de lípidos carecen de adipofilina, esta disminución de colesterol genera que los cilios no se formen adecuadamente o que no tengan el sustrato suficiente para generar energía. El colesterol genera que los canales de calcio aumenten y que las células inicien un proceso de apoptosis. Otra posibilidad es que el colesterol se esté metabolizando rápidamente a oxisterol generando mayor señalización de células inmunes y lipoperoxidación. **Centro.** La disminución de PLIN en el ámpula-istmo genera que se formen mayor cantidad de gotas de lípidos inmaduras con almacenamiento de triglicéridos, además generan que se exprese en mayor cantidad adipofilina con lo cual las gotas maduras también almacenan altas cantidades de triglicéridos. La hidrólisis de triglicéridos disminuye generando un aumento de adrenomedulina y una disminución de prostaglandinas con los cual aumente la contracción muscular y disminuye el movimiento ciliar, lo cual repercutiría en la fecundación. Por otra parte la lipólisis se encuentra favorecida con lo cual hay un incremento de lípidos oxidados y PPARδ, generando lipoperoxidación y con ello un flujo oviductal más espeso, que impedirá el movimiento de los espermatozoides. **Derecha.** Receptores CD36 se encuentran disminuidos con lo cual la entrada de triglicéridos disminuye, el triglicérido no se almacena ya que disminuye la perilipina y se hidroliza rápidamente generando ácidos grasos no esterificados que comienzan a lipoperoxidarse, lo cual repercute en el movimiento de los espermatozoides.

### Anexo 3. Modelo del efecto del hipotiroidismo sobre el metabolismo de lípidos en el útero



**Figura 16.** Efecto del hipotiroidismo sobre el metabolismo de lípidos en el útero. Las hormonas tiroideas alteran la expresión y actividad transcripcional de genes relacionados con la esteroidogénesis uterina. Así el hipotiroidismo si bien no aumenta el contenido de colesterol, promueve la esteroidogénesis aumentando los niveles de progesterona en el útero, lo cual genera la disminución en la expresión de su receptor, así mismo ocasiona un aumento en la expresión del receptor a estrógenos  $\alpha$ . Lo anterior ocasiona que enzimas como fosforilasa A, ciclooxigenasa y peroxidasa modifiquen su actividad generando una disminución de lípidos oxidados, particularmente eicosanoides (prostaglandinas), disminuyendo la expresión de PPAR $\delta$ . La menor actividad de catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa promueve la acumulación de malondialdehído, llevando al útero a lipoperoxidación. La expresión de VEGF-A se ve aumentada gracias al ER $\alpha$ , ocasionando mayor actividad del óxido nítrico sintasa endometrial y con ello alterando la permeabilidad de las membranas vasculares.

# 1. PUBLICACIONES

## Artículos científicos

Hindawi Publishing Corporation  
International Journal of Endocrinology  
Volume 2015, Article ID 758268, 8 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/758268>



### Research Article

## Hypothyroidism Affects Vascularization and Promotes Immune Cells Infiltration into Pancreatic Islets of Female Rabbits

Julia Rodríguez-Castelán,<sup>1</sup> Margarita Martínez-Gómez,<sup>2,4</sup>  
Francisco Castelán,<sup>2</sup> and Estela Cuevas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 90070 Tlaxcala, Tlax., México

<sup>2</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 90070 Tlaxcala, Tlax., México

<sup>3</sup>Departamento de Biología Celular y Histología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Periférica, 90070 Tlaxcala, Tlax., México

Correspondence should be addressed to Estela Cuevas; [ecuevas@untz.mx](mailto:ecuevas@untz.mx)

