



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

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

Efecto del hipotiroidismo en la expresión de GLUT4, LDH,  
PPAR $\gamma$  y aromatasa en el útero de conejas gestantes

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

**MARLEN ESPINDOLA LOZANO**

Directora

Dra. Estela Cuevas Romero

Tlaxcala, Tlax.

Marzo, 2020



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

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

Efecto del hipotiroidismo en la expresión de GLUT4, LDH,  
PPAR $\gamma$  y aromatasa en el útero de conejas gestantes

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

**MARLEN ESPINDOLA LOZANO**

**Comité Tutorial**

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Dr. Pablo Pacheco Cabrera

Dra. Estela Cuevas Romero

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2020

## **AGRADECIMIENTOS**

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

A CONACYT por la beca otorgada (298631).

Al comité tutorial por sus importantes aportaciones.

## RESUMEN

La gestación se define como el período de tiempo que transcurre entre la fecundación del óvulo por el espermatozoide y el momento del parto. Durante la gestación, el endometrio experimenta cambios morfológicos y bioquímicos. Uno de los cambios metabólicos más importantes que sufre el endometrio gestante es el metabolismo. La glucosa es la principal fuente de energía que utilizan las células endometriales, cuya entrada es facilitada a través de los transportadores de glucosa (GLUT4). La glucosa puede ser convertida a piruvato y lactato. Este último también es utilizado como fuente de energía y molécula señalizadora favoreciendo un microambiente ácido, angiogénesis, inmunoregulación y diferenciación del endometrio para facilitar la implantación. La utilización de la glucosa es modulada por diversos receptores como son los receptores activados por el proliferador de peroxisomas gamma (PPAR $\gamma$ ), cuyos ligandos son potentes sensibilizadores de insulina. Tanto el metabolismo de la glucosa como el transporte de la misma está bajo el control de las hormonas esteroideas (estradiol y progesterona), ambas sintetizadas localmente en el endometrio y miometrio. Las acciones de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo de la glucosa son diversas: regulan la secreción y los niveles circulantes de insulina, gluconeogénesis y glucogenólisis hepática, la captación de glucosa intestinal, la producción de lactato y el transporte del lactato en la célula mediando la expresión de transportadores de monocarboxilato (MCT) 4 y 1. El hipotiroidismo genera diversas alteraciones en el metabolismo de la glucosa y el almacenamiento del glucógeno en diversos tejidos. Además, las hormonas tiroideas regulan la síntesis y receptores de estrógenos. En el presente estudio evaluamos si el hipotiroidismo afecta la expresión de GLUT4, lactato deshidrogenasa (LDH), PPAR $\gamma$  y aromatasa durante la gestación mediante western blot. Encontramos que el hipotiroidismo modifica de manera diferencial la expresión de GLUT4, LDH, PPAR $\gamma$  y aromatasa en el útero dependiendo de la edad de la gestación y el sitio de implante. Así, el hipotiroidismo afecta la entrada de la glucosa en las células uterinas y su metabolismo, lo que podría relacionarse con el desarrollo de la preclamsia, partos prematuros, abortos e infertilidad observado en las mujeres con hipotiroidismo.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 Útero y gestación</b> .....	1
<b>1.2 Hormonas esteroideas y gestación</b> .....	3
<b>1.3 Metabolismo de la glucosa y transportadores de glucosa en el útero durante la gestación</b> .....	4
<b>1.4 Receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs) y homeostasis de la glucosa</b> .....	7
<b>1.5 Estradiol y metabolismo de carbohidratos</b> .....	10
<b>1.6 Hormonas tiroideas</b> .....	11
<b>1.7 Disfunciones tiroideas</b> .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
<b>2.1 Hipotiroidismo y gestación</b> .....	15
<b>2.2 Hormonas tiroideas y metabolismo de carbohidratos</b> .....	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	20
<b>7. RESULTADOS</b> .....	23
<b>7.1 Expresión de GLUT4 en útero</b> .....	23
<b>7.2 Expresión de la enzima LDH en útero</b> .....	24
<b>7.3 Expresión de PPAR<math>\gamma</math> en útero</b> .....	25
<b>7.4 Expresión de la enzima aromatasa en útero</b> .....	26
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	27
<b>8.1 Expresión de GLUT4 en útero</b> .....	27
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	32
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	33
<b>11. REFERENCIAS</b> .....	34
<b>12. GLOSARIO</b> .....	45
<b>13. ANEXOS</b> .....	48
<b>14. PUBLICACIONES</b> .....	50

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Útero y gestación

La gestación se define como el período de tiempo que transcurre entre la fecundación del óvulo por el espermatozoide y el momento del parto. Esta comprende procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo del feto en el interior del útero materno. Durante este periodo y bajo el control de las hormonas esteroideas (estradiol y progesterona), el endometrio experimenta grandes cambios morfológicos y bioquímicos como preparación para la implantación embrionaria (Su y Fazleabas 2015). La implantación requiere de la remodelación del endometrio, la progesterona es el principal impulsor de este proceso de diferenciación llamado decidualización (Gutmacher y cols. 2014). La decidua es un tejido especializado que se forma durante la fase secretora del ciclo menstrual, se compone de glándulas, células inmunes, células del estroma y vasos sanguíneos y linfáticos. En mamíferos se presentan variaciones según el tipo de especie. La implantación en mamíferos se considera invasiva, el trofoblasto es el primer componente embrionario que dará origen a la placenta. El corion es un tejido que tiene por objetivo formar vellosidades que absorban nutrientes y oxígeno desde la sangre materna y trasportarlos hacia la masa celular interna a partir de la cual se formará el cuerpo del embrión (Menkhorst y cols. 2017).

La invasión del trofoblasto dentro del útero conduce a la formación del sincitiotrofoblasto en un ambiente relativamente hipóxico que favorece la proliferación e invasión hacia los vasos sanguíneos y glándulas uterinas que nutrirán al embrión (Schanz y cols. 2014). Durante esta etapa, las hormonas esteroides inducen la maduración de las glándulas uterinas, proliferación y diferenciación de las células endometriales, así como la secreción de moléculas que influyen en el desarrollo del trofoblasto. La implantación y placentación requieren la acción espacio-temporal de diversas hormonas como los estrógenos y la progesterona, con acciones endócrinas y parácrinas, así como cambios metabólicos (glucosa, piruvato, lactato y ácidos grasos), sistema inmunitario (innato y adquirido), y la expresión de moléculas de adhesión (Bhurke y cols. 2016; Stavreus 2012; Takashi y cols. 2012).

El crecimiento y el desarrollo del embrión, así como, la vascularización de la placenta son eventos importantes regulados por hormonas esteroideas, las cuales participan en la angiogénesis y el crecimiento en los tejidos reproductivos. Así mismo, los estrógenos regulan la angiogénesis y la placentación a través de activar a las células natural killer promoviendo que secreten factores de crecimiento como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiopoyetina-2 y el factor de crecimiento placentario (Gibson y cols. 2015). La placenta madura está formada por el sincitiotrofoblasto, el citotrofoblasto, el mesodermo extraembrionario y el endotelio de los vasos coriales (Figura 1).

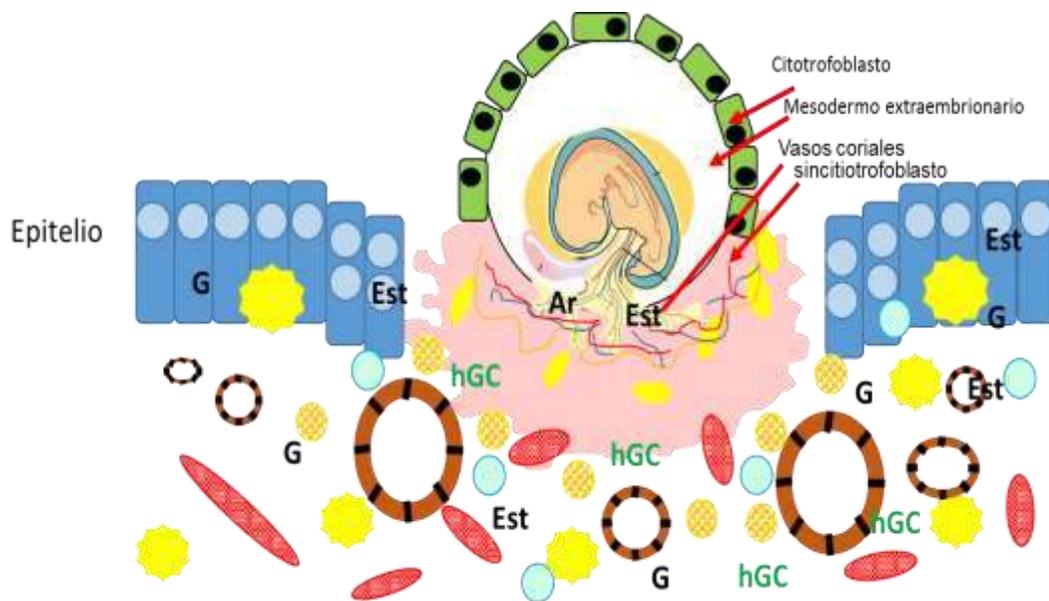


Figura 1. Proceso de formación de la placenta. La placenta se forma durante las 3 primeras semanas de gestación en el humano, abarcando los procesos de preimplantación, implantación y decidualización que preparan al organismo para realizar la diferenciación de la membrana embrionaria y comenzar con la formación de las membranas placentarias. Glucosa (G); estradiol (Est); hormona gonadotrofina (hGC).

Fallas en la implantación, mal funcionamiento de la placenta, alteraciones genéticas y alteraciones en el factor de crecimiento angiogénico pueden conllevar a abortos durante el primer trimestre, insuficiencia placentaria y otras complicaciones (Menkhorst y cols. 2017; Reynolds y cols. 2015).

## 1.2 Hormonas esteroideas y gestación

El útero se somete a una remodelación celular durante cada ciclo. Los cambios celulares uterinos durante el ciclo y la gestación son regulados por los niveles circulantes de hormonas esteroideas sexuales ováricas: progesterona y estradiol. Estas hormonas juegan un papel clave en el comienzo, desarrollo y finalización de la gestación. Una disminución en la concentración podría condicionar el síndrome de Dawn, retraso del crecimiento intrauterino e incidentes de muerte fetal (Shmagel y Chereshev 2004). La progesterona es producida en gran medida por el cuerpo lúteo hasta aproximadamente las 10 semanas de gestación, posteriormente la placenta se encarga de producir esta hormona; produce aproximadamente 250 mg/día. Casi toda la progesterona producida por la placenta ingresa a la placenta, en contraste con el estrógeno. La progesterona es importante en la supresión de la respuesta inmunológica materna a los antígenos fetales, evitando así el rechazo materno del trofoblasto. La progesterona prepara y mantiene el endometrio para permitir la implantación (Pratap y Navneet 2012).

Los estrógenos (estradiol y estrona), en conjunto con otras hormonas, aumentan su concentración para asegurar la implantación. Los estrógenos se sintetizan con ayuda de la enzima aromatasa, la cual cataliza la aromatización de los andrógenos fetales y maternos en estrógenos. La hormona folículo estimulante (FSH) regula la expresión de dicha enzima (Sacchi y cols. 2016). Dicha enzima se expresa en diferentes tejidos, pero el ovario y la placenta (sincitiotrofoblasto) son los órganos con mayor actividad biológica de aromatización (Mendelson y cols. 2005). Se ha reportado que el crecimiento y el desarrollo del embrión, así como la vascularización de la placenta son eventos importantes regulados por hormonas esteroideas. Estas participan en la angiogénesis y el crecimiento en los tejidos reproductivos, incluyendo la placenta, y regulan el flujo sanguíneo (Reynolds y cols. 2015). Los estrógenos son hormonas esenciales para la regulación de la fertilidad. La respuesta celular a los estrógenos está mediada por receptores de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y beta del receptor de estrógeno ( $ER\beta$ ). Por lo tanto, una alteración puede repercutir en problemas de infertilidad. Dentro de los sitios principales de expresión de  $ER\alpha$  se encuentra el útero e hipófisis; en cuanto a  $ER\beta$  se expresa en las células de la granulosa del ovario (Rumi y cols. 2017).

Particularmente, el  $17\beta$ -estradiol desempeña un papel indispensable en la proliferación del endometrio mediante la activación de múltiples vías de señalización. La concentración de esta hormona, la expresión de la aromatasa y los ER $\alpha$  y  $\beta$  se aumentan después de la fertilización, favoreciendo la proliferación del estroma uterino e hiperplasia en glándulas endócrinas (Mouzat y cols. 2007). El útero (endometrio y miometrio) sintetiza  $17\beta$ -estradiol durante la gestación (Franczak y Kotwica 2008). Además, los estrógenos inducen un rápido aumento del calcio intracelular en el blastocisto promoviendo su implantación (Zhang y cols. 2017)

Durante el primer trimestre del embarazo, el  $17\beta$ -estradiol es esencial para el desarrollo normal de la placenta, pero un aumento en la concentración puede conducir a la formación anormal de la placenta aumentando la apoptosis que podría desencadenar complicaciones en el embarazo, incluyendo la infertilidad y la insuficiencia útero-placentaria (Patel y cols. 2015). El  $17\beta$ -estradiol inhiben la luteólisis, prolongando de este modo la producción de progesterona por el cuerpo lúteo (Waclawik y cols. 2017). Por otra parte, se ha descrito que el  $17\beta$ -estradiol regular el flujo sanguíneo útero-placentario; pero un exceso causa implantación anormal de la placenta, restringiendo el crecimiento intrauterino del feto (Corcoran y cols. 2014). 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).

### **1.3 Metabolismo de la glucosa y transportadores de glucosa en el útero durante la gestación**

La glucosa es el sustrato primario para el metabolismo de la energía fetal. La insulina estimula la captación de esta molécula mediante el reclutamiento de transportadores de glucosa (GLUT) sensibles a la insulina. Los GLUT son responsables del transporte de glucosa a través de la membrana celular, de los 14 miembros de la familia, la expresión de nueve se ha informado en el útero (Tabla 1). Los GLUT varían en términos de especificidad de sustrato, cinética, localización y expresión en tejidos. En términos de estructura, todas las proteínas GLUT son codificadas por la familia de genes SLC2A (Von Wolff y cols. 2003).

Particularmente, el GLUT4 (SLC2A4) es un modulador de la homeostasis normal de la glucosa en los tejidos, se ha descrito que la disfunción de GLUT4 conduce a resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. La captación y la utilización de la glucosa juegan un papel crucial en la implantación, el desarrollo embrionario, GLUT4 en el endometrio contribuye al metabolismo de la glucosa en respuesta a la estimulación de progesterona (Cui y cols. 2015).

Glucose transporter (GLUT (SLC2 family)) expression in the uterus.

Transporter	$K_m$ for glucose	Endometrium	Tissue distribution	References
SLC2A1 (GLUT1)	3	Whole uterus (R, M, H) Stroma (M, H) Decidua (M, H) Luminal epithelium (M, H) Glandular epithelium (M, H)	Ubiquitous Highest in erythrocytes and brain	Yamaguchi <i>et al.</i> (1996), Welch & Gorski (1999), Korgun <i>et al.</i> (2001), von Wolff <i>et al.</i> (2003), Frolova <i>et al.</i> (2009), Kim & Moley (2009) and Frolova & Moley (2011)
SLC2A3 (GLUT3)	1.5	Stroma (M, H) Decidua (M, H)	Brain, placenta, and preimplantation embryo	Yamaguchi <i>et al.</i> (1996), Hahn <i>et al.</i> (2001), von Wolff <i>et al.</i> (2003), Korgun <i>et al.</i> (2005) and Frolova & Moley (2011)
SLC2A4 (GLUT4)	2-10	Whole uterus (R, M, H) Stroma (R, M) Decidua (R, M) Luminal epithelium (R, M, H) Glandular epithelium (R, M)	Skeletal muscle, adipose tissue, and heart	Welch & Gorski (1999), Korgun <i>et al.</i> (2001), von Wolff <i>et al.</i> (2003), Mozzanega <i>et al.</i> (2004), Kohan <i>et al.</i> (2010) and Frolova & Moley (2011)
SLC2A6 (GLUT6)	NA	Stroma (M, H) Decidua (M, H)	Leukocytes, brain, and spleen	Frolova & Moley (2011)
SLC2A8 (GLUT8)	2	Whole uterus (M, H) Stroma (M, H) Decidua (M, H) Luminal epithelium (M) Glandular epithelium (M)	Testis, brain, liver, heart, skeletal muscle, and adipose tissue	Flessner & Moley (2009), Kim & Moley (2009) and Frolova & Moley (2011)
SLC2A9 (GLUT9)	0.6	Stroma (M, H) Decidua (M, H)	Kidney, liver, small intestine, placenta, and lung	Kim & Moley (2009) and Frolova & Moley (2011)
SLC2A10 (GLUT10)	0.3 (2-DG)	Stroma (M, H) Decidua (M, H)	Heart, lung, brain, liver, skeletal muscle, placenta, and kidney	Frolova & Moley (2011)
SLC2A12 (GLUT12)	NA	Stroma (M, H) Decidua (M, H)	Skeletal muscle, heart, small intestine, and prostate	Frolova & Moley (2011)

R, rat; M, mouse; H, human.