Received 5 December 2014; Revised 7 May 2015; Accepted 26 May 2015

Academic Editor: Darío Infante

Copyright © 2015 Julia Rodríguez-Castelán et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Thyroidectomy induces pancreatic edema and immune cells infiltration similarly to that observed in pancreatitis. In spite of the counteracted effects of hypothyroidism on serum glucose and insulin concentrations, the number and proliferation of Langerhans islet cells as well as the presence of extracellular matrix are affected depending on the islet size. In this study, we evaluated the effect of methimazole-induced hyperthyroidism on the vascularization and immune cells infiltration into islets. A general observation of pancreas was *in situ*. Twelve Chitochilla-bred female adult rabbits were divided into control ( $n = 6$ ) and hyperthyroid groups ( $n = 6$ , methimazole, 0.02% in drinking water for 30 days). After the treatment, rabbits were sacrificed and their pancreas was excised, histologically processed, and stained with Periodic Acid-Schiff (PAS) or Masson's Trichrome techniques. Islets were arbitrarily classified into large, medium, and small ones. The external and internal portions of each islet were also identified. Student's *t*-test and Mann-Whitney-*U* test or two-way ANOVAs were used to compare variables between groups. In comparison with control rabbits, hypothyroidism induced a strong infiltration of immune cells and a major presence of collagen and proteoglycans in the interislet septa. Large islets showed a high vascularization and immune cells infiltration. The present results show that hypothyroidism induces pancreatitis and insulinitis.**

### 1. Introduction

A strict relationship between the function of the pancreas and the hypothalamic-pituitary-thyroid axis has been established. The pancreas of animal and human subjects contains high thyrotrophin release hormone (TRH) levels. The TRH is located in secretory granules of insulin-containing cells [1], regulates the concentration of pancreatic enzymes, and induces pancreatic hyperplasia [2]. The presence of thyrotrophin receptor (TSH-R) [3] and thyroid hormones receptors (TRs)  $\alpha$  and  $\beta$  [3] supports that acinar and islet cells are sensitive to thyroid hormones and thyrotropin (TRH). Thyroid hormones participate in the development and proliferation of acinar cells, as well as in the secretion of pancreatic enzymes [5–7]. They also regulate proliferation and survival of islet cells, insulin sensitivity and insulin

synthesis [8, 9–11], and the reprogramming of pancreatic acinar cells to insulin-producing cells [11, 12].

Hyperglycemia and insulin resistance are highly related to subclinical and clinical hypothyroidism [13, 14]. The exocrine function of the pancreas seems also to be altered in hypothyroid subjects [15]. Even in euthyroid people, the serum concentrations of TRH, thyroxin (T<sub>4</sub>), and triiodothyronine (T<sub>3</sub>) have been directly associated with the serum glucose and insulin concentration, as well as with insulin resistance [16, 17]. In adult animals, thyroidectomy induces interstitial edema and degenerative changes in the pancreatic acinar cells decreasing the number and size of the zymogen granules [18]. In spite of the discrepancy regarding the effect of hypothyroidism on the concentration of glucose and insulin [8, 19–21], this hormonal condition affects the number and proliferation of islet cells and the content of extracellular

## Hypothyroidism Modifies Morphometry and Thyroid-Hormone Receptor Expression in Periurethral Muscles of Female Rabbits

Octavio Sánchez-García,<sup>1,2</sup> Julia Rodríguez-Castelán,<sup>1,3</sup> Margarita Martínez-Gómez,<sup>1,4</sup> Estela Cuevas,<sup>1</sup> and Francisco Castelan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

<sup>2</sup>Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, México

<sup>3</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

<sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México-DF, México

**Aim:** To evaluate the morphometry and thyroid-hormone receptor (TR) expression in pelvic (pubococcygeus, Pcm) and perineal (bulbospongiosus, Bsm) muscles of control and hypothyroid female rabbits. **Methods:** Hypothyroidism was induced administering 0.02% methimazole in the drinking water for one month. Hematoxylin-eosin stained muscle sections were used to evaluate the fiber cross-sectional area (CSA) and the number of peripheral myonuclei per fiber. Immunohistochemistry was used to calculate the proportion of TR immunoreactive nuclei per fiber. Significant differences were considered at a  $P \leq 0.05$ . **Results:** As compared to control rabbits, hypothyroidism increased the averaged fiber CSA and the myonuclei per fiber in the Bsm. Although the myonuclei number per fiber was also increased in the Pcm, the effect concerning the fiber CSA was only observed in a fraction of the Pcm fibers. Both TR $\alpha$  and TR $\beta$  were similarly expressed in the Pcm and Bsm. Hypothyroidism increased the expression of the TR $\alpha$  in the Bsm. Meanwhile, the expression of TR isoforms in the Pcm was not altered. **Conclusion:** Our findings support that the TR signaling is directly involved in morphometrical changes induced by hypothyroidism in the Pcm and Bsm. The effect of hypothyroidism on the Pcm and Bsm could be related to the different type of fiber and metabolism that these muscles have. *NeuroUrol. Urodynam.* 35:895–901, 2016. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** pelvic floor; perineum; skeletal muscle; thyroid hormones

### INTRODUCTION

Besides giving support to the pelvic viscera, the periurethral skeletal muscles show reflex activity that is relevant for the storage and the voiding of urine in mammals. The impairment of these muscles is associated with the onset of gynecological and urinary symptoms like pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence (SUI) in women. Aging, menopause, childbirth, and pregnancy are risk factors that impair the integrity of pelvic and perineal skeletal muscles.<sup>1</sup> Menopause and pregnancy in particular support the view that endocrine status influences the function and structure of pelvic and perineal skeletal muscles.