Tabla 1. Expresión de GLUT en útero. Tomado de Frolova y Moley 2011.

Al ingresar a la célula, la glucosa puede continuar por varias vías metabólicas: 1) oxidación a través de la glucólisis, seguida por el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria en las mitocondrias para proporcionar energía como ATP; 2) almacenamiento como glucógeno; 3) oxidación a través de la vía de las pentosas. Cada una de estas vías está catalizada por una serie de enzimas. El proceso de decidualización se caracteriza por la regulación al alza de transportadores de glucosa y el aumento de la captación de glucosa (Frolova y cols. 2011).

El metabolismo de la glucosa en el útero incluye el almacenamiento de glucógeno en las células epiteliales endometriales durante la implantación (Frolova y Moley 2011). El cual se usa como reserva en caso de que la gestación ocurra (Dean y cols. 2014). El contenido de glucógeno en el endometrio depende de estradiol, mediante la regulación de la glucógeno sintetasa; mientras que, la progesterona promueve su catabolismo (Bowman y Rose 2016). En caso de que la glucosa no se almacene en forma de glucógeno y continúe su ruta de glucólisis se formará piruvato. Este es transferido desde el citosol hasta la matriz mitocondrial mediante proteínas transportadoras de piruvato mitocondrial (Bricker 2012). Cada molécula de glucosa produce dos moléculas de piruvato. El piruvato puede ser transformado a lactato, o bien, ser convertido en oxalacetato y entrar al ciclo de Krebs (Larrabee 1989). La glucólisis seguida de la fermentación láctica produce dos moléculas de lactato por cada glucosa degradada. Cuando la tasa glucolítica se ve incrementada, parte del lactato producido es transportado al espacio extracelular en donde se puede incorporar a otros tejidos para proveer energía al ser oxidado a piruvato e incorporarlo al ciclo del ácido cítrico. La producción de lactato se produce principalmente en el citoplasma celular en condiciones hipóxicas, o como consecuencia del alto flujo de glucólisis en células en proliferación (Pucino y cols. 2017).

La principal fuente de energía durante la implantación es aportada por el ciclo glucosa- piruvato- lactato (Biggers y Stern 1973). El primer paso en la utilización de la glucosa es su absorción en la célula, que puede ser mediada por los transportadores de glucosa (GLUT) (Augustin 2010). Durante las primeras etapas de división celular posterior a la fertilización, el piruvato se convierte en la fuente de carbono preferida por el cigoto para su maduración. Más tarde la glucosa, pasa a ser el principal nutriente del blastocisto (Hu y Yu 2017). La glucólisis es un medio para asegurar un alto aporte de energía para satisfacer la demanda metabólica. Además, la glucosa modula proteínas como GRP78, la cual desempeña un papel importante en la reproducción femenina, incluyendo el desarrollo folicular, del cuerpo lúteo, decidualización y formación de la placenta (Zhang y cols. 2017).

El lactato se genera a partir del piruvato a través de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH; Bouzier-Sore y cols. 2003). Este ayuda en el desarrollo de un microambiente ácido, promoviendo la angiogénesis, inmunorregulación y el desglose del endometrio para facilitar la implantación (Gardner 2015). Además, el lactato también puede desempeñar funciones a

través del receptor de ácido hidroxicarboxílico 1 (HCAR1), también conocido como GPR81/FKSG80 (Wagner y cols. 2015). El GPR81 se expresa en el útero y aumenta durante el embarazo, además modula la síntesis de metaloproteinasas, angiogénesis y producción de mediadores pro-inflamatorios (Madaan y cols. 2017). Conforme avanza el desarrollo de la gestación, la cantidad de lactato producido por el blastocisto se incrementa significativamente (Clough y Whittingham 1983). Para que la implantación tenga éxito, el blastocisto no sólo tiene que invadir el tejido circundante endometrial, sino que tiene que remodelar la vasculatura y al mismo tiempo modular el sistema inmune local de la madre. Durante el proceso de formación de la placenta se produce un estado de hipoxia, de manera que se generan altas concentraciones de lactato, provenientes del feto y del útero (Martins y cols. 2007). Existe escasa información sobre el papel del lactato en la degeneración del cuerpo lúteo; sin embargo, se ha reportado que aumenta en la fase de luteólisis (Mitra y cols. 1980). Durante el parto, la demanda metabólica aumenta en respuesta a las contracciones del miometrio, el glucógeno y la glucosa son utilizados por las células de músculo liso del miometrio para producir ATP bajo condiciones anaeróbicas. Esto promueve la acumulación de metabolitos intermedios como el lactato, el cual favorece las contracciones uterinas (Martins y cols. 2013). Los transportadores de monocarboxilato (MCT) facilitan el movimiento de lactato dentro y fuera de las células. Se han reportado diversas isoformas. El MCT4 se encuentra en células deciduales recién formadas; mientras que, el MCT1 se localiza rodeando las células indiferenciadas suponiendo consumo de lactato para la proliferación (Zuo y cols. 2015).

#### **1.4 Receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs) y homeostasis de la glucosa**

Los PPAR son activados por ligandos (Tabla 2) y regulan genes importantes en la diferenciación celular y diversos procesos metabólicos, especialmente la homeostasis de los lípidos y la glucosa. Dichos receptores heterodimerizan con los receptores del ácido retinoico 9-cis (RXR). Los PPAR interactúan con los RXR en ausencia y / o presencia de un ligando. El heterodímero se une a una secuencia corta de ADN, mediante un elemento de respuesta para PPAR (PPRE), en las regiones promotoras de los genes diana (Figura 2). La familia

PPAR incluye tres isotipos: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ . Todas las isoformas de PPAR se expresan en tejidos reproductivos de muchas especies, incluyendo el ovario, el útero y la placenta (Sahay 2015).

List of natural and synthetic PPAR $\gamma$  ligands.

Natural ligands					Synthetic	
Unsaturated FA	Oxidized PUFA derivatives	Nitrated fatty acids	Flavonoids	Other nutrients	Man-made environmental	Drugs
LA EPA (Marion-Letellier et al., 2008)	15dPG <sub>2</sub> 15dPG <sub>3</sub> PG <sub>2</sub>	Nitrolinoleic acid (Narala et al., 2014)	Curcumin (Zhang et al., 2006)	Glutamine (Fiatte et al., 2008; Sato et al., 2006)	Phthalates Bisphenols	Glitazones
DHA (Marion-Letellier et al., 2008) CLA (Yu et al., 2002)	9-HODE 13-HODE 15-HETE LTE <sub>4</sub> (Paruchuri et al., 2008) NPD1 (Zhao et al., 2011) RvD1 (Liao et al., 2012)	Nitrooleic acid (Narala et al., 2014; Schopfer et al., 2005)	Capsaicin (Kim et al., 2004)  Resveratrol (Ulrich et al., 2006) EGCG genistein	Arginine (Liu et al., 2008)  Butyrate (Kinoshita et al., 2002; Wachtershauser et al., 2000)		

Tabla 2. Lista de ligandos naturales y sintéticos de PPAR $\gamma$ . Tomado de Marion-Letellier y cols. 2016.

En cuanto a PPAR $\gamma$  se ha descrito que el gen tiene promotores separados y exones 5', da como resultado dos ARNm: PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2, los cuales se expresan diferencialmente en tejidos. Los PPAR son sensores de lípidos y regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos y la glucosa. Se ha descrito que PPAR $\gamma$  regula genes que participan en la liberación, transporte y almacenamiento de ácidos grasos como la lipoproteína lipasa (LPL) y el transportador de ácidos grasos CD36 (Janani y Ranjitha 2015).

En la gestación, PPAR $\gamma$  participa en la vascularización de la placenta y contracción del endometrio, así como en la síntesis y secreción de leptina y hormona de crecimiento placentario humano (Marion-Letellier y cols. 2016). Este receptor regula la remodelación tisular, angiogénesis, diferenciación bioquímica y morfológica del trofoblasto durante la implantación y placentación. Por otra parte, PPAR  $\gamma$  está relacionado con los receptores de

hormonas esteroideas que cumplen múltiples funciones en la regulación de la función reproductiva. Así, PPAR  $\gamma$  modifica la capacidad esteroidogénica al modular la expresión de enzimas en tejidos reproductivos siendo un mediador clave de las acciones biológicas del receptor de progesterona (Kaczynski y cols. 2011). Los PPAR $\gamma$  son proteínas dependientes de ligando y se activan por factores endógenos y exógenos. Los activadores endógenos incluyen ácidos grasos insaturados, lípidos oxidados, eicosanoides específicamente prostaglandinas y leucotrienos. El ácido araquidónico, un ácido graso esencial almacenado en los fosfolípidos de membrana, es el precursor primario de las prostaglandinas, que se sintetizan y secretan en el útero (Szczepańska y cols. 2018).

De igual manera se ha descrito que la activación de PPAR $\gamma$  tiene efectos beneficiosos en la homeostasis de la glucosa. El PPAR $\gamma$  ha sido el centro de investigación intensa durante la última década porque los ligandos de este receptor han surgido como potentes sensibilizadores de insulina que se pueden usar en el tratamiento de la diabetes tipo 2. El aumento de los niveles de ácidos grasos libres circulantes y la acumulación de lípidos en el tejido no adiposo se han relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina. Esta situación es mejorada por agonistas de PPAR $\gamma$ . Las tiazolidinedionas son fármacos sensibilizadores de la insulina que promueve, al igual que PPAR $\gamma$ , el almacenamiento de ácidos grasos en depósitos de grasa y regula la expresión de hormonas secretadas de adipocitos que afectan la homeostasis de la glucosa (Figura 2; Cho y cols., 2008). En modelos animales, la rosiglitazona, agonista de PPAR $\gamma$ , mejora la hiperglucemia en ratas diabéticas (Xu y cols., 2006). Otros estudios clínicos con tiazolidinedionas sugieren que los efectos directos de estos agentes hipoglucemiantes sobre el tejido adiposo pueden contribuir a mejorar la sensibilidad a la insulina hepática y periférica y a la esteatosis hepática en pacientes con diabetes tipo 2, lo que sugiere un papel importante de los PPAR $\gamma$  en la homeostasis de la glucosa (Sharma y Staels 2007).

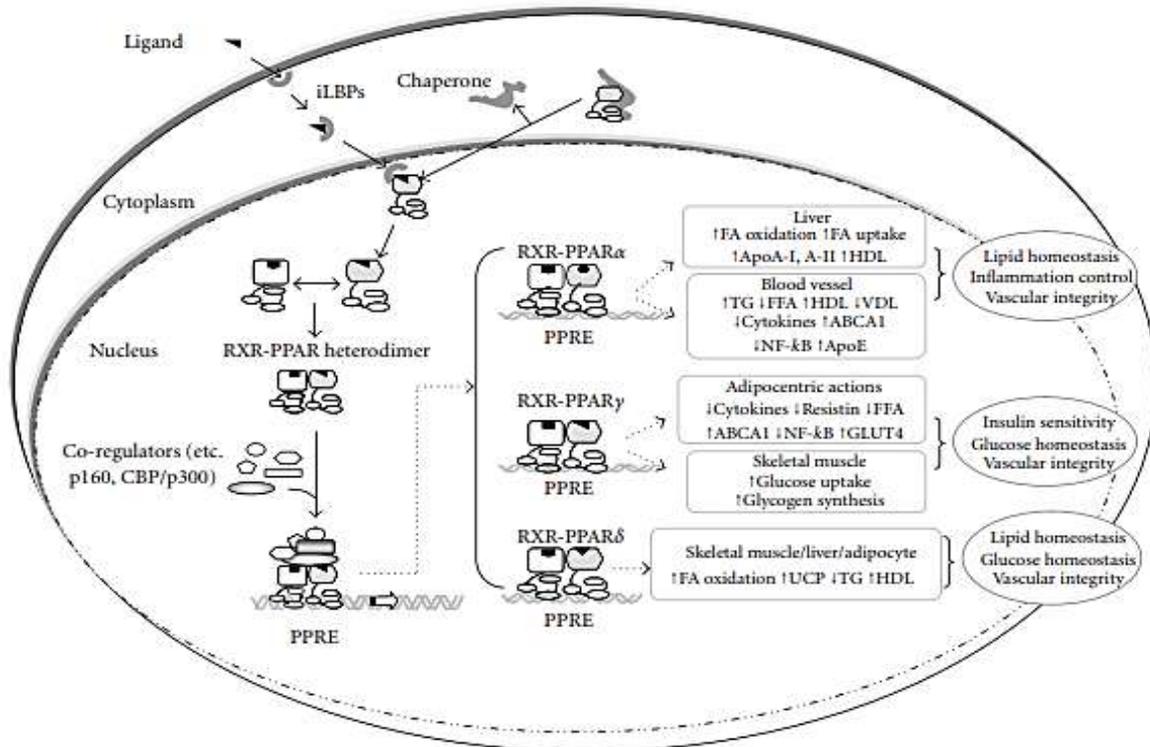


Figura 2. Vías de señalización para activar PPARs y los efectos biológicos del PPAR en diferentes órganos. Tomado de Sahay 2015.

## 1.5 Estradiol y metabolismo de carbohidratos

El  $17\beta$ -estradiol modula el metabolismo de la glucosa induciendo la expresión de diversas enzimas como la enzima piruvato quinasa (PK) la cual se encarga de convertir fosfoenolpiruvato en piruvato (Salama y cols. 2014). Además, la glucólisis en el endometrio es regulada por estradiol (Salama y cols. 2014). El  $17\beta$ -estradiol modula la expresión de GLUT4 en músculo esquelético dando como resultado una mejoría notable en la captación muscular de glucosa. En ratas macho con diabetes severa, el  $17\beta$ -estradiol mejora la captación de glucosa por parte del músculo esquelético además de aumentar las células  $\beta$  en el páncreas, y ambos factores contribuyen a reducir los niveles elevados de glucosa en sangre (Inada y col. 2016).

## 1.6 Hormonas tiroideas

La glándula tiroides secreta principalmente dos hormonas: la tiroxina ( $T_4$ ) y la triyodotironina ( $T_3$ ). La  $T_4$  circulante es secretada por la glándula tiroides, mientras que la mayoría de la  $T_3$  (alrededor del 80%) se genera por la desyodación de  $T_4$  en los tejidos periféricos por la acción de las desyodasas tipo I o tipo II (D1 o D2; Citterio y cols. 2017). La D1 se expresa en hígado, endometrio y riñón; mientras que la D2 se encuentra en tejido adiposo, placenta, sistema nervioso central y endometrio. Por su parte, la D3 es expresada en placenta, sistema nervioso central y endometrio (Germain y cols. 2009).

La captación de yoduro es la primera etapa en la síntesis de hormonas tiroideas. Este ion se une a proteínas séricas, en especial a la albúmina, y es captado por la tiroides. La captación de yoduro está mediada por el co-transportador NIS (del inglés, Na/I symporter), introduciéndolo y permitiendo que la penndrina lo lleve hacia la luz del tirocito (coloide). Posteriormente, la oxidación del yoduro (donde participa el peróxido de hidrógeno) se produce mediante la enzima tiroperoxidasa (TPO). En esta oxidación, el yoduro se convierte en yodo libre. El ion yodo se incorpora (yodación) a la tiroglobulina (Tg) mediante la TPO, para producir las yodotirosinas. Así, se forman las monoyodotirosinas (MIT) y diyodotirosinas (DIT). La TPO participa en el acoplamiento de las yodotirosinas para formar  $T_4$  y  $T_3$  (Figura 3). Finalmente, el contenido vesicular de las células foliculares es liberado al torrente sanguíneo para ser transportadas mediante proteínas plasmáticas como globulinas, albúminas y transtirreninas, dirigiéndose al receptor de hormonas tiroideas en diferentes órganos (Carvalho y cols. 2017).

La mayor parte de la  $T_3$  y  $T_4$  circulan en sangre ligadas principalmente a la globulina fijadora de tiroxina (TBG) y sólo una pequeña cantidad viaja en forma libre (Daniell y Nucera 2016). La homeostasis de las hormonas tiroideas en sangre ocurre mediante el mecanismo de retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que estimula la síntesis y secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en la hipófisis. La TSH, a su vez, estimula a la glándula tiroides para que sintetice a las hormonas tiroideas  $T_4$  y  $T_3$  (Abalovich y cols. 2007).

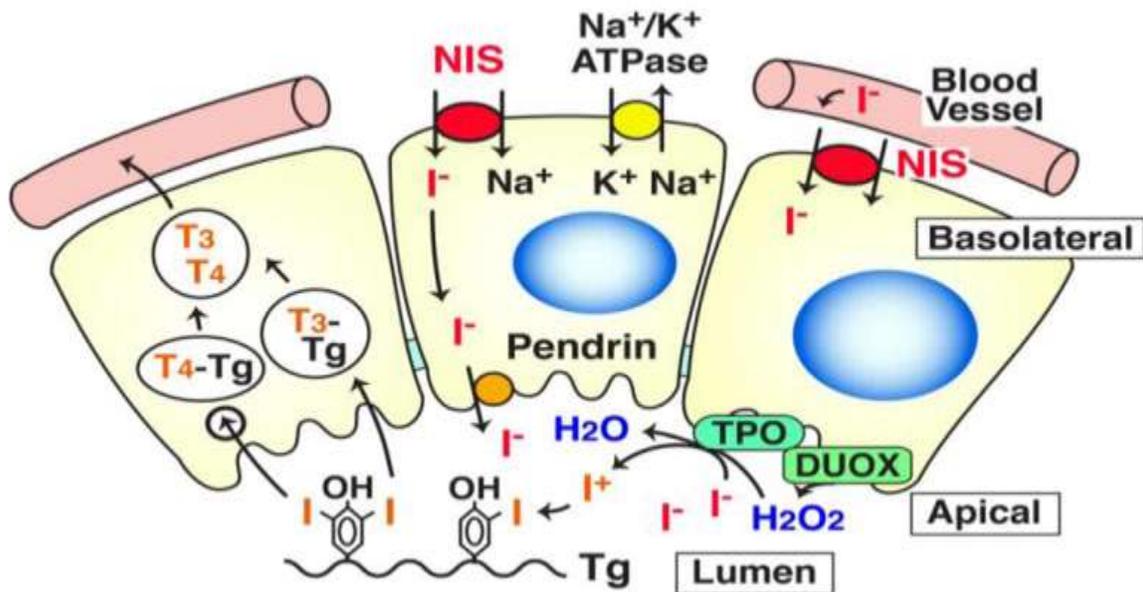


Figura 3. Biosíntesis de hormonas tiroideas. El proceso inicia cuando los tirocitos captan el yoduro mediante transportadores de yodo soluble ( $Na^+/I^-$ ). Consecuentemente se produce la oxidación del yodo (debido al peróxido de hidrógeno) por acción de la enzima tiroperoxidasa (TPO), así el yoduro se incorpora a la tiroglobulina mediante la TPO para producir yodotirosinas, monoyodotirosinas y diyodotirosinas, moléculas que forman a las hormonas tiroideas. Tomado de Kogai y Brent 2012.

Las hormonas tiroideas actúan a través de dos vías distintas: nuclear y no nuclear. La vía nuclear ocurre a través de receptores específicos que se localizan predominantemente en el núcleo celular. Las hormonas tiroideas ingresan a la célula mediante transportadores de monocarboxilato (MCT), proteínas transportadoras de anión orgánico (OATPC) y transportadores de aminoácidos de tipo L (LAT), para posteriormente unirse al receptor de hormona tiroidea. El mecanismo de acción consiste en que dicho receptor heterodímeriza con RXR, complejo que, a su vez, se une a un fragmento de ADN conocido como elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) presente en algunos genes (Figura 3; Pascual-Aranda 2013). Estos receptores son codificados por dos genes  $\alpha$  y  $\beta$ , los cuales se expresan en diversos tejidos como músculo esquelético, tejido adiposo, cerebro, hígado, riñón, hipófisis, hipotálamo, útero, oviducto, etc. (Flamant y Gauthier 2013).

En cuanto a la vía no nuclear, esta puede ocurrir dentro de un corto tiempo, puede estar mediado por vías de señalización que incluye AMPc y proteínas quinasas. Se ha

demostrado que las acciones iniciadas en la membrana plasmática comienzan en un sitio de unión del receptor de integrinas  $\alpha V\beta 3$ , el cual tiene dos sitios de unión. Un sitio es exclusivo de  $T_3$  la cual activa la ruta del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) regulando procesos como angiogénesis, apoptosis e invasión celular. El segundo sitio se une tanto a  $T_3$  como a  $T_4$  y activa la proteína quinasa C (PKC), Ras, Raf 1 y MEK, modulando procesos como proliferación y diferenciación celular (Goemann y cols. 2017; Figura 4).

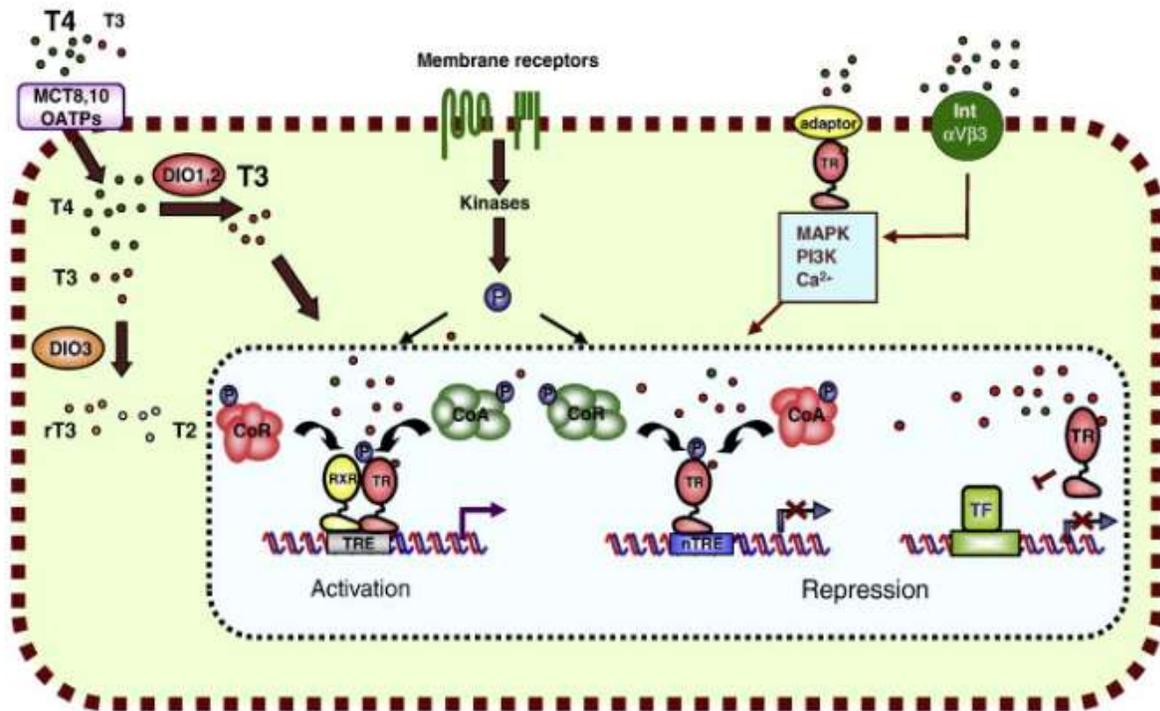


Figura 4. Mecanismo de acción del receptor de hormonas tiroideas. Dentro de la célula, las desyodasas (D1 y D2) convierten a la  $T_4$  a  $T_3$ , se unen a los TRs que se heterodimerizan con el receptor de ácido retinoico RXR. Dicho complejo se une a elementos de respuesta de hormonas tiroideas TRE, ubicados en la región reguladora de los genes diana. La actividad se rige por un intercambio de co-represores (CoR) y co-activadores (CoA). En la vía no genómica las hormonas tiroideas se unen al receptor de integrinas y activan diferentes vías de señalización. Tomado de Pascual-Aranda 2013.

## **1.7 Disfunciones tiroideas**

Existen diversas patologías asociadas a la alteración en la síntesis de hormonas tiroideas. Cuando existe un exceso de ellas en sangre se conoce como hipertiroidismo; mientras que, el déficit se denomina hipotiroidismo (Xia y cols. 2018). Dado que la presente tesis estudiará solo al hipotiroidismo, nos referiremos solo a esta disfunción tiroidea. Así, el hipotiroidismo, dependiendo de los niveles de hormonas tiroideas y TSH, se puede clasificar en hipotiroidismo clínico o hipotiroidismo subclínico. El primero ocurre cuando la concentración sérica de hormonas tiroideas es baja y los niveles de TSH son altos. El segundo se presenta cuando hay niveles normales de hormonas tiroideas y niveles de TSH altos. Este último, si no se trata, progresa a hipotiroidismo clínico en un corto plazo (Kostoglou-Athanassiou y Ntalles 2010). Diversos signos y síntomas se presentan en esta patología incluyendo: intolerancia al frío, aumento de peso, estreñimiento, piel seca, caída de cabello, enfermedades cardiacas, ronquera, fatiga, alteración en la cognición, infertilidad y alteraciones del ciclo menstrual (Dunn y Turner 2016). Particularmente, el hipotiroidismo es uno de los trastornos endocrinos más comunes durante el embarazo. Las hormonas tiroideas en esta etapa son esenciales para el metabolismo, el desarrollo y el crecimiento normal de los órganos fetales (Tingi y cols. 2016).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Hipotiroidismo y gestación

Las hormonas tiroideas están implicadas en el control del ciclo menstrual y en la fertilidad. Estas hormonas también están implicadas en el desarrollo de la placenta, diferenciación celular y desarrollo embrionario (Chen y cols. 2015). En la rata, la T3 regula el crecimiento del trofoblasto (Matsuo y cols. 1993). Además, el endometrio y miometrio de conejas (Rodríguez-Castelán y cols. 2017) mujeres y otros primates tienen TRs (Aghajanova y cols. 2011), lo que sugiere una acción directa de estas hormonas sobre el útero.

En hembras gestantes, la disminución de TR $\alpha$  y TR $\beta$  en el tejido decidual está relacionado con abortos espontáneos (Ziegel Müller y cols. 2015). A este respecto, la T4 y la T3 se encuentran en la placenta y el líquido amniótico (Thuróczy y cols. 2017), y que tanto el endometrio como el miometrio expresan TRs y TSHR (Aghajanova y cols. 2011 Colicchia y cols. 2014; Rodríguez-Castelán y cols. 2017). Ello sugiere que las hormonas tiroideas podrían ser importantes para el proceso de decidualización del endometrio, así como para la implantación y crecimiento del embrión. En modelos animales, las hormonas tiroideas están implicadas en el desarrollo de la placenta modificando su metabolismo, diferenciación celular desarrollo embrionario (Tingi y cols. 2016). La T3 puede regular el crecimiento del trofoblasto (Matsuo y cols. 1993)

El hipotiroidismo es frecuente en el embarazo. Se estima que la incidencia de hipotiroidismo durante el embarazo es de 0.3% a 0.5% para el hipotiroidismo clínico y del 3% al 5% para el subclínico (Sahay y Nagesh 2012). En humanos, el hipotiroidismo se ha asociado con el desarrollo de preeclampsia, desprendimiento de la placenta, restricción del crecimiento intrauterino y muerte fetal, así como con partos prematuros, abortos involuntarios y bajo peso al nacer (LaFranchi y cols. 2005). Estos efectos se han tratado de explicar con el uso de modelos animales. En la rata, el hipotiroidismo disminuye el número de sitios de implante y aumentan el número de reabsorciones fetales (Bolarinwa y Olaleye 1997). Así mismo, el hipotiroidismo disminuye la migración endovascular e intersticial del trofoblasto cuando se implanta en el endometrio, afecta el perfil inmune y la migración del trofoblasto intrauterino, disminuye el desarrollo de los vasos sanguíneos e infiltración de

células inmunes, y aumenta la apoptosis de las células de la placenta en ratas (Silva y cols. 2012). En conejas, el hipotiroidismo aumenta la talla de los embriones (mayor diámetro abdominal y peso corporal; Zepeda-Pérez, tesis de Maestría 2019). Además, este provoca hiperplasia endometrial y un aumento en la expresión de la enzima 3 beta hidroxisteroidogenasa ( $3\beta$ -HSD) en conejas hipotiroideas vírgenes (Rodríguez-Castelán y cols. 2019). Es posible que dicho aumento en la talla de los embriones se relacione con cambios en el metabolismo uterino. Además, el hipotiroidismo modifica la expresión de la enzima LDH en los diferentes tipos celulares (epitelio luminal, estroma, epitelio glandular, etc.) del útero detectado mediante inmunohistoquímica (Castillo-Romano, tesis de Maestría 2018). Por otra parte, se sabe que el hipotiroidismo disminuye la expresión de receptores de estrógenos en el útero y afecta el metabolismo durante la decidualización e implantación del embrión (Banovac y cols. 1986). En otros tejidos reproductivos como el ovario de coneja, el hipotiroidismo disminuye la expresión de la enzima estereidogenicas como la aromatasas (Rodríguez-Castelán y cols. 2017).

## **2.2 Hormonas tiroideas y metabolismo de carbohidratos**

Las acciones de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo de la glucosa son diversas. Estas regulan la secreción y los niveles circulantes de insulina, la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepática, así como la captación de glucosa intestinal. Adicionalmente, las hormonas tiroideas participan en regulación de la transcripción de diversos genes implicados en el metabolismo de la glucosa (McAninch y Bianco 2014). Además, la  $T_3$  aumenta la captación de glucosa mediada por GLUT<sub>1</sub> y potencia la expresión de GLUT<sub>3</sub> y GLUT<sub>4</sub> en células musculares y en adipocitos (Ding y cols. 2016). Las hormonas tiroideas también modulan la expresión de GLUT<sub>4</sub> en diversos tejidos como hígado y páncreas (Gholami y cols. 2017). Las hormonas tiroideas regulan el transporte (MCT<sub>4</sub> y MCT<sub>1</sub>) y síntesis de lactato en las células de Sertolli (Wang y cols. 2003).

El hipotiroidismo genera diversas alteraciones en el metabolismo de la glucosa y el almacenamiento del glucógeno en diversos tejidos, afectando la expresión de enzimas como la glucocinasa, GLUT<sub>1</sub>, GLUT<sub>2</sub> y GLUT<sub>4</sub> en órganos como el páncreas, corazón y tejido adiposo. Pocos estudios relacionan un estado hipotiroideo con la alteración de este

transportador. Se ha determinado que bajo condiciones de hipotiroidismo en músculo cardíaco y tejido adiposo disminuye la expresión de GLUT4 (Castelló y cols. 1994). Por otra parte, el hipotiroidismo aumenta la expresión de GLUT4 en el ovario (Ding y cols. 2016). Además, el hipotiroidismo disminuye la actividad de la LDH en ratas neonatas (Sarkar y Singh 2017). En conejas, el hipotiroidismo afecta que la inmunolocalización de LDH en el útero de conejas gestantes (Castillo Romano 2018, Tesis de Maestría).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La gestación es una etapa que implica la expresión coordinada de un número de moléculas que incluyen hormonas (estradiol, progesterona), factores de crecimiento, metaloproteinasas (MMPs), células inmunitarias, etc. (Mouzat y cols. 2007). Las mujeres con hipotiroidismo presentan abortos, desprendimiento de la placenta, restricción del crecimiento intrauterino y muerte fetal (Oki y cols. 2004), así como una menor talla de los críos (Arbib y cols. 2017). Efectos similares han sido observados en animales de laboratorio con hipotiroidismo inducido farmacológicamente (Banovac y cols. 1986; Bolarinwa y Olaleye 1997, Silva y cols. 2012). Si bien se sabe que el útero expresa TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 y TR $\beta$ 1, así como TSHR (Aghajanova y cols. 2011; Rodríguez-Castelán y cols. 2017), y desyodasas (Xia y cols. 2018), aún se desconocen los mecanismos involucrados en el efecto del hipotiroidismo en la gestación. Considerando que las hormonas tiroideas modulan la expresión de GLUT4 en ovario (Teixeira y cols. 2012; Ding y cols. 2016), de LDH en el páncreas (Rojas-Juárez 2019, tesis de Maestría), y de aromatasa en testículo (Maran y cols. 2003) y ovario (Rodríguez-Castelán y cols. 2017) es posible pensar que tales moléculas podrían ser afectadas en el útero de conejas hipotiroideas. Además, los PPAR $\gamma$  participan en la homeostasis de la glucosa (Sharma y Staels 2007) y la expresión de LDH es controlada por estrógenos en testículo (Martins y cols. 2013). Por estas razones queremos analizar si el hipotiroidismo afecta la expresión de GLUT4, LDH, PPAR $\gamma$  y aromatasa durante la gestación.