The link between thyroid dysfunctions and urinary alterations has been addressed by scant clinical studies. Hypothyroid women show a high micturition frequency, nocturia, and an elevated risk of developing urinary incontinence (UI).<sup>2,3</sup> In contrast, earlier studies suggested a relationship linking hypothyroidism with urinary retention,<sup>2,4</sup> possibly associated to a polyneuropathy affecting the intestines, urinary tract, and skeletal muscle.<sup>4</sup> A more recent study, having a level of evidence III and based on data from the National Health and Nutrition Examination Survey (n = 2875 women), showed that thyroid problems are important predictors for the development of mild SUI (incontinence a few times per year) and moderate (incontinence a few times per month) and severe (daily or weekly episodes of leak of urine) mixed UI.<sup>5</sup> As the particular contribution of hyper- and hypothyroidism was not evaluated in the last study,<sup>5</sup> it was assumed that UI is linked to hypothyroidism because this is more prevalent than hyperthyroidism.<sup>5,6</sup> Given that the impairment of pelvic muscles is

linked to the etiology of SUI (and partially that of mixed UI),<sup>7</sup> it would be relevant to evaluate whether hypothyroidism affects skeletal muscles involved in female micturition.

Thyroid hormones are essential for skeletal muscle physiology due to their involvement in metabolism, contraction, plasticity, damage, repair, and transitions of muscle fiber types.<sup>7–12</sup> Most of these actions depend on the interaction between thyroid hormones and thyroid-hormone receptors (TR) belonging to the superfamily of nuclear receptors that, acting as transcription factors, repress or activate the transcription of genes.<sup>12</sup> The expression of two main isoforms, the TR $\alpha$  and the TR $\beta$ , has been reported for hindlimb skeletal muscles, the soleus and the extensor digitorum longus, which supports the view that thyroid hormones act directly on skeletal muscles.<sup>7,8,11,12</sup>

Female rabbits have conspicuous pelvic and perineal skeletal muscles that make them suitable for evaluating function and morphometry.<sup>13–17</sup> Studies done in female rabbits have showed

Potential conflicts of interest: Nothing to disclose.

The present work was done at the Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta from the Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Dr. Kad-Érik Anderson led the peer-review process as the Associate Editor responsible for the paper.

Grant sponsor: CONACYT; Grant number: 225126 y 306226; Grant sponsor: Universidad Autónoma de Tlaxcala; Grant number: OACYPI-UIAT/2014

\*Correspondence to: Francisco Castelan, Ph.D., Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Car. Fed. Tlaxcala-Puebla Km 1.5, s/n, 90070 Tlaxcala México.

Email: fcastelan@uax.mx

Received 5 March 2015; Accepted 13 July 2015

Published online 7 August 2015 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/nuu.22842

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

## Distribution of thyroid hormone and thyrotropin receptors in reproductive tissues of adult female rabbits

Julia Rodríguez-Castelán<sup>a</sup>, Arely Anaya-Hernández<sup>b</sup>, Maribel Méndez-Tepepa<sup>c</sup>, Margarita Martínez-Gómez<sup>d,e</sup>, Francisco Castelán<sup>d,e</sup>, and Estela Cuevas-Romero 

<sup>a</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México; <sup>b</sup>Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, México; <sup>c</sup>Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México; <sup>d</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México-DF, México; <sup>e</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