## **4. HIPÓTESIS**

El hipotiroidismo modifica la expresión de GLUT4, LDH, PPAR $\gamma$  y aromatasas y en el útero de conejas no gestantes y durante la gestación (días 5, 10 y 20).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Determinar si el hipotiroidismo afecta la expresión de GLUT4, LDH, PPAR $\gamma$  y aromatasas en el útero de conejas no gestantes y gestantes (días 5, 10 y 20).

### **5.2 Objetivos específicos**

Tanto en conejas no gestantes y gestantes (días 5, 10 y 20), controles e hipotiroideas:

1. Cuantificar la expresión de GLUT4 en el útero mediante la técnica de Western Blot.
2. Cuantificar la expresión de LDH en el útero mediante la técnica de Western Blot
3. Cuantificar la expresión de PPAR $\gamma$  en el útero mediante la técnica de Western Blot.
4. Cuantificar la expresión de aromatasas en el útero mediante la técnica de Western Blot.

## 6. METODOLOGÍA

**Animales.** Se utilizaron conejas adultas no gestantes y gestantes (días 5, 10, 20) de 8-12 meses de edad de la raza chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*), mantenidas bajo condiciones estándares (16 h/8 h de luz y oscuridad a  $22 \pm 2$  °C) en el bioterio del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (Universidad Autónoma de Tlaxcala). Los animales se alojaron en jaulas individuales de acero inoxidable (50 x 60 x 40 cm) y fueron alimentadas con alimento Purina y agua ad libitum.

**Inducción de hipotiroidismo.** Posteriormente se llevó a cabo la inducción de hipotiroidismo mediante el tratamiento con el fármaco anti-tiroideo metimazol (Sigma), que se les administró en el agua de beber a una concentración de 0.02% (10 mg/kg; Anaya-Hernández y cols. 2015) durante treinta días. Al grupo control se le dio de tomar la misma cantidad de agua sin fármaco durante treinta días (Figura 5).

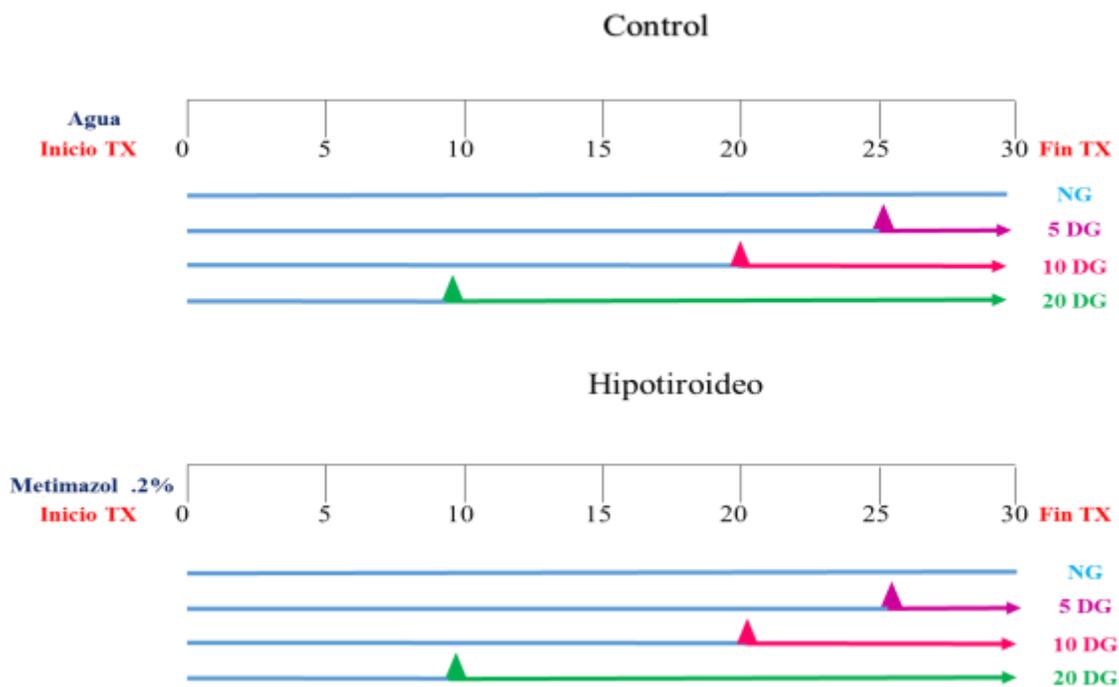


Figura 5. Inducción del hipotiroidismo y días de gestación. El tratamiento duro 30 días para cada grupo, el control solo bebió agua, el hipotiroideo bebió agua más metimazol (0.2%). Los días de gestación se ajustaron a los 30 días de tratamiento y se sacrificaron en el día 30. 5 días, 5D; 10 días, 10D; 20 días, 20D; no gestante NG.

**Etapas de gestación.** Para este proyecto, el análisis de la gestación se dividió en 3 etapas: 1) implantación, la cual corresponde al día 5; 2) placentación, la cual corresponde al día 10; 3) degeneración del cuerpo lúteo, la cual corresponde al día 20. Los días de gestación se ajustaron al tratamiento de 30 días (Figura 5).

**Sitios sin y con implante.** El sitio sin implante corresponde a una sección del útero medial donde no se desarrolló ningún feto, porque se encuentra entre dos implantes. Para este sitio se analizaron los diferentes grupos: no gestante, gestante día 5, gestante día 10 y gestante día 20. El sitio con implante corresponde a una sección del útero medial donde se desarrolló un feto. Se recolectó la porción correspondiente a la placenta y al útero. Para este sitio se analizaron los grupos de gestación día 10 y gestación día 20.

**Western Blot.** Para la preparación de los extractos totales de útero (no gestantes y gestantes de 5, 10 y 20 días), se tomó una porción de útero congelado (0.5 mg aproximadamente). El tejido fue macerado con un homogeneizador eléctrico utilizando buffer de lisis. Se agregó a la muestra un inhibidor de proteasas (sigma) y 100 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Posteriormente se centrifugó durante 30 min a 13,400 rev/min a 4°C para obtener el precipitado y el sobrenadante de la muestra. Del homogenizado se determinó la concentración de las proteínas totales mediante el método de Bradford. Para la separación electroforética de las proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida/SDS al 10%. Para la corrida se cargaron 30 µg (LDH), 50 µg (aromatasa) o 100 µg (GLUT4 y PPAR $\gamma$ ) de proteína. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema Mini Trans-Blot Cell (ENDURO). Una vez realizada la transferencia se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% (LDH), 7% (GLUT4 y PPAR $\gamma$ ) o 17% (aromatasa) y 0.2% tween-20 en PSB. Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (anti-GLUT4, SANTACRUZ 1:250; anti-LDH, Ab55433 ABCAM; 1:200; anti-PPAR $\gamma$ , SANTACRUZ, 1:200; anti-aromatasa, NOVUS, 1:250) diluido en 1% de leche descremada en 0.2% de TRIS durante 1 noche a 4°C. Después se incubaron con el anticuerpo secundario (para GLUT4, LDH y PPAR $\gamma$  se usó goat anti-mouse HRP; 1:1000, Santa Cruz Biotechnology; para aromatasa se usó goat anti-rabbit 1:20000, Santa Cruz Biotechnology) diluido en 1% de leche descremada y 0.2% de TRIS durante 2 h

a temperatura ambiente. Finalmente se revelarán las bandas inmunoreactivas utilizando un kit de quimioluminiscencia.

**Análisis estadístico.** Se realizó una prueba ANOVA de dos vías para el análisis de los datos. Los datos se analizaron el programa de análisis estadístico Prisma para Windows, versión 5.0.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Expresión de GLUT4 en útero

Se utilizaron extractos totales de útero para todos los grupos, se usó hígado de coneja como control positivo. Los resultados muestran que la gestación aumentó la expresión de GLUT4, tanto en los sitios sin y con implante (Figuras 6A-C). El hipotiroidismo aumentó la expresión de GLUT4 en el grupo no gestante (NG; Figuras 6A y C). Sin embargo, durante la gestación en el sitio sin implante, el hipotiroidismo disminuye la expresión de GLUT4 (5G, 10G, 20G; Figuras 6 A y C). Aunado a esto, al final de la gestación en el sitio con implante, el hipotiroidismo promueve un aumento en la expresión de GLUT4 (20G; Figuras 6B y D).

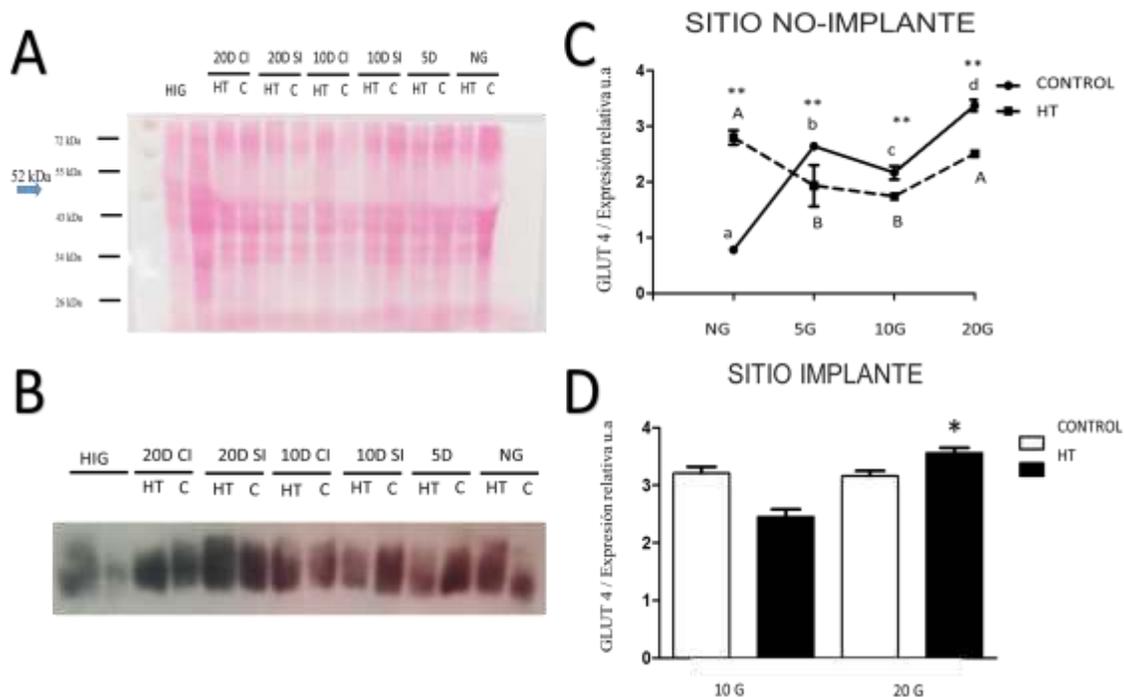


Figura 6. Expresión de GLUT4 en el útero. Se muestra la imagen representativa de la membrana teñida con rojo de Ponceau (A) y de la membrana mostrando la expresión de GLUT4 (B). Sin implante, SI; con implante, CI. Controles (C; no-gestante, NG; n=6; gestante de 5 días de gestación, G5; n=6; gestante de 10 días de gestación, G10; n=6; gestante de 20 días de gestación, G20; n=6) e hipotiroideas (HT; no-gestante, NG; n=6; gestante de 5 días de gestación, G5; n=6; gestante de 10 días de gestación, G10; n=6; gestante de 20 días de gestación, G20; n=6), hígado (HIG). 52 kDa (peso de la proteína). En los tejidos sin implantes (A y C), las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en grupos controles, mientras que las letras mayúsculas lo hacen para los grupos hipotiroideos. En los tejidos sin y con implantes, \* p<0.05; \*\* p<0.01 indican diferencias significativas con su respectivo grupo control.

## 7.2 Expresión de la enzima LDH en útero

Se utilizaron extractos totales de útero para todos los grupos, se usó hígado como control positivo. Los resultados muestran que la gestación no modificó la expresión de LDH, siendo igual entre los sitios sin y con implante. El hipotiroidismo aumentó la expresión de la enzima LDH en la etapa de degeneración del cuerpo lúteo tanto en los sitios sin y con implante (20G; Figuras 7A-D) en el resto de los grupos no se encontraron diferencias significativas (NG, 5G y 10G).

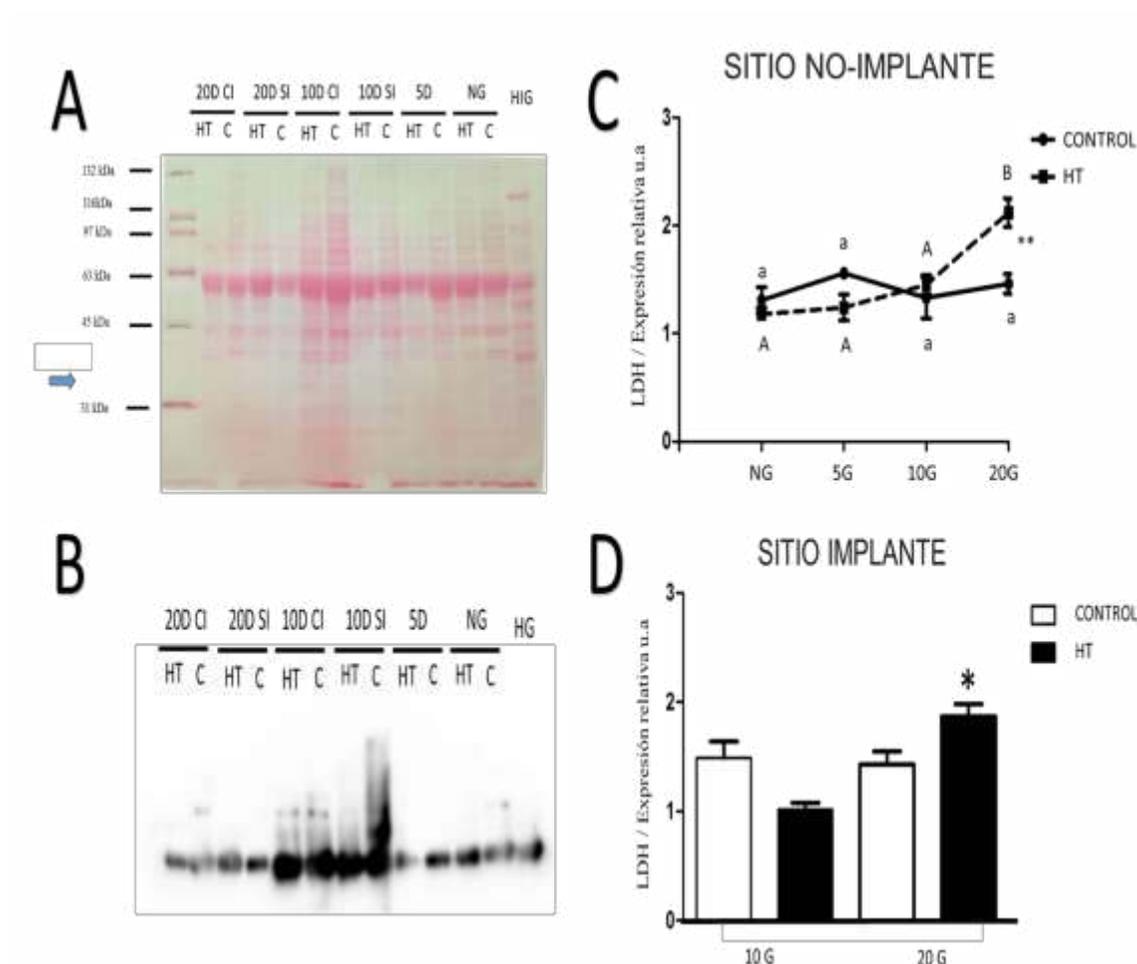


Figura 7. Expresión de la enzima LDH en útero. Se muestra la imagen representativa de la membrana teñida con rojo de Ponceau (A) y de la membrana mostrando la expresión de LDH (B). Sin implante, SI; con implante, CI. Controles (C; no-gestante, NG; n=6; gestante de 5 días de gestación, G5; n=6; gestante de 10 días de gestación, G10; n=6; gestante de 20 días de gestación, G20; n=6) e hipotiroideas (HT; no-gestante, NG; n=6; gestante de 5 días de gestación, G5; n=6; gestante de 10 días de gestación, G10; n=6; gestante de 20 días de gestación, G20; n=6), hígado (HIG). 37 kDa (peso de la proteína). En los tejidos sin implantes (A y C), las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en grupos controles, mientras que las letras mayúsculas lo hacen para los grupos hipotiroideos. En los tejidos sin y con implantes, \* p<0.05; \*\* p<0.01 indican diferencias significativas con su respectivo grupo control.

### 7.3 Expresión de PPAR $\gamma$ en útero

Expresión del receptor nuclear PPAR $\gamma$ . Se utilizaron extractos totales de útero para todos los grupos, se usó hígado de coneja como control positivo. Los resultados muestran que la gestación no modificó la expresión de PPAR $\gamma$ , siendo igual entre los sitios sin implante. Sin embargo en los sitios con implante, la expresión de este receptor fue menor (Figuras 8A-D). El hipotiroidismo disminuyó la expresión de PPAR $\gamma$  en el grupo no gestante y en la etapa de implantación (NG, 5G; Figuras 8A-C). En el sitio sin implante, el hipotiroidismo no modificó la expresión de PPAR $\gamma$  (10G, 20G; Figura 8A-C). En contraste, el hipotiroidismo aumentó la expresión de PPAR $\gamma$  al final de la gestación en el sitio con implante (20G; Figura 8 A-C y D).

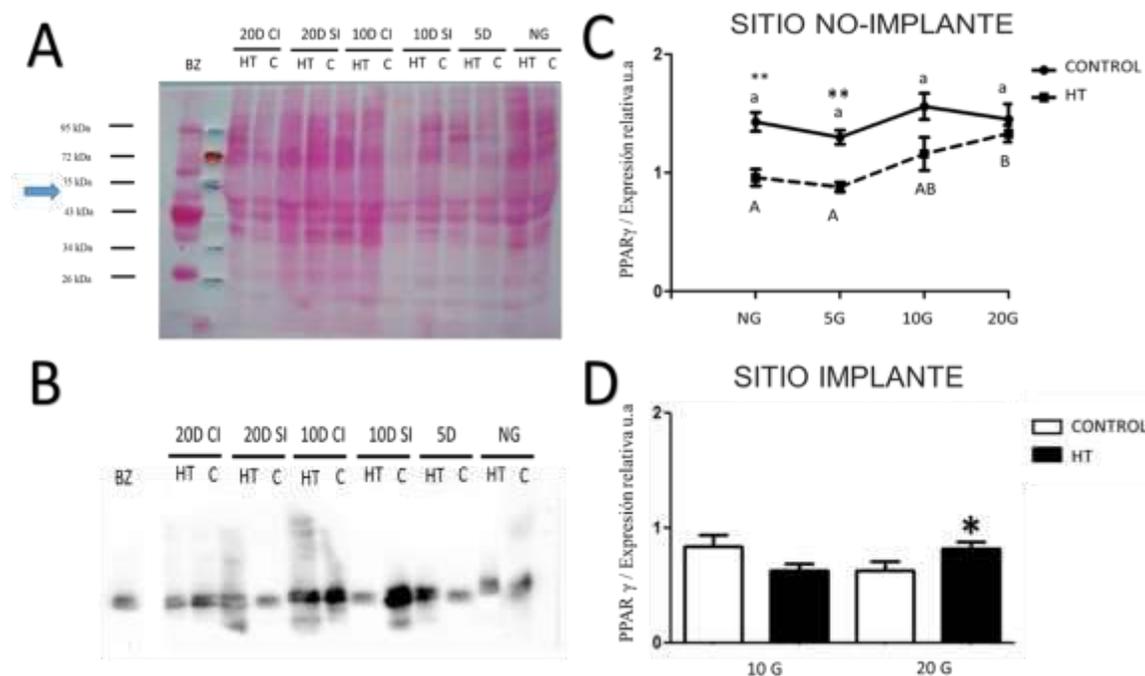


Figura 8. Expresión de PPAR $\gamma$  en útero. Se muestra la imagen representativa de la membrana teñida con rojo de Ponceau (A) y de la membrana mostrando la expresión de PPAR $\gamma$  (B). Sin implante, SI; con implante, CI. Controles (C; no-gestante, NG; n=6; gestante de 5 días de gestación, G5; n=6; gestante de 10 días de gestación, G10; n=6; gestante de 20 días de gestación, G20; n=6) e hipotiroideas (HT; no-gestante, NG; n=6; gestante de 5 días de gestación, G5; n=6; gestante de 10 días de gestación, G10; n=6; gestante de 20 días de gestación, G20; n=6), bazo (BZ). 42 kDa (peso de la proteína), n=6. En los tejidos sin implante, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en grupos controles, mientras que las letras mayúsculas lo hacen para los grupos hipotiroideos. En los tejidos sin y con implantes, \* p<0.05; \*\* p<0.01 indican diferencias significativas con su respectivo grupo control.

## 7.4 Expresión de la enzima aromatasa en útero

Se utilizaron extractos totales de útero para todos los grupos, se usó ovario como control positivo. Los resultados muestran que la gestación no modificó la expresión de aromatasa, siendo igual entre los sitios sin y con implante (Figuras 8A-D). El hipotiroidismo aumentó la expresión de aromatasa en el grupo no gestante (NG, Figura 9C) y en la etapa de degeneración del cuerpo lúteo. En el sitio de implante, el hipotiroidismo aumentó la expresión de aromatasa solo en G20 (Figura 9C-D).

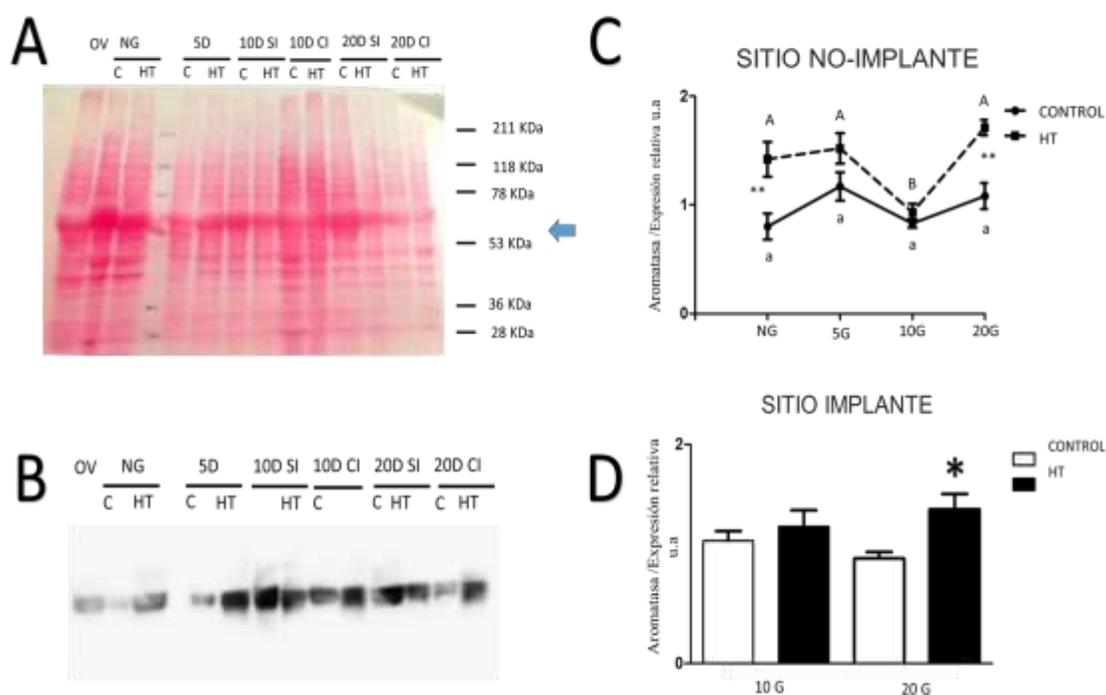


Figura 9. Expresión de la enzima aromatasa en el útero. Se muestra la imagen representativa de la membrana teñida con rojo de Ponceau (A) y de la membrana mostrando la expresión de la aromatasa (B). Sin implante, SI; con implante, CI. Controles (C; no-gestante, NG; n=6; gestante de 5 días de gestación, G5; n=6; gestante de 10 días de gestación, G10; n=6; gestante de 20 días de gestación, G20; n=6) e hipotiroideas (HT; no-gestante, NG; n=6; gestante de 5 días de gestación, G5; n=6; gestante de 10 días de gestación, G10; n=6; gestante de 20 días de gestación, G20; n=6), ovario (OV). 55 kDa (peso de la proteína). En los sitios sin implante, las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en grupos controles, mientras que las letras mayúsculas lo hacen para los grupos hipotiroideos. En los tejidos sin y con implantes, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  indican diferencias significativas con su respectivo grupo control.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Expresión de GLUT4 en útero

Nuestros resultados mostraron que la gestación aumenta de manera gradual la expresión de GLUT4. A este respecto, es conocido que la glucosa es el principal sustrato de energía para el feto (Frolova y Moley 2011). La glucosa se transfiere de la sangre materna mediante difusión facilitada a través de GLUT. El transporte neto de glucosa a través de la placenta está regulado por las concentraciones plasmáticas de glucosa materna. En placenta humana se han identificado varias isoformas de la familia GLUT, con diferente localización. El patrón de expresión en el sincitiotrofoblasto de las diferentes isoformas de la familia GLUT varía a medida que avanza la gestación. El GLUT1 está altamente expresado a lo largo de la gestación. Mientras que los GLUT3, GLUT4 y GLUT12 están expresados en el sincitiotrofoblasto al inicio de la gestación. Al término de la gestación, la expresión de GLUT3 y GLUT4 está localizada únicamente en las células endoteliales y estromales, respectivamente (Illsley 2000; Cui y cols. 2015). Lo anterior explicaría porque la expresión de GLUT4 en G5 fue mayor en los animales no gestantes, y mayor al final de la gestación. Esta expresión de GLUT4 en el útero gestante corresponde con un aumento en la acumulación de glucógeno (Castillo-Romano 2018, tesis de Maestría).

En este estudio también encontramos que el hipotiroidismo aumentó la expresión GLUT4 en los animales no gestantes. Considerando que las conejas hipotiroideas vírgenes tienen hiperplasia uterina (Rodríguez-Castelán y cols. 2019), es posible que dicho aumento pueda estar relacionado con un mayor grosor del endometrio. A este respecto, mujeres con hiperplasias endometriales de tipo adenocarcinomas muestran una mayor expresión de GLUT1 (Canpolat y cols. 2016; Xiong y cols. 2010). Además, el hipotiroidismo disminuyó la expresión de GLUT4 en las diferentes etapas de la gestación en el sitio sin implante. Respecto a esto se sabe que la decidualización adecuada de las células del estroma depende de la concentración de glucosa, ya que las células cultivadas en concentraciones de glucosa por debajo de 2.5 mM muestran niveles más bajos de decidualización. Esto podría llevar a un fracaso de la implantación y el aborto espontáneo o la pérdida subsiguiente (Frolova y

Moley 2011). Esto podría reflejar una mala calidad de los sitios de implante en los animales hipotiroideos.

Por su parte en los sitios con implante, la expresión de GLUT4 bajo condiciones de hipotiroidismo aumentó en G20. Esto corresponde con un aumento en la acumulación de glucógeno en las conejas a G20 (Castillo-Romano 2018, tesis de Maestría). La función placentaria normal es esencial para un crecimiento fetal óptimo. La transferencia excesiva de glucosa a través de la placenta puede ser responsable del crecimiento excesivo del feto (Stanirowski y col. 2017). A este respecto, previamente encontramos que el hipotiroidismo induce macrosomía fetal (Zepeda-Pérez 2019, Tesis de Maestría). Aunado a esto, el desarrollo de preclamsia se ha relacionado con una falla en la maduración de las células de la placenta, acumulando mayor cantidad de glucógeno (Akison y cols. 2017). El aumento en la expresión de GLUT4 podría facilitar mayor entrada de glucosa a las células de la placenta favoreciendo el desarrollo de macrostomía fetal y condicionando el desarrollo de preclamsia.

## **8.2 Expresión de LDH en útero**

La enzima LDH es responsable de la conversión reversible de piruvato a lactato. Se expresa en el útero y aumenta durante el embarazo (Madaan y cols. 2017). Por ello, conforme avanza el desarrollo de la gestación, la cantidad de lactato producido se incrementa significativamente. La lactato deshidrogenasa está formada por dos tipos de subunidades: H (LDHB) y M (LDHA) que presentan pequeñas diferencias en su secuencia de aminoácidos. Los tipos H y M pueden asociarse independientemente para formar tetrámeros, dando lugar a cinco isoenzimas LDH 1, 2, 3, 4, 5. La presencia de esta enzima en la gestación es importante, se sabe que LDH1 y LDH5 incrementan durante el último trimestre de la gestación y que LDH3 disminuye al final de la gestación (Makkonen y cols. 1980). Las células del miometrio producen lactato, necesario para su contracción, por lo cual se demuestra que hay síntesis local de LDH en el útero (Neal y cols. 2013). En este proyecto se encontró que la expresión de LDH no se modifica con la gestación, lo cual nos sugiere que posiblemente si aumente la actividad de la misma para promover la mayor cantidad de lactato

reportada en la gestación (Madaan y cols. 2017). Además, la expresión de LDH no tuvo relación con la expresión de GLUT4 y la subsecuente entrada de glucosa.

El hipotiroidismo aumentó la expresión de LDH en la etapa de degeneración del cuerpo lúteo, en los sitios sin y con implante. Esta expresión corresponde con un aumento en la acumulación de glucógeno (Castillo-Romano 2018, tesis de Maestría), sugiriendo que al haber más glucógeno hay más producción de lactato. En este sentido se ha descrito que al final de la gestación ocurre un aumento de lactato para cubrir la demanda metabólica que genera las contracciones uterinas (Martins y cols. 2013). Sin embargo, un aumento no regulado podría asociarse con estrés oxidativo, provocando complicaciones como restricción del crecimiento intra-uterino, abortos y el desarrollo de preclamsia (Chang y cols. 2018).

### **8.3 Expresión de PPAR $\gamma$ en útero**

En el presente estudio mostramos que el PPAR $\gamma$  se localiza en el útero de conejas no gestantes y gestantes. Algunos estudios han reportado que este se expresa mayoritariamente en el estroma (Brooks y cols. 2015) y células del sincitiotrofoblasto (Li y cols. 2017). Dicho receptor participa en la vascularización de la placenta y contracción del endometrio, síntesis y secreción de leptina y hormona de crecimiento placentario humano, diferenciación de las células del trofoblasto, desarrollo de la placenta y formación de la interfaz útero-placentaria (Marion-Letellier y cols. 2016). Nosotros no encontramos diferencias en la expresión de PPAR $\gamma$  a lo largo de la gestación, aunque si es menor en los sitios con implante.