### ABSTRACT

**Purpose:** Thyroid dysfunctions are related to anovulation, miscarriages, and infertility in women and laboratory animals. Mechanisms associated with these effects are unknown, although indirect or direct actions of thyroid hormones and thyrotropin could be assumed. The present study aimed to identify the distribution of thyroid hormones (TRs) and thyrotropin (TSHR) receptors in reproductive organs of female rabbits. **Material and Methods:** Ovary of virgin and pregnant rabbits, as well as the oviduct, uterus, and vagina of virgin rabbits were excised, histologically processed, and cut. Slices from these organs were used for immunohistochemical studies for TR $\alpha$ 1-2, TR $\beta$ 1, and TSHR. **Results:** The presence of TRs and TSHR was found in the primordial, primary, secondary, tertiary, and Graafian follicles of virgin rabbits, as well as in the corpora lutea, corpora albicans, and wall of hemorrhagic cysts of pregnant rabbits. Oviductal regions (fimbria-infundibulum, ampulla, isthmus, and utero-tubal junction), uterus (endometrium and myometrium), and vagina (abdominal, pelvic, and perineal portions) of virgin rabbits showed anti-TRs and anti-TSHR immunoreactivity. Additionally, the distal urethra, paravaginal ganglia, levator ani and iliococcygeus muscles, dorsal nerve and body of the clitoris, perigenital skin, and prostate had TRs and TSHR. **Conclusions:** The wide presence of TRs and TSHR in female reproductive organs suggests varied effects of thyroid hormones and thyrotropin in reproduction.

### ARTICLE HISTORY

Received 3 July 2015  
Revised 9 April 2016  
Accepted 19 April 2016

### KEYWORDS

Female prostate; ovary; oviduct; uterus; vagina

### Introduction

Thyroid hormones and thyrotropin (TSH) are linked to female reproduction. Both hyperthyroidism and hypothyroidism have been associated with menstrual disturbances, miscarriages, and infertility in women (1–2). Hyper or hypothyroid rats show modifications in the angiogenesis and proliferation of luteal cells of the corpus luteum (3), the amount of carbohydrates in the ovaries and endometrium (4), the oviductal and uterine contractility (5–6), the implantation sites and the incidence of resorptions (7–8), and the oxidative status of the uterus (9). Hypothyroidism increases the size of oviductal epithelial cells in rabbits (10). In dogs, hypothyroidism is associated with a reduced number and force of the uterine contractions (11). These effects of thyroid hormones or TSH could be related to

indirect actions (through gonadal steroids and gonadotropins) (1), as well as to direct actions by thyroid hormone receptors (TRs) or TSH receptors (TSHRs) present in female reproductive tissues.

In ovaries of women and rats, the expression of TR $\alpha$ 1-2, TR $\beta$ 1-2, and TSHR has been detected. Thus, the mRNA expression of TR $\alpha$ 1 and 2, TR $\beta$ 1 and 2, and TSHR has been reported for granulosa cells, ovarian stromal cells, and ovarian surface epithelial cells (12–14). A strong immunostaining anti-TSHR, -TR $\alpha$ 1, and -TR $\beta$ 1 has been observed in the ovarian surface epithelium and in primordial, primary and secondary follicles (15–17). Additionally, the corpus luteum of rats has TR $\alpha$ 1-2 and TR $\beta$ 1 (18). The corpus luteum of cows, but not the corpus hemorrhagic or the corpus albicans, shows immunolabeling for TSHR (19). Studies

**CONTACT** Estela Cuevas-Romero  [ecuevas@uatx.mx](mailto:ecuevas@uatx.mx)  Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México, Carretera Tlaxcala-Puebla Km 1.5. CP. 90062.

Color versions of one or more of the figures in this article can be found online at [www.tandfonline.com/enc](http://www.tandfonline.com/enc).

 Supplemental data for this article can be accessed at [www.tandfonline.com/enc](http://www.tandfonline.com/enc).

© 2016 Taylor & Francis

Research Article

## Hypothyroidism Reduces the Size of Ovarian Follicles and Promotes Hypertrophy of Periovarian Fat with Infiltration of Macrophages in Adult Rabbits

J. Rodríguez-Castellón,<sup>1</sup> M. Méndez-Tepepa,<sup>1</sup> Y. Carrillo-Peñafiel,<sup>1</sup> A. Anaya-Hernández,<sup>1</sup> J. Rodríguez-Antolín,<sup>1</sup> E. Zambrano,<sup>2</sup> F. Castellón,<sup>1,3</sup> and E. Cuevas-Ramos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Tlascal de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Tlax., México

<sup>2</sup>Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrition Salvador Zubirán, México City, México

<sup>3</sup>Departamento de Biología Celular y Patología, Instituto de Investigaciones Científicas, Unidad Periférica Tlaxcala, UNAM, Ciudad de México, México