Bajo condiciones de hipotiroidismo se disminuye la expresión de PPAR $\gamma$  en el grupo no gestante, al igual que en la etapa de implantación, pero un aumento en el sitio con implante a G20. El receptor PPAR $\gamma$  mantiene una estrecha relación con las hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas regulan el metabolismo de carbohidratos a través de acciones directas sobre la expresión génica y la comunicación cruzada con otros receptores nucleares, incluido PPAR y el receptor X del hígado (LXR), entre otros (Mullur y cols. 2014). Considerando que PPAR $\gamma$  se relaciona de manera negativa con la expresión de VEGF, una menor expresión de PPAR $\gamma$  en los sitios de no implante favorecería un aumento en la expresión de VEGF, como ya lo reportamos en las conejas vírgenes que muestran hiperplasia uterina y una alta

expresión de este factor de crecimiento (Rodríguez-Castelán y cols. 2019). Una disminución en la expresión de PPAR $\gamma$  afecta la formación de células espongiotrofoblasticas, desarrollo de la placenta y muerte fetal (Nadra y cols. 2006). Mientras que la sobreexpresión de PPAR $\gamma$  reduce la expresión de VEGF, de manera que en el sitio de implante a G20 esto podría afectar la interfaz materno-fetal afectando la placentación (Fournier y cols. 2011) y, por lo tanto, el desarrollo de patologías como preclamsia. Cabe mencionar que, a nivel mundial, la preclampsia representa el 11-17% de las muertes maternas (Amosco y cols. 2016). En apoyo a los presentes resultados, previamente reportamos que el hipotiroidismo aumenta la expresión de PPAR $\gamma$  y glucógeno en el oviducto de la coneja (Méndez-Tepepa y cols. 2020). De esta manera, un aumento de glucógeno en el sitio con implante uterino a G20 de los animales hipotiroideos han sido también observado (Rodríguez-Castelán y cols. 2019).

#### **8.4 Expresión de aromatasa en útero**

La enzima aromatasa cataliza la conversión de testosterona a estradiol. La actividad de la aromatasa es crítica para el mantenimiento del embarazo temprano, regular el parto al final del embarazo, desarrollo de gonadocitos fetales y la diferenciación sexual. En la placenta humana, los andrógenos derivados de las glándulas suprarrenales maternas y fetales se convierten en estrógenos por la acción enzimática de la aromatasa placentaria. Esto implica que las alteraciones en la esteroidogénesis placentaria podrían repercutir directamente en el desarrollo de la placenta (Perez-Sepulveda y cols. 2015). El estradiol estimula el crecimiento placentario y mejora el flujo sanguíneo para proporcionar el intercambio óptimo de gases y nutrientes necesarios para el feto en rápido desarrollo (Chen y cols. 2017). En este estudio se encontró que la expresión de aromatasa en el útero es constante entre las hembras no gestantes y gestantes.

Un aumento en la expresión de aromatasa en el útero de conejas no gestantes en condiciones de hipotiroidismo, encontrada en el presente estudio, podría estar relacionado con la hiperplasia uterina reportada previamente (Rodríguez-Castelán y cols. 2019). Mientras que el aumento en la expresión de aromatasa observada en G20, tanto en los sitios sin y con implante, podría relacionarse con un aumento en la síntesis de estradiol y, por ende, un

aumento en la expresión de GLUT4 y macrosomía fetal previamente reportada (Castillo-Romano 2018, tesis de Maestría). Aunado a esto se ha reportado que la falta de regulación en la expresión de aromatasa podría ser útil en la detección temprana de preclamsia. Esto es debido a que el estradiol regula la presión sanguínea materna sistémica y uterina; además, aumenta el flujo sanguíneo uterino, promoviendo así las características clínicas de la preclamsia (Berkane y cols. 2018). Además, el estradiol favorece la coagulación sanguínea y la formación de fibrina en el útero de mujeres gestantes (Li y cols. 2020).

## 9. CONCLUSIONES

La gestación induce un aumento de GLUT4 en el útero durante la gestación. El hipotiroidismo aumenta la expresión de GLUT4 en el útero en animales vírgenes, pero lo reduce durante la gestación en los sitios inter-implante. En contraste, la expresión de GLUT4 en los sitios de implante es aumentado por el hipotiroidismo. El aumento en la expresión de GLUT4 podría facilitar mayor entrada de glucosa a las células de la placenta favoreciendo el desarrollo de macrostomia fetal y condicionando el desarrollo de preclamsia

La gestación no modifica la expresión de PPAR $\gamma$  en el útero. El hipotiroidismo disminuye la expresión de PPAR $\gamma$  en el grupo no gestante y al inicio de la gestación G5. En contraste, el hipotiroidismo aumenta la expresión de PPAR $\gamma$  en el día 10 y 20 en el sitio de implante. La no regulación de PPAR $\gamma$  podría afectar procesos importantes para la gestación como la diferenciación del trofoblasto, angiogénesis y formación de la placenta.

La gestación mantiene constante la expresión de aromatasa en el útero. Sin embargo, el hipotiroidismo aumenta la expresión de aromatasa en animales vírgenes y G20, tanto en el sitio sin y con implante. Lo cual podría explicar el aumento en la expresión de GLUT4 y el desarrollo de patologías como hiperplasia uterina reportado previamente. Además, alteraciones en la estereidogénesis placentaria podrían repercutir directamente en el desarrollo de la placenta.

La gestación mantiene constante la expresión de LDH en el útero. El hipotiroidismo aumenta la expresión de esta enzima en el día G20, tanto en el sitio sin y con implante, favoreciendo un aumento de lactato y, posiblemente el desarrollo de la preclamsia.

## 10. PERSPECTIVAS

Dado que los animales hipotiroideos mostraron alteraciones en la expresión de PPAR $\gamma$ , GLUT4 y LDH, las cuales se relacionan con el desarrollo de preclamsia, sería importante medir los niveles de estrés oxidativo, el cual se ha relacionado recientemente con preclamsia (Aouache y col. 2018). Otras vías de estudio serían determinar en etapas tempranas de la gestación, la expresión de VEGF, el cual participa en la angiogénesis y remodelación de la arteria uterina. Se ha descrito que una alteración en su expresión condiciona el flujo sanguíneo relacionándose con el desarrollo de preclamsia (Amosco y cols. 2016).

## 11. REFERENCIAS

1. Abalovich M, Mitelberg L, Allami C, Gutierrez S, Alcaraz G, Otero P y Levalle O. 2007. Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in women with infertility. *Gynecol Endocrinol* 23: 279-283.
2. Aghajanova L, Straveus A, Lindeberg M, Landgren BM, Sparre LS y Hovatta O. 2011. Thyroid-stimulating hormone receptor and thyroid hormone receptors are involved in human endometrial physiology. *Fertil Steril* 95: 230–237.
3. Akison LK, Nitert MD, Clifton VL, Moritz KM y Simmons DG. 2017. Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. *Placenta* 54:52-58.
4. Anaya-Hernández A, Rodríguez-Castelán J, Nicolás L, Martínez-Gómez M, Jiménez-Estrada I, Castelán F y Cuevas E. 2015. Hypothyroidism affects differentially the cell size of epithelial cells among oviductal regions of rabbits. *Reprod Domest Anim* 50(1):104-11. 0
5. Arbib N, Hadar E, Sneh-Arbib O, Chen R, Wiznitzer A y Gabbay-Benziv R. 2017. First trimester thyroid stimulating hormone as an independent risk factor for adverse pregnancy outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 30:2174-8.
6. Augustin R. 2010. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB* 62(5):315-33.
7. Banovac K, Ryan EA y O'Sullivan MJ. 1986. Triiodothyronine (T3) nuclear binding sites in human placenta and decidua. *Placenta* 7:543–549.
8. Berkane N, Liere P, Lefevre G, Alfaidy N, Nahed RA, Vincent J, Oudinet JP, Pianos A, Cambourg A, Rozenberg P, Galichon P, Rousseau A, Simon T, Schumacher M, Chabbert-Buffet N y Hertig A. 2018. Abnormal steroidogenesis and aromatase activity in preeclampsia. *Placenta* 69:40-49.
9. Bhurke AS, Bagchi IC y Bagchi MK. 2016. Progesterone-Regulated Endometrial Factors Controlling Implantation. *Am J Reprod Immunol* 75(3):237-45.
10. Bogacka I, Bogacki M, Kurzyńska A. y Chojnowska K. 2013. The involvement of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) in prostaglandin F2a production by porcine endometrium. *Reprod Biol* 13:309 –316.

11. Bogacka I, Kurzynska A, Bogacki M y Chojnowska K. 2015. Peroxisome proliferator-activated receptors in the regulation of female reproductive functions. *Folia Histochem Cytobiol* 53(3):189-200.
12. Bolarinwa AF y Olaleye SB. 1997. Blastocyst implantation: effect of thyroidectomy and thyroxine replacement in the rat. *Afr J Med Med Sci* 26: 135-137.
13. Bouzier-Sore AK, Voisin P, Canioni P, Magistretti PJ y Pellerin L. 2003. Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(11):1298-306.
14. Bowman K y Rose J. 2016. Estradiol stimulates glycogen synthesis whereas progesterone promotes glycogen catabolism in the uterus of the American mink *Neovison vison*. *Anim Sci J* 10:1111.
15. Bricker D, Taylor E, Schell J, Orsak T, Boutron, A, Chen Y, Cox J, Cardon C, Van Vranken J, Dephoure N, Redin C, Boudina S, Gygi S, Brivet M, Thummel C y Rutter J. 2012. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science* 6090: 96–100.
16. Brooks KE, Burns GW y Spencer TE. 2015. Peroxisome proliferator activator receptor gamma (PPARG) regulates conceptus elongation in sheep. *Biol Reprod* 92(2):42.
17. Canpolat T1, Ersöz C, Uğuz A, Vardar MA, Altıntaş A. GLUT-1 Expression in Proliferative Endometrium, Endometrial Hyperplasia, Endometrial Adenocarcinoma and the Relationship Between GLUT-1 Expression and Prognostic Parameters in Endometrial Adenocarcinoma. *Turk Patoloji Derg.* 2016;32(3):141-7. doi: 10.5146/tjpath.2015.01352.
18. Carvalho DP y Dupuy C. 2017. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol.* 458:6-15.
19. Castillo Romano Marlenne. Efecto del hipotiroidismo en el contenido de glucógeno en el endometrio de conejas gestantes. Tesis de maestría 2018.
20. Castelló A, Rodríguez-Manzaneque JC, Camps M, Pérez-Castillo A, Testar X, Palacín M, Santos A y Zorzano A. 1994. Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone. *J Biol Chem* 269(8):5905-12.

21. Chen CY, Chen CP y Lin KH. 2015. Biological functions of thyroid hormone in placenta. *Int J Mol Sci* 16(2):4161-79.
22. Cho MC, Lee K, Paik SG y Yoon DY. 2008. Peroxisome Proliferators-Activated Receptor (PPAR) Modulators and Metabolic Disorders. *PPAR Res* 2008: 679137.
23. Citterio CE, Veluswamy B, Morgan SJ, Galton VA, Banga JP, Atkins S, Morishita Y, Neumann S, Latif R, Gershengorn MC, Smith TJ y Arvan P. 2017. De novo triiodothyronine formation from thyrocytes activated by Thyroid Stimulating Hormone. *J Biol Chem* 292(37):15434-15444.
24. Clough J y Whittingham D. 1983. Metabolism of glucose by postimplantation mouse embryos in vitro. *J Embryol Exp Morphol* 74: 133–42.
25. Colicchia M, Campagnolo L, Baldini E, Ulisse S, Valensise H y Moretti C. 2014. Molecular basis of thyrotropin and thyroid hormone action during implantation and early development. *Hum Reprod Update* 20: 884-904.
26. Corcoran JJ, Nicholson C, Sweeney M, Charnock JC, Robson SC, Westwood M y Taggart MJ. 2014. Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute responses to 17 $\beta$ -estradiol and estrogen-receptor-specific agonists. *Mol Hum Reprod* 20(5):433-41.
27. Cui P, Li X, Wang X, Feng Y, Lin JF, Billig H, y Shao R. 2015. Lack of cyclical fluctuations of endometrial GLUT4 expression in women with polycystic ovary syndrome: Evidence for direct regulation of GLUT4 by steroid hormones. *BBA clinical* 4, 85-91.
28. Daniell K y Nucera C. 2016. Effect of the micronutrient iodine in thyroid carcinoma angiogenesis. *Aging* 8(12):3180-3184.
29. Dean M, Hunt J, McDougall L y Rose J. 2014. Uterine glycogen metabolism in mink during estrus, embryonic diapause and pregnancy. *J Reprod Dev* 6:438-46.
30. Ding Y, Tian Y, Guo M, Liu J, Heng D, Zhu B, Yang Y y Zhang C. 2016. Regulation of glucose transport by thyroid hormone in rat ovary. *Cell Tissue Res* 366(2):455-466.
31. Dunn D y Turner C. 2016. Hypothyroidism in Women. *Nurs Womens Health* 20(1):93-8.

32. Flamant F y Gauthier K. 2013. Thyroid hormone receptors: The challenge of elucidating isotype-specific functions and cell-specific response. *Biochim Biophys Acta*. 1830(7):3900–3907.
33. Franczak A y Kotwica G. 2008. Secretion of estradiol-17beta by porcine endometrium and myometrium during early pregnancy and luteolysis. *Theriogenology* 69(3):283-9.
34. Frolova AI y Moley KH 2011. Glucose transporters in the uterus: an analysis of tissue distribution and proposed physiological roles. *Reproduction* 142(2):211-220.
35. Frolova AI, O'Neill K y Moley KH. 2011. Dehydroepiandrosterone inhibits glucose flux through the pentose phosphate pathway in human and mouse endometrial stromal cells, preventing decidualization and implantation. *Mol Endocrinol* 25(8): 1444–1455.
36. Gardner D. 2015. Lactate production by the mammalian blastocyst: manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasión? *Bioessays* 37: 364-371.
37. Germain DL, Galton VA y Hernandez A. 2009. Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* 150(3):1097-107.
38. Gibson D.A., Graves E., Critchley H.O.D. y Saunders P.T.K. 2015. Estrogen-dependent regulation of human uterine natural killer cells promotes vascular remodeling via secretion of CCL2. *Hum Reprod* 30(6): 1290–1301.
39. Guttmacher AE, Maddox YT y Spong CY. 2014. The Human Placenta Project: Placental Structure, Development, and Function in Real Time. *Placenta* 35(5):303-304.
40. Goemann IM, Romitti M, Meyer ELS, Wajner SM y Maia AL. 2017. Role of thyroid hormones in the neoplastic process: an overview. *Endocr Relat Cancer* 24 (11):367-385.
41. Gholami H, Jeddi S, Zadeh-Vakili A, Farrokhfall K, Rouhollah F, Zarkesh M, Ghanbari M y Ghasemi A. 2017. Transient Congenital Hypothyroidism Alters Gene Expression of Glucose Transporters and Impairs Glucose Sensing Apparatus in Young and Aged Offspring Rats. *Cell Physiol Biochem* 43(6):2338-2352.
42. Hu K y Yu Y. 2017. Metabolite availability as a window to view the early embryo microenvironment in vivo. *Mol Reprod Dev* 84(10):1027-1038.
43. Illsley NP. 2000. Glucose transporters in the human placenta. *Placenta* 21(1):14-22.

44. Inada A, Fujii NL, Inada O, Higaki Y, Furuichi Y y Nabeshima YI. 2016. Effects of 17 $\beta$ -Estradiol and Androgen on Glucose Metabolism in Skeletal Muscle. *Endocrinology*. 157(12):4691-4705.
45. Janani C y Ranjitha Kumari BD. 2015. PPAR gamma gene a review. *Diabetes Metab Syndr* 9(1):46-50.
46. Kaczynski P, Kowalewski MP y Waclawik A. 2016. Prostaglandin F2 $\alpha$  promotes angiogenesis and embryo-maternal interactions during implantation. *Reproduction* 151: 539-552.
47. Kogai T y Brent GA. 2012. The Sodium Iodide Symporter (NIS): Regulation and Approaches to Targeting for Cancer Therapeutics. *Pharmacol Ther* 135(3):355-70.
48. Kostoglou-Athanassiou I y Ntalles K. 2010. Hypothyroidism - new aspects of an old disease. *Hippokratia* 14(2):82-7.
49. Larrabee MG. 1989. The pentose cycle (hexose monophosphate shunt). Rigorous evaluation of limits to the flux from glucose using 14CO<sub>2</sub> data, with applications to peripheral ganglia of chicken embryos. *J Biol Chem* 264(27):15875-9.
50. LaFranchi SH, Haddow JE y Hollowell JG. 2005. Is thyroid inadequacy during gestation a risk factor for adverse pregnancy and developmental outcomes? *Thyroid* 15:60–71.
51. Li Y, Chen WL, Liu L y Gu H. 2017. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors, fatty acid binding protein-4 in placenta and their correlations with the prognosis of pre-eclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 52(7):443-448.
52. Li C1, Su YF1, Jin L, Guo YY, Ding GL, Tang L, Cai M, Huang HF y Liu XM. 2020. Association between higher levels of serum estradiol and elevated levels of fibrin (fibrinogen) degradation products in late pregnancy following assisted reproductive technology treatment. *Thromb Res*. 187:63-71.
53. Madaan A, Nadeau Vallée M, Rivera JC, Obari D, Hou X, Sierra EM, Girard S, Olson DM y Chemtob S. 2017. Lactate produced during labor modulates uterine inflammation via GPR81 (HCA1). *Am J Obstet Gynecol* 216(1):60.
54. Maran RR. 2003. Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Arch Androl* 49(5):375-88.

55. Marion-Letellier R, Savoye G y Ghosh S. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. 2016. *Eur J Pharmacol* 785:44-49.
56. Martins AD, Alves MG, Simões VL, Dias TR, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Cavaco JE y Oliveira PF. 2013. Control of Sertoli cell metabolism by sex steroid hormones is mediated through modulation in glycolysis-related transporters and enzymes. *Cell Tissue Res* 354(3):861-8.
57. Matsuo H, Maruo T, Murata K y Mochizuki M. 1993. Human early placental trophoblasts produce an epidermal growth factor-like substance in synergy with thyroid hormone. *Acta Endocrinol* 128: 225–229.
58. McAninch E y Bianco A. 2014. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1311:77-87.
59. Mendelson CR, Jiang B, Shelton JM, Richardson JA y Hinshelwood MM. 2005. Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 95(1-5):25-33.
60. Méndez-Tepepa M, Zepeda-Pérez D, Espindola-Lozano M, Rodríguez-Castelán J, Arroyo-Helguera O, Pacheco P, Nicolás-Toledo L y Cuevas-Romero E. 2020. Hypothyroidism modifies differentially the content of lipids and glycogen, lipid receptors, and intraepithelial lymphocytes among oviductal regions of rabbits. *Reprod Biol* S1642-431X(19)30344-4.
61. Menkhorst EM, Van Sinderen ML, Rainczuk K, Cuman C, Winship A y Dimitriadis E. 2017. Invasive trophoblast promotes stromal fibroblast decidualization via Profilin 1 and ALOX5. *Scientific reports* 7(1): 8690.
62. Mitra S, Rao CV y Fields MJ. 1980. Enzyme activities in early, mid and late luteal phase bovine corpora lutea. *Biochem Biophys Res Commun* 97(4):1555-61.
63. Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, Sion B, Déchelotte P, Gauthier K, Vanacker JM y Lobaccaro JM. 2007. Oxysterol nuclear receptor LXR $\beta$  regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem* 282 (7): 4693-701.
64. Mullur R, Liu YY y Brent GA. 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev* 94(2):355-82.
65. Nadra K, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D, Wahli W y Desvergne B. 2006. Differentiation of Trophoblast Giant Cells and Their Metabolic Functions

- Are Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$ . *Mol Cell Biol* 26(8): 3266–3281.
66. Neal JL, Lowe NK y Corwin EJ. 2013. Serum lactate dehydrogenase profile as a retrospective indicator of uterine preparedness for labor: a prospective, observational study. *BMC Pregnancy Childbirth* 13:128.
  67. Oki N, Matsuo H, Nakago S, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB y Maruo T. 2004. Effects of 3,5,3'-triiodothyronine on the invasive potential and the expression of integrins and matrix metalloproteinases in cultured early placental extravillous trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5213–5221.
  68. Pham J, Arul Nambi Rajan K, Li P y Parast MM. 2018. The role of Sirtuin1-PPAR $\gamma$  axis in placental development and function. *J Mol Endocrinol* 60(4):R201-R212.
  69. Pascual A y Aranda A. 2013. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1830(7):3908-16.
  70. Patel S, Kilburn B, Imudia A, Armant DR y Skafar DF. 2015. Estradiol Elicits Proapoptotic and Antiproliferative Effects in Human Trophoblast Cells. *Biol Reprod* 93(3):74.
  71. Pratap Kumar y Navneet Magon. 2012. Hormones in pregnancy. *Niger Med J* 53(4): 179–183.
  72. Pucino V, Bombardieri M, Pitzalis C y Mauro C. 2017. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity. *Eur J Immunol* 47(1):14-21.
  73. Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, Vonnahme KA, Luther JS, Buchanan DS, Hafez SA, Grazul-Bilska AT y Redmer DA. 2015. Utero-placental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol* 54(2-3):355-66.
  74. Rodríguez-Castelán J, Anaya-Hernández A, Méndez-Tepepa M, Martínez-Gómez M, Castelán F y Cuevas-Romero E. 2017. Distribution of thyroid hormone and thyrotropin receptors in reproductive tissues of adult female rabbits. *Endocr Res* 42(1):59-70.
  75. Rodríguez-Castelán J, Méndez-Tepepa M, Rodríguez-Antolín J, Castelán F y Cuevas-Romero E. 2018. Hypothyroidism affects the content of lipids and glycogen, and the PPAR- $\delta$  expression in the ovary of rabbits. *Reprod Fertil Dev* (10): 1380-1387.

76. Rodríguez-Castelán J, Méndez-Tepepa M, Carrillo-Portillo Y, Anaya-Hernández A, Rodríguez-Antolín J, Zambrano E, Castelán F y Cuevas-Romero E. 2017. Hypothyroidism Reduces the Size of Ovarian Follicles and Promotes Hypertrophy of Periovarian Fat with Infiltration of Macrophages in Adult Rabbits. *Biomed Res Int* 795950.
77. Rodríguez-Castelán J, Del Moral-Morales A, Piña-Medina AG, Zepeda-Pérez D, Castillo-Romano M, Méndez-Tepepa M, Espindola-Lozano M, Camacho-Arroyo I y Cuevas-Romero E. 2019. Hypothyroidism induces uterine hyperplasia and inflammation related to sex hormone receptors expression in virgin rabbits. *Life Sci* 230:111-120.
78. Rumi MAK, Singh P, Roby KF, Zhao X, Iqbal K, Ratri A, Lei T, Cui W, Borosha S, Dhakal P, Kubota K, Chakraborty D, Vivian JL, Wolfe MW y Soares M. Defining the Role of Estrogen Receptor  $\beta$  in the Regulation of Female Fertility. *Endocrinology* 158(7):2330-2343.
79. Sahay RK y Nagesh VS. 2012. Hypothyroidism in pregnancy. *Indian J Endocr Metab* 16(3):364-370
80. Salama SA, Mohammad MA, Diaz-Arrastia CR, Kamel MW, Kilic GS, Ndofor BT, Abdel-Baki MS y Theiler SK. 2014. Estradiol-17 $\beta$  upregulates pyruvate kinase M2 expression to coactivate estrogen receptor- $\alpha$  and to integrate metabolic reprogramming with the mitogenic response in endometrial cells. *J Clin Endocrinol Metab* (10):3790-9.
81. Sacchi S, Sena P, Degli Esposti C, Lui J y La Marca A. Evidence for expression and functionality of FSH and LH/hCG receptors in human endometrium. *J Assist Reprod Genet* 35(9):1703-1712.
82. Sarkar D y Singh SK. 2017. Neonatal hypothyroidism affects testicular glucose homeostasis through increased oxidative stress in prepubertal mice: effects on GLUT3, GLUT8 and Cx43. *Andrology* (4):749-762.
83. Schanz A, Red-Horse K, Hess AP, Baston-Büst DM, Heiss C y Krüssel JS. 2015. Oxygen regulates human cytotrophoblast migration by controlling chemokine and receptor expression. *Placenta* 35 (12):1089-94.

84. Sharma AM<sup>1</sup>, Staels B. 2007. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 92(2):386-95.
85. Shmagel KV y Chereshnev VA. 2004. Steroid hormones: their physiological role and diagnostic value during pregnancy. *Usp Fiziol Nauk* 35(3):61-71.
86. Silva JF, Vidigal PN, Galvão DD, Boeloni JN, Nunes PP, Ocarino NM, Nascimento EF y Serakides R. 2012. Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. *Reprod Fertil Dev* 24: 923-931.
87. Stavreus Evers A. 2012. Paracrine interactions of thyroid hormones and thyroid stimulation hormone in the female reproductive tract have an impact on female fertility. *Front. Endocrin* 3:50.
88. Steinhauser CB, Bazer FW, Burghardt RC y Johnson GA. 2017. Expression of progesterone receptor in the porcine uterus and placenta throughout gestation: correlation with expression of uteroferrin and osteopontin. *Domst Ann Endoc* 58: 19–29.
89. Stanirowski PJ, Szukiewicz D, Pyzlak M, Abdalla N, Sawicki W, Cendrowski K. 2017. Impact of pre-gestational and gestational diabetes mellitus on the expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 in human term placenta. *Endocrine* 55(3):799-808.
90. Su RW y Fazleabas AT. 2015. Implantation and Establishment of Pregnancy in Human and Nonhuman Primates. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 216: 189–213.
91. Szczepańska AA, Łupicka M, Socha BM y Korzekwa AJ. 2018. The influence of arachidonic acid metabolites on PPAR and RXR expression in bovine uterine cells. *Gen Comp Endocrinol* 262:27-35.
92. Takashi Chaen, Toshihiro Konno, Mahiro Egashira, Rulan Bai, Nana Nomura, Shintaro Nomura, Yasushi Hirota, Toshihiro Sakurai y Kazuhiko Imakawa. 2012. Estrogen-Dependent Uterine Secretion of Osteopontin Activates Blastocyst Adhesion Competence. *PLoS One* 7(11): e48933
93. Thuróczy J, Szilágyi J, Müller L y Balogh L. 2017. Development of the independent function of fetal thyroid glands in the dog in connection with iodothyronine

- concentrations in pregnant bitches, fetal fluids, and fetal serum. *Domest Anim Endocrinol* 58:14-18.
94. Tingi E, Syed AA, Kyriacou A, Mastorakos G y Kyriacou A. 2016. Benign thyroid disease in pregnancy: A state of the art review. *J Clin Transl Endocrinol* 6:37-49.
95. Teixeira SS, Tamrakar AK, Goulart-Silva F, Serrano-Nascimento C, Klip A y Nunes MT. 2012. Triiodothyronine acutely stimulates glucose transport into L6 muscle cells without increasing surface GLUT4, GLUT1, or GLUT3. *Thyroid* 22(7):747-54.
96. Von Wolff M1, Ursel S, Hahn U, Steldinger R y Strowitzki T. 2003. Glucose transporter proteins (GLUT) in human endometrium: expression, regulation, and function throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 88(8):3885-92.
97. Waclawik A, Kaczmarek MM, Blitek A, Kaczynski P y Ziecik AJ. 2017. Embryo-maternal dialogue during pregnancy establishment and implantation in the pig. *Mol Reprod Dev* 4(9):842-855.
98. Wagner W, Ciszewski WM y Kania KD. 2015. L- and D-lactate enhance DNA repair and modulate the resistance of cervical carcinoma cells to anticancer drugs via histone deacetylase inhibition and hydroxycarboxylic acid receptor 1 activation. *Cell Commun Signal* 25; 13:36.
99. Wang H, Xie H, Sun X, Tranguch S, Zhang H, Jia X, Wang D, Das SK, Desvergne B, Wahli W, DuBois RN y Dey SK. 2013. Stage-specific integration of maternal and embryonic peroxisome proliferator-activated receptor delta signaling is critical to pregnancy success. *J Biol Chem* 28; 282(52):37770-82.
100. Wang Y, Tonouchi M, Miskovic D, Hatta H y Bonen A. 2003. T3 increases lactate transport and the expression of MCT4, but not MCT1, in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(3):622-8.
101. Xia T, Zhang X, Wang Y y Deng D. 2018. Effect of maternal hypothyroidism during pregnancy on insulin resistance, lipid accumulation, and mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of fetal rats. *Biosci Rep* 38(4): BSR20171731.
102. Xiong Y, Xiong YY y Zhou YF. 2010. Expression and significance of beta-catenin, Glut-1 and PTEN in proliferative endometrium, endometrial intraepithelial neoplasia and endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 31(2):160-4.

103. Xu Y, Etgen GJ y Broderick CL. 2006. Design and synthesis of dual peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  and  $\delta$  agonists as novel euglycemic agents with a reduced weight gain profile. *J. Med. Chem* 49(19):5649–5652.
104. Zepeda Perez D. Efecto del Hipotiroidismo sobre el Contenido de Lípidos en el Útero de Conejas Gestantes. Tesis maestría 2019.
105. Zhang SM, Yu LL, Qu T1, Hu Y, Yuan DZ, Zhang S, Xu Q, Zhao YB, Zhang JH y Yue LM. 2017. The Changes of Cytoskeletal Proteins Induced by the Fast Effect of Estrogen in Mouse Blastocysts and Its Roles in Implantation. *Reprod Sci* 24(12):1639-1646.
106. Zhang S, Liu B, Mao W, Li Q, Fu C, Zhang N, Zhang Y, Gao L, Shen Y y Cao J. 2017. The effect of prostaglandin E2 receptor (PTGER2) activation on growth factor expression and cell proliferation in bovine endometrial explants. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 122:16-23.
107. Ziegelmüller B, Vattai A, Kost B, Kuhn C, Hofmann S, Bayer B, Toth B, Jeschke U y Ditsch N. 2015. Expression of Thyroid Hormone Receptors in Villous Trophoblasts and Decidual Tissue at Protein and mRNA Levels Is Downregulated in Spontaneous and Recurrent Miscarriages. *J Histochem Cytochem* 63(7):511-23.
108. Zuo RJ, Gu XW, Qi QR, Wang TS, Zhao XY, Liu JL y Yang ZM. 2015. Warburg-like Glycolysis and Lactate Shuttle in Mouse Decidua during Early Pregnancy. *J Biol Chem* 290(35):21280-91.

## 12. GLOSARIO

1. **Apoptosis:** Forma de muerte celular programada. La apoptosis retira las células durante el desarrollo, elimina las células infectadas de virus y las potencialmente cancerosas, y mantiene el equilibrio en el organismo.
2. **Beta-oxidación:** proceso catabólico de los ácidos grasos en el cual sufren remoción, mediante la oxidación, de un par de átomos de carbono sucesivamente en cada ciclo del proceso, hasta que el ácido graso se descompone por completo en forma de moléculas acetil-CoA, que serán posteriormente oxidados en la mitocondria para generar energía química en forma de (ATP).
3. **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.
4. **Cigoto:** Célula que resulta de la unión de las células sexuales masculina y femenina y a partir de la cual se desarrolla el embrión de un ser vivo.
5. **Citosinas:** 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. **Decidualización:** Cambios ocurridos en los tejidos que van a permitir la implantación del embrión en el útero. Estos cambios en el endometrio se van a producir gracias al efecto de la progesterona sintetizada en el cuerpo lúteo tras la ovulación.
7. **Esteroidogénesis:** Conjunto de reacciones metabólicas que hacen posible la síntesis de hormonas esteroideas en un determinado órgano o tejido.
8. **Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).** La interacción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), con sus receptores de membrana; VEGFR1 y VEGFR2, se reconoce como el principal estimulador de la angiogénesis (proliferación, migración y sobrevivencia de las células endoteliales), tanto en el ovario como en otros tejidos.

9. **Macrosomía:** Feto grande, cuando se calcula que el peso del bebé al nacer será mayor del percentil 90 o superior a 4 kilos.
10. **Metaloproteinasa de matriz (MMP):** Miembro de un grupo de enzimas que pueden descomponer las proteínas, como el colágeno, que se encuentran normalmente en los espacios entre las células de los tejidos (es decir, proteínas de la matriz extracelular). Dado que estas enzimas necesitan cinco átomos de calcio para trabajar adecuadamente, se llaman metaloproteasas. Las metaloproteasas de matriz participan en la curación de heridas, la angiogénesis y la metástasis de las células tumorales.
11. **Oligomenorrea:** La duración del ciclo es mayor de lo habitual, de manera que las menstruaciones se suceden con intervalos de 35-90 días.
12. **Placenta hemochorial.** Una placenta en la cual la sangre maternal está en el contacto directo con el corión (la placenta humana es de este tipo).
13. **Polimenorrea:** Consiste en el acortamiento del intervalo menstrual a menos de 21 días. El mecanismo de su producción es variable. En la mayoría de los casos se encuentra acortada la fase lútea, porque el cuerpo lúteo entra en regresión.
14. **Proliferación:** Incremento de la cantidad o el número de algo de forma rápida
15. **Teratogénesis:** agente físico u organismo capaz de provocar un defecto congénito durante la gestación del feto.
16. **Termorregulación:** Capacidad que tiene un organismo biológico para modificar su temperatura dentro de ciertos límites, incluso cuando la temperatura circundante es bastante diferente del rango de temperaturas-objetivo. El término se utiliza para describir los procesos que mantienen el equilibrio entre ganancia y pérdida de calor.
17. **Transportador de monocarboxilato (MCT):** Son transportadores de moléculas transmembranales. co-transportan aniones de ácido monocarboxílico (típicamente lactato) y protones ( $H^+$ ) a través de membranas celulares, notablemente de fibras de músculo esquelético y cardíaco. Se considera que es responsable de la mayor parte del transporte de lactato a bajas concentraciones, pero a medida que la saturación del portador se aproxima, la difusión simple (que es principalmente del ácido láctico no disociado) adquiere mayor importancia.
18. **Trofoblasto:** Capa celular que rodea a los blastómeros y que tiene como función la nutrición.