Correspondence should be addressed to E. Cuevas-Ramos; [cuevas@utlx.mx](mailto:cuevas@utlx.mx)

Received 5 October 2016; Accepted 12 December 2016; Published 4 January 2017

Academic Editor: Leon Spilner

Copyright © 2017 J. Rodríguez-Castellón et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Ovarian failure is related to lipidemia and inflammation, as well as to hypertrophy and dysfunction of the visceral adipose tissue (VAT). Although hypothyroidism has been associated with obesity, dyslipidemia, and inflammation in humans and animals, its influence on the characteristics of ovarian follicles in adulthood is scarcely known. Control and hypothyroid rabbits were used to analyze the ovarian follicles, expression of aromatase in the ovary, serum concentration of lipids, leptin, and uric acid, size of adipocytes, and infiltration of macrophages in the periovarian VAT. Hypothyroidism did not affect the percentage of functional or atretic follicles. However, it reduced the size of primary, secondary, and tertiary follicles considered as large and the expression of aromatase in the ovary. This effect was associated with high serum concentrations of total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C). In addition, hypothyroidism induced hypertrophy of adipocytes and a major infiltration of CD68+ macrophages into the periovarian VAT. Our results suggest that the reduced size of ovarian follicles promoted by hypothyroidism could be associated with dyslipidemia, leptin, adiposity, and inflammation of the periovarian VAT. These findings may be useful to understand the influence of hypothyroidism in the ovarian function in adulthood.

### 1. Introduction

Obesity, dyslipidemia, and inflammation markers are common findings in women with ovarian infertility [1, 2]. Furthermore, hypertrophy and dysfunction of the visceral adipose tissue (VAT) have been associated with ovarian failure [3–5], suggesting an influence of periovarian environment in the follicles maturation. Other studies conducted in domestic and laboratory animals have confirmed that alterations in metabolism affect the ovarian function [6–9].

There is an important occurrence of infertility and anovulation in hypothyroid patients [10, 11], which may involve

metabolic alterations and inflammation [12, 13]. However, scarce studies have approached the influence of thyroid dysfunction in the ovarian failure. In adult rats, the effect of hypothyroidism on the ovarian function is confused depending on the estrous cycle phase [14]. Further studies are necessary to analyze the influence of hypothyroidism in the maturation of follicles in adulthood.

The present study therefore aimed to analyze the influence of hypothyroidism in the number and size of ovarian follicles and the aromatase expression in the ovary of adult rabbits. We also investigated the possible association between ovarian changes, metabolic indicators, and hypertrophy of periovarian VAT.

# Hypothyroidism Induces a Moderate Steatohepatitis Accompanied by Liver Regeneration, Mast Cells Infiltration, and Changes in the Expression of the Farnesoid X Receptor

Authors J. Rodríguez-Castellán<sup>1</sup>, A. Corona-Pérez<sup>2</sup>, L. Nicolás-Toledo<sup>1</sup>, M. Martínez-Gómez<sup>1,3</sup>, F. Castellán<sup>1,3</sup>, E. Cuevas-Romero<sup>1</sup>

Affiliations Affiliation addresses are listed at the end of the article

## Key words

- thyroid hormones
- liver
- FXR $\alpha$
- NASH
- methimazole

received 07.04.2016  
revised 28.06.2016  
accepted 14.07.2016

## Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-112367>  
Published online: 2016  
Exp Clin Endocrinol Diabetes  
© J. A. Barth Verlag in  
Georg Thieme Verlag KG  
Stuttgart · New York  
ISSN 0947-7349

## Correspondence

E. Cuevas-Romero, PhD  
Centro Tlaxcala de Biología de  
la Conducta  
Universidad Autónoma de  
Tlaxcala  
México, Carretera Tlaxcala-  
Puebla Km 1.5. C.P. 90070  
Tel.: +52(246)46 215 57  
Fax: +52(246)46 215 57  
ecuevas@uabx.mx

## Abstract

Hypothyroidism is associated with the development of non-alcoholic steatohepatitis, but cellular mechanisms have been scarcely analyzed. Thyroid hormones regulate the synthesis and secretion of bile acids that are endogenous ligands of the farnesoid receptor (FXR $\alpha$ ), which have been involved in the development of non-alcoholic steatohepatitis. However, the relationship between thyroid hormones and FXR $\alpha$  expression in the liver is yet unknown. Control (n=6) and methimazole-induced hypothyroid (n=6) female rabbits were used to evaluate the amount of lipids and glycogen, vascularization, hepatocytes proliferation, immune cells infiltra-

tion, and expression of FXR $\alpha$ . Student-*t* or Mann-Whitney *U* tests were carried out to determine significant differences. Hypothyroidism induced steatosis, glycogen loss, fibrosis, and a minor vascularization in the liver. In contrast, hypothyroidism increased the proliferation of hepatocytes and the infiltration of mast cells, but did not modify the number of immune cells into sinusoids. These changes were associated with a minor anti-FXR $\alpha$  immunoreactivity of periportal hepatocytes and pericentral immune cells. Our results suggest that hypothyroidism induces a moderate non-alcoholic steatohepatitis, allowing the hepatic regeneration. The FXR $\alpha$  may be involved in the development of non-alcoholic steatohepatitis in hypothyroid subjects.

## Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver illness in the world. Patients with NAFLD exhibit liver steatosis accompanied by a high infiltration of immune cells, fibrosis, a high level of low-density lipoprotein (LDL), insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. These patients also have a high risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1,2]. NAFLD is frequently observed in patients with clinical or subclinical hypothyroidism [3,4]. Indeed, a reduction in the serum concentration of thyroid hormones is a risk factor of mortality for cirrhotic patients in intensive care [5]. Data gathered from animal models have showed that hypothyroidism promotes oxidative stress and fibrosis in the liver [6–8], affects hepatic enzymes involved in the carbohydrate and lipid metabolism [9,10], and alters the expression of proteins associated with the lipid transport [11]. Overall, this evidence suggests that hypothyroidism and

the non-alcoholic steatohepatitis (NASH) are linked.

The farnesoid X receptor type  $\alpha$  (FXR $\alpha$ ) is a member of the nuclear receptor superfamily that can bind endogenous ligands like bile acids [12]. The activation of FXR $\alpha$  has been involved in the regulation of lipid and glucose metabolism, as well as in the inflammation, fibrosis, regeneration, and carcinogenesis of the liver [12]. Hepatitis and NASH are associated with a reduced expression of FXR $\alpha$  in the liver and the treatment with FXR $\alpha$  agonists reverses the steatosis and inflammation [12–14]. Although a relationship between thyroid hormones and bile acids has been reported [15–17], the influence of hypothyroidism on the FXR $\alpha$  in the liver is yet unknown.

The objectives of the present study were to analyze the effect of pharmacologically induced-hypothyroidism on: 1) steatosis signs, glycogen amount, and fibrosis, 2) vascularization, 3) proliferation, 4) immune cells infiltration, and 5) the expression of FXR $\alpha$  in the liver of female rabbits.

1 **Hypothyroidism affects the content of lipids and glycogen, and the PPAR- $\delta$  expression in the ovary of**  
2 **rabbits**

3 **Running title:** Hypothyroidism and lipid metabolism in the ovary

4

5 **Julia Rodríguez-Castelán<sup>A</sup>, Maribel Méndez-Tepepa<sup>A</sup>, Jorge Rodríguez-Antolín<sup>B</sup>, Francisco Castelán<sup>B,C</sup>,**  
6 **Estela Cuevas-Romero<sup>B</sup>**

7 <sup>A</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de  
8 Tlaxcala, Tlaxcala, TLAX, México

9 <sup>B</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, TLAX, México

10 <sup>C</sup>Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Unidad Foránea  
11 Tlaxcala, UNAM, Ciudad de México, México

12

13 **Correspondence to:** E Cuevas-Romero. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de  
14 Tlaxcala, Tlaxcala, TLAX, México. Carretera Tlaxcala-Puebla km. 1.5, 90070-Tlaxcala, Tlaxcala, México. Tel-  
15 Fax (+52) 2464621557. e-mail: [ecuevas@uatx.mx](mailto:ecuevas@uatx.mx)

16 F. Castelán. Departamento de Biología Celular y Fisiología. Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
17 Universidad Nacional Autónoma de México. Unidad Foránea Tlaxcala. Carretera Tlaxcala-Puebla km 1.5,  
18 90070-Tlaxcala, Tlaxcala, México. Tel. (+52) 5556225633. e-mail: [fc Castelán@iibiomedicas.unam.mx](mailto:fc Castelán@iibiomedicas.unam.mx)

19