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

## 13. ANEXOS



**XLII Reunión Anual**  
**Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A. C.**  
Guadalajara, Jalisco  
Mayo 21 al 24, 2017

### 36. REGIONALIZACIÓN DEL OVIDUCTO DE LA GATA DOMÉSTICA.

MÉNDEZ-TEPEPA M1, RODRÍGUEZ-CASTELÁN J1, ESPÍNDOLA-LOZANO M1, ZEPEDA-PÉREZ D2,  
SÁNCHEZ-GARCÍA O3, CASTELÁN F4.5, CUEVAS-ROMERO E4

1Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala  
2Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala  
3Departamento de Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias de la BUAP.  
4Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala  
5Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Los oviductos son los órganos encargados de la capacitación espermática y fertilización. En diversos mamíferos, existen propuestas detalladas de la regionalización del oviducto, mostrando que las características histológicas de dichas regiones varían según la especie animal. La gata, al igual que la coneja, es un ovulador reflejo ha sido ampliamente utilizado en estudios de investigación básica y aplicada de fertilización asistida. Sin embargo, no hay estudios que describan con detalle la regionalización de los oviductos de gata, lo cual es importante para un mejor entendimiento de la reproducción en este modelo animal. En el presente estudio analizamos las características morfológicas de cada una de las regiones oviductales de la gata. Se utilizaron 5 gatas domésticas 6 a 9 meses de edad que iban a ser sometidas a una cirugía de ovariectomía rutinaria, previa anestesia con ketamina:xilacina (10 mg:1 mg/kg). En dicha cirugía, se extrajeron los oviductos izquierdos, los cuales fueron fijados en solución de Bouin, incluidos en parafina y cortados a 7 µm. Una serie de laminillas por animal fue teñida con Tricrómica de Masson. El oviducto de la gata mostró la misma regionalización conocida para otras especies: fimbria, infundíbulo, ampulla, istmo y útero-tubal. Sin embargo, en comparación con la coneja, el epitelio fue cúbico secretor y con mayor número de criptas a lo largo del oviducto, y fue muy ramificado en las regiones de infundíbulo y ampulla. Los extremos de la fimbria rodearon al ovario, posiblemente conformando la "bursa ovárica". Solo se observó una capa de musculatura lisa circular en la región útero-tubal, mientras que en las otras regiones solo se encontraron miofibroblastos dispersos. El músculo mesotubárico fue observado en solo lado en las regiones oviductales de infundíbulo, ampulla e istmo, mientras que fue bilateral en la región útero-tubal, donde compartió fibras musculares con la capa de musculatura lisa del oviducto. Nuestros resultados podrían ayudar a entender el proceso de fertilización en los felinos, dando las bases histológicas para posteriores estudios que permitan la búsqueda específica de expresión de moléculas en cada una de las regiones del oviducto.

Financiamiento. Proyecto CONACyT 257549 a ECR; beca CONACyT a M-T M, R-C J, E-L M, Z-P D.  
Categoría del primer autor: Doctorado

## EFFECTO DEL HIPOTIROIDISMO EN EL CONTENIDO Y SEÑALIZACIÓN DE LÍPIDOS EN EL ÚTERO DE LA CONEJA

Marlen Espindola Lozano<sup>1</sup>, Dafne Zepeda Pérez<sup>2</sup>, Maribel Mendez Tepepa<sup>1</sup>, Omar Arroyo<sup>3</sup>, Francisco Castelán<sup>4,5</sup>, Estela Cuevas Romero<sup>5</sup>

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

<sup>2</sup>Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

<sup>3</sup>Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana

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

<sup>5</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

En mujeres, el hipotiroidismo produce dislipidemias e hígado graso. En conejas, el hipotiroidismo produce hipercolesterolemia y acumulación de triglicéridos (TAG) y menor expresión del receptor farnesoides  $\alpha$  (FXR $\alpha$ ) en el hígado. El hipotiroidismo gestacional reduce la talla de los embriones y el contenido de TAG y colesterol total (TC) en el útero. En el presente estudio analizamos más mecanismos involucrados en las acciones de las hormonas tiroideas durante la gestación. Se utilizaron conejas vírgenes (G0) y grávidas (G5, G10 y G20 días), tanto controles (n=6) e hipotiroideas (n=6; metimazol 0.02% 30 días en el agua de beber). Para la cuantificación de TAG y TC se realizó mediante el kit de ELITech (TGML-0425). Se utilizaron extractos totales de tejido uterino para la realización de western blot de lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilasa (CYP51A1) (1:50), aromatasa (1:250), receptor FXR $\beta$  (une lanosterol; 1:400) y receptor de proliferadores de peroxisomas (PPAR  $\gamma$ ; 1:200). Para el análisis estadístico se utilizó una ANOVA de 2 vías y T de Student. La gestación promueve hipertrigliceridemia y la acumulación de TAG en el hígado, pero reduce los niveles de TC en suero sin modificar su concentración en el hígado. El hipotiroidismo no modifica las concentraciones de lípidos en suero y en hígado de las hembras gestantes, excepto el TC en el G20. En el útero, la concentración de TAG y TC, así como la expresión de CYP51A1, aromatasa, FXR $\beta$ , y PPAR y se modifica dependiendo del día de la gestación y por el estatus tiroideo. Nuestros resultados sugieren la importancia de las acciones uterinas de las hormonas tiroideas, lo que podría repercutir en el desarrollo embrionario.

Numero de beca: 298631

Categoría: D

## 14. PUBLICACIONES

### Hypothyroidism Alters the Uterine Lipid Levels in Pregnant Rabbits and Affects the Fetal Size

Julia Rodríguez-Castellán, PhD<sup>1</sup>, Dafne Zepeda-Pérez, Master Student<sup>2</sup>, Maribel Méndez-Tepepa, PhD Student<sup>1</sup>, Marlene Castillo-Romano, Master Student<sup>2</sup>, Marlen Espindola-Lozano, PhD Student<sup>1</sup>, Arely Anaya-Hernández, PhD<sup>3</sup>, Pere Berbel, PhD<sup>4</sup>, Estela Cuevas-Romero, PhD<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

<sup>3</sup> Doctorado en Neuroetología, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

<sup>4</sup> Departamento de Histología y Anatomía, Universidad Miguel Hernández, Alicante, España

<sup>5</sup> Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

\*Corresponding author: Estela Cuevas-Romero, Ph. D., Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. Carretera Tlaxcala-Puebla Km 1.5. C.P. 90062. Phone and fax + (52) 246 46 215 57. E-mail: [ecuevas@uatx.mx](mailto:ecuevas@uatx.mx)

Present address of Arely Anaya-Hernández has a postdoctoral position in the Centro de Investigación en Genética y Ambiente, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

#### STRUCTURED ABSTRACT

**Background.** Hypothyroidism has been related to low-weight births, abortion and prematurity, which have been associated with changes in the content of glycogen and vascularization of the placenta. Since hypothyroidism can cause dyslipidemia, it may affect the lipid content in the uterus affecting the development of fetuses. **Objective.** To investigate the effect of hypothyroidism on the lipid levels in serum and uterus during pregnancy and their possible association with the size of fetuses. **Method.** Adult female rabbits were grouped in control ( $n = 6$ ) and hypothyroid ( $n = 6$ ; treated with methimazole for 29 days before and 19 days after copulation). Food intake and body weight were daily registered. At gestational day 19 (GD19), dams were sacrificed under an overdose of anesthesia. Morphometric measures of fetuses were taken. Total cholesterol (TC), triglyceride (TAG), and glucose concentrations were quantified in blood, uterus and ovaries of dams. The expression of uterine  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $3\beta$ -HSD) was quantified by Western blot. **Results.** Hypothyroidism reduced food intake and body weight of dams, as well as promoted low abdominal diameters of fetuses. It did not induce dyslipidemia and hyperglycemia at GD19 and did not modify the content of lipids in the ovary. However, it reduced the content of TAG and TC in the uterus, which was associated with uterine hyperplasia and an increased expression of  $3\beta$ -HSD in the uterus. **Conclusions.** Hypothyroidism alters the lipid content in the uterus that might subsequently affect the energy getting and lipid signaling important to fetal development.

#### KEYWORDS

**Keywords:** thyroid hormones, total cholesterol, triglyceride,  $3\beta$ -HSD, endometrium, methimazole

#### TEXT ORGANIZATION

##### 1. Introduction

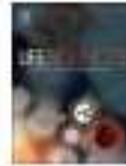
During pregnancy, the elongation of the uterus requires a high content of lipids and glucose. Pregnancy involves a major steroidogenesis and energy production, an increase in the prostaglandins synthesis and an activation in the cell signaling [1]. Although the uterus receives nutrients from blood [2], it also accumulates glycogen and lipids [3,4]. High serum concentrations of glucose and lipids during pregnancy have been associated with preterm birth and alterations in the development of the placenta [5-9].

Clinical and subclinical hypothyroidism have been associated with pregnancy loss, intrauterine growth restriction, fetal death, premature birth and low birth weight [10-12]. Actions of thyroid hormones on fertility pregnancy maintaining and fetal development in animal models are scarce. It has been reported that hypothyroid induces a low body weight at birth in rats, a high

content of glycogen in the fetal and maternal placenta, and a low expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) [13-14]. However, the influence of hypothyroidism on the dams and fetuses is not yet fully understood. We have studied the effects of hypothyroidism on the fertility of rabbits, body weight of dams and fetuses, and its possible link to the content of lipids and glucose in serum, ovary and uterus of dams, as well as the histological characteristics of the uterus.

##### 2. Materials and Methods

Nine-to-eleven months old breed-chinchilla European virgin female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were at random distributed in control (C;  $n = 6$ ) or hypothyroid (H;  $n = 6$ ) groups. The number of dams per experimental group was determined according previous studies and recommendations of Ethics Committee of our University. Rabbits were housed in individual cages of stainless-steel at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  room temperature under artificial lighting conditions (16:8 h; light:dark). Hypothyroidism



## Hypothyroidism induces uterine hyperplasia and inflammation related to sex hormone receptors expression in virgin rabbits



Julia Rodríguez-Castelán<sup>a,b</sup>, Aylín Del Moral-Morales<sup>c</sup>, Ana Gabriela Piña-Medina<sup>d</sup>, Dafne Zepeda-Pérez<sup>e</sup>, Marlene Castillo-Romano<sup>e</sup>, Maribel Méndez-Tepepa<sup>e</sup>, Marien Espindola-Lozano<sup>e</sup>, Ignacio Camacho-Arroyo<sup>e</sup>, Estela Cuevas-Romero<sup>f,g</sup>

<sup>a</sup> *Centro de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México*

<sup>b</sup> *Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México*

<sup>c</sup> *Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Químico, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México*

<sup>d</sup> *Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México*

<sup>e</sup> *Unidad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México*

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

### ARTICLE INFO

#### Keywords

Estrogen receptor  
Progesterone receptor  
Thyroid hormone receptor  
Proliferin  
Malondialdehyde  
Vascular endothelial growth factor

### ABSTRACT

**Aim:** In women, uterine alterations have been associated with sex steroid hormones. Sex hormones regulate the expression of thyroid hormone receptors (TRs) in the uterus, but an inverse link is unknown. We analyzed the impact of hypothyroidism on histological characteristics, vascular endothelial growth factor (VEGF-A), progesterone receptors (PR), estrogen receptors (ER), thyroid hormone receptors (TRs), proliferin (PLIN-A), and lipid content in the uterus of virgin rabbits.

**Main methods:** Twelve Chinchilla-bred adult female rabbits were grouped into control ( $n = 6$ ) and hypothyroid ( $n = 6$ ; 0.02% of methimazole for 30 days). The thickness of endometrium and myometrium, number of uterine glands, and infiltration of immune cells were analyzed. The expression of VEGF-A, PR, ER $\alpha$ , and PLIN-A was determined by RT-PCR and western blot. The uterine content of triglycerides (TAG), total cholesterol (TC), and malondialdehyde (MDA) was quantified.

**Key findings:** Hypothyroidism promoted uterine hyperplasia and a high infiltration of immune cells into the endometrium, including macrophages CD11b<sup>+</sup>. It also increased the expression of VEGF-A, TR $\alpha$ , and ER $\alpha$ -66 but reduced that of PR and ER $\beta$ -66. The uterine content of PLIN-A, TAG, and TC was reduced, but that of MDA was augmented in hypothyroid rabbits.

**Significance:** Our results suggest that uterine hyperplasia and inflammation promoted by hypothyroidism should be related to changes in the VEGF-A, PR, ER, and TRs expression, as well as to modifications in the PLIN-A expression, lipid content, and oxidative status. These results suggest that hypothyroidism should affect the fertility of females.

### 1. Introduction

In women, endometriosis, uterine hyperplasia, dysfunctional uterine bleeding and myomas have been associated with alterations in serum levels of estradiol (E2), testosterone, and progesterone (P4) [1,2], as well as with changes in the uterine expression of progesterone (PRs) and estrogen (ERs) receptors [3,4]. Uterine alterations have also been related to a high expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) [5], immune cells infiltration [5,6], and significant uterine lipid peroxidation [7]. Furthermore, uterine abnormalities are correlated

with dyslipidemia and body weight gain [8], and recently with hypothyroidism [9–12].

Particularly, the impact of hypothyroidism on the uterus has been mostly studied in pregnant laboratory animals. In rats, this thyroid dysfunction increases gestational length, modifies myometrial contractions, and decreases litter size [13]. It also modifies the expression of thyroid hormone receptors (TRs) [14], promotes inflammation and alters the immune profile in the uterus affecting the trophoblast migration [15]. In rabbits, hypothyroidism reduces the thoracic size of embryos and increases the thickness of the endometrium, as well as

\* Corresponding author at: Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla Km 1.5, C.P. 90062, México. E-mail address: [ecuevas@uax.mx](mailto:ecuevas@uax.mx) (E. Cuevas-Romero).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.063>

Received 12 March 2019; Received in revised form 22 May 2019; Accepted 23 May 2019

Available online 24 May 2019

0024-3205/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Original article

# Hypothyroidism modifies differentially the content of lipids and glycogen, lipid receptors, and intraepithelial lymphocytes among oviductal regions of rabbits

 The corrections made in this section will be reviewed and approved by journal production editor.

Maribel [Mendoza-Tepapa](#)<sup>1</sup>, Dafne [Epeola-Pérez](#)<sup>1</sup>, Marlen [Espindola-Lozano](#)<sup>1</sup>, Julia [Rodríguez-Castelán](#)<sup>1,c</sup>, Omar [Arroyo-Helguera](#)<sup>1</sup>, Pablo [Pacheco](#)<sup>2</sup>, Leticia [Nicolás-Toledo](#)<sup>3</sup>, Estela [Cuevas-Romero](#)<sup>4,c</sup>, [ecuevas@uatx.mx](mailto:ecuevas@uatx.mx)

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

<sup>2</sup>Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

<sup>3</sup>Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

<sup>4</sup>Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Mexico

<sup>5</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

<sup>6</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

\*Corresponding author at: Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla Km 1.5, C.P. 90062, Mexico.

## Abstract

Hypothyroidism affects the content of triacylglycerol (TAG), total cholesterol (TC), oxidized lipids, glycogen, and infiltration of immune cells into the ovary and uterus. This study aimed to analyze the impact of hypothyroidism on the lipid content of different regions of the oviduct. Control ( $n = 6$ ) and hypothyroid ( $n = 6$ ; 10 mg/kg/day of methimazole in the drinking water for 30 days) adult rabbits were used. In the fimbriae/infundibulum (FIM/INF), ampulla, (AMP), isthmus (IST), and utero-tubal junction (UTJ), the TAG and TC concentrations, presence of oxidized lipid, relative expressions of perilipin A (PLIN A), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ),