



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del hipotiroidismo en la concentración de estradiol, la expresión de aromatasa y GPER1 en útero gestante de la coneja

T E S I S

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

**Presenta
Ana María Picazo Pavón**

Comité Tutorial

Directora

Dra. Estela Cuevas Romero

Tutores

Dra. Leticia Toledo Nicolás

Dr. Ignacio Camacho Arroyo



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del hipotiroidismo en la concentración de estradiol, la expresión de aromatasa y GPER1 en útero gestante de la coneja

T E S I S

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

**Presenta
Ana María Picazo Pavón**

Comité Tutorial

Directora

Dra. Estela Cuevas Romero

Tutores

Dra. Leticia Toledo Nicolás

Dr. Ignacio Camacho Arroyo



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

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Ana María Picazo Pavón** realiza para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Efecto del hipotiroidismo en la concentración de estradiol, la expresión de aromatasa y GPER1 en útero gestante de la coneja”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 16 DE MAYO DEL 2023

DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO

DRA. ÉSTELA CUEVAS ROMERO

DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN

_ DR. MARCOS GARCÍA JUÁREZ

DR. ALDÓ ISAAC CARRILLO MUÑOZ



**Universidad
Autónoma de
Tlaxcala**

CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

COMITÉ ACADÉMICO POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por la estudiante **Ana María Picazo Pavón** titulada **Efecto del hipotiroidismo en la concentración de estradiol, la expresión de aromatasa y GPER1 en útero gestante de la coneja** para optar por su grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de **Ana María Picazo Pavón** fue revisado por mi como directora de tesis y por su comité antes de presentar cada examen tutorial. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. Al finalizar los créditos del programa de Maestría, se eligieron profesores para formar parte del jurado del examen de grado que también llevó a cabo la revisión del documento de tesis.

En el mes de junio, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando poco texto con similitudes (2%). Los textos detectados con similitud fueron corregidos por la estudiante. Se volvió a procesar el documento y marcó 0%. Por lo anterior, confirmo que **la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable** en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE
Tlaxcala, Tlax., a 19 de junio de 2023


Dra. Estela Caevas Romero
Directora de tesis



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

El presente proyecto se realizó bajo la dirección de la Dra. Estela Cuevas Romero en el Laboratorio de endocrinología, del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala

Este Proyecto contó con el financiamiento por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (no. 39211, Proyecto apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación) y el proyecto de infraestructura CONACyT no. 322333).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, y la Universidad Autónoma de Tlaxcala por permitir mi formación como Maestra en Ciencias Biológicas.

A CONACyT por financiar mis estudios de posgrado con el apoyo de la beca 1080666.

A mi directora de tesis Dra. Estela Cuevas Romero por su acompañamiento durante el desarrollo de este proyecto, apoyo y paciencia.

A mi comité tutorial, Dra. Leticia Nicolas Toledo y Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por sus sugerencias y el tiempo dedicado durante el desarrollo de este proyecto.

A mi familia por su comprensión y apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad, los aprendizajes y enseñanzas juntos.

RESUMEN

Introducción. El hipotiroidismo causa nacimiento de crías de bajo peso corporal. Esto puede atribuirse a diversos factores como hormonas, enzimas, células inmunes y otros componentes de importancia en el embarazo, esto, demostrado en animales, y descrito en humanos. El hipotiroidismo afecta la concentración circulante de estrógenos y la expresión de aromatasa en tejidos metabólicos y reproductivos. El estradiol se encarga del crecimiento y remodelación celular y vascular uterina. El receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER1) regula eventos vasculares y metabólicos en el útero por lo que se le relaciona con el crecimiento fetal. La expresión de este receptor es modulada por el hipotiroidismo en el páncreas. **Objetivos.** Determinar si el bajo peso corporal causado por hipotiroidismo está relacionado con cambios en la concentración de estrógenos, expresión de aromatasa y GPER1. **Metodología.** Se utilizaron conejas de 6 meses de edad y se dividieron en dos grupos: control e hipotiroideo. Las conejas fueron gestantes de 20 días, por lo que el tratamiento con Metimazol al 0.2% diluido en agua, se inició en el día 10 previo a la cópula para cubrir 30 días para inducir el hipotiroidismo. A las conejas del grupo control solo se les proporcionó agua. Luego de su sacrificio, se obtuvieron sus crías y se pesaron, para así clasificarse en 4 grupos: control bajo peso (CBP), control normo peso (CNP), hipotiroideo bajo peso (HBP) e hipotiroideo normo peso (HNP). Se tomó el sitio de implante de cada uno de estos críos y con estos tejidos se procedió a hacer la cuantificación de estrógenos por ELISA, aromatasa y GPER1 por western blot e inmunohistoquímica. **Resultados.** El hipotiroidismo reduce el peso corporal de los fetos. No encontramos diferencias en la concentración de estradiol circulante ni en los implantes independientemente del tamaño del feto. La expresión de aromatasa y GPER1 por western blot fue similar entre los grupos. Sin embargo, la inmunohistoquímica mostró que tejidos como el sincitiotrofoblasto y el espongioblasto modifican la expresión de GPER1 y aromatasa por el estatus tiroideo y el peso fetal. **Conclusiones.** El efecto del hipotiroidismo, tanto en la síntesis estrogénica como en la expresión de su receptor GPER1, es célula dependiente, afectando principalmente a aquellos tejidos involucrados en el metabolismo.

GLOSARIO

CTB Citotrofoblasto

D Desyodasas

GPER1 Receptor de estrógenos acoplado a proteína G

E2 Estradiol

E3 Estriol

FSH Hormona Folículo Estimulante

GnRH Hormona Liberadora de la Gonadotropina

hCG Hormona Gonadotropina Coriónica Humana

LH Hormona Luteinizante

pFECs Células Endoteliales Placentario -Fetales

SCT Sincitiotrofoblasto

TRH Hormona Liberadora de Tirotropina

TSH Hormona Estimuladora de la Tiroides

T3 Triyodotironina

T4 Tiroxina

VEGF Factor de Crecimiento Vascular

Índice

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Generalidades del útero	10
1.1.1 Gestación.....	10
1.1.2 Alteraciones en la gestación	14
1.2 Importancia de los estrógenos en la gestación.....	16
1.2.1 Síntesis de estrógenos.....	16
1.2.2 Receptores de estrógenos.....	18
1.2.3 Estrógenos y alteraciones de la gestación	20
1.3 Generalidades de las hormonas tiroideas.....	21
2. ANTECEDENTES	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	26
6. METODOLOGÍA.....	27
7. RESULTADOS	30
8. DISCUSIÓN.....	38
9. CONCLUSIONES	41
10. PERSPECTIVAS	41
11. REFERENCIAS.....	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del útero

El útero es el órgano donde se implanta el óvulo fecundado para su desarrollo durante el embarazo, se ubica entre el recto y la vejiga urinaria. En la mujer, el útero tiene forma de una pera invertida y mide aproximadamente 7.5 X 5 X 2.5 cm. Éste se divide en fondo uterino, la porción que se ubica arriba de las trompas uterinas, cuerpo uterino y cuello o cérvix. El útero se divide en tres capas: perimetrio, miometrio y endometrio. La capa más externa es el perimetrio y su función es darle soporte al útero. Está compuesta por epitelio pavimentoso simple y tejido conectivo areolar. El miometrio está formado por fibras musculares lisas. La capa más interna, el endometrio está compuesta por una capa interna de epitelio cilíndrico simple. Por debajo del endometrio está el estroma, la cual incluye glándulas endometriales. Parte del endometrio se desprende durante la menstruación, el resto se mantiene (Cha y cols. 2012). En el estudio de enfermedades reproductivas y de fertilidad, las cuales pueden afectar el útero de manera directa o indirecta Distintos modelos animales han sido empleados para el estudio de enfermedades reproductivas y fertilidad. En el presente estudio se emplea la coneja. El útero de la coneja está compuesto por dos cuernos uterinos, de 5 a 7cm cada uno aproximadamente. Éste cuenta con dos cérvix que comunican a ambos úteros directamente con la vagina. Histológicamente, la pared uterina de la coneja está formada por mucosa, capa muscular y serosa (Romero-Vargas, 2014).

1.1.1 Gestación

El embarazo es un proceso que comprende las etapas de implantación, decidualización, placentación y desarrollo embrionario, cuyo producto es la descendencia (Cha y cols. 2012). En la mujer, este proceso comprende un periodo de 36 semanas. El embarazo trae consigo cambios en el estado fisiológico normal, desde cambios en el sistema endocrino, como el aumento de la concentración de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), progesterona y estrógenos, hormonas que hacen el ambiente idóneo para el desarrollo del embarazo (Chesnutt, 2004). Otros cambios que se observan durante el embarazo son modificaciones en el sistema renal, cardíaco, respiratorio y gastrointestinal (Chesnutt, 2004).

Las conejas culminan su madurez sexual entre el 4 y 5 mes de vida, a partir de esto, pueden comenzar su reproducción. El periodo de gestación tiene entre 28 y 32 días (31 días promedio) (Fischer y cols. 2012).

A continuación, se describen los detalles de las etapas del embarazo antes mencionadas.

Implantación. La implantación comienza con la adhesión del blastocisto a la decidua. La unión del trofoblasto al tejido uterino forma la unión materno-fetal. Luego el trofoblasto se diferencia en citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto. Éste último se expande y erosiona los capilares maternos y glándulas endometriales de la decidua para obtener nutrientes. El sincitiotrofoblasto prolifera para formar vellosidades primarias, secundarias y terciarias. Los trofoblastos proliferan y se extienden más allá del sincitiotrofoblasto uniéndose entre sí y formando la capa citotrofooblástica. En la semana 8 del embarazo humano, el endometrio decidualizado y el miometrio subyacente forma el lecho placentario (Silva y Serakides 2016; Zhang y cols. 2013; Figura 1). La implantación se continua con la migración de trofoblasto para después dar paso a la placentación. El desarrollo del feto comienza con la diferenciación celular del trofoblasto en intersticiales y endovasculares. El trofoblasto obtiene nutrientes en la decidua materna. El trofoblasto produce integrinas, proteasas, citocinas, interleucinas y factores de crecimiento que ayudan a degradar las proteínas de la matriz extracelular, promoviendo su migración. La decidua expresa proteínas inhibitoras que evitan la invasión de las células trofoblásticas (Silva y Serakides, 2016).

En la coneja, la fertilización ocurre dentro de las primeras 10 h luego de la cópula. Previo a la implantación, el útero de la coneja sufre algunos cambios como preparación para el embarazo, afectándose la proliferación celular y apoptosis en el epitelio que recubre el epitelio uterino y glandular. Cuando el blastocisto se acerca al endometrio, sus enzimas eliminan la zona pelúcida dejándolo expuesto y de ahora en adelante se mantendrá cubierto de mucosa (Fisher y cols. 2012).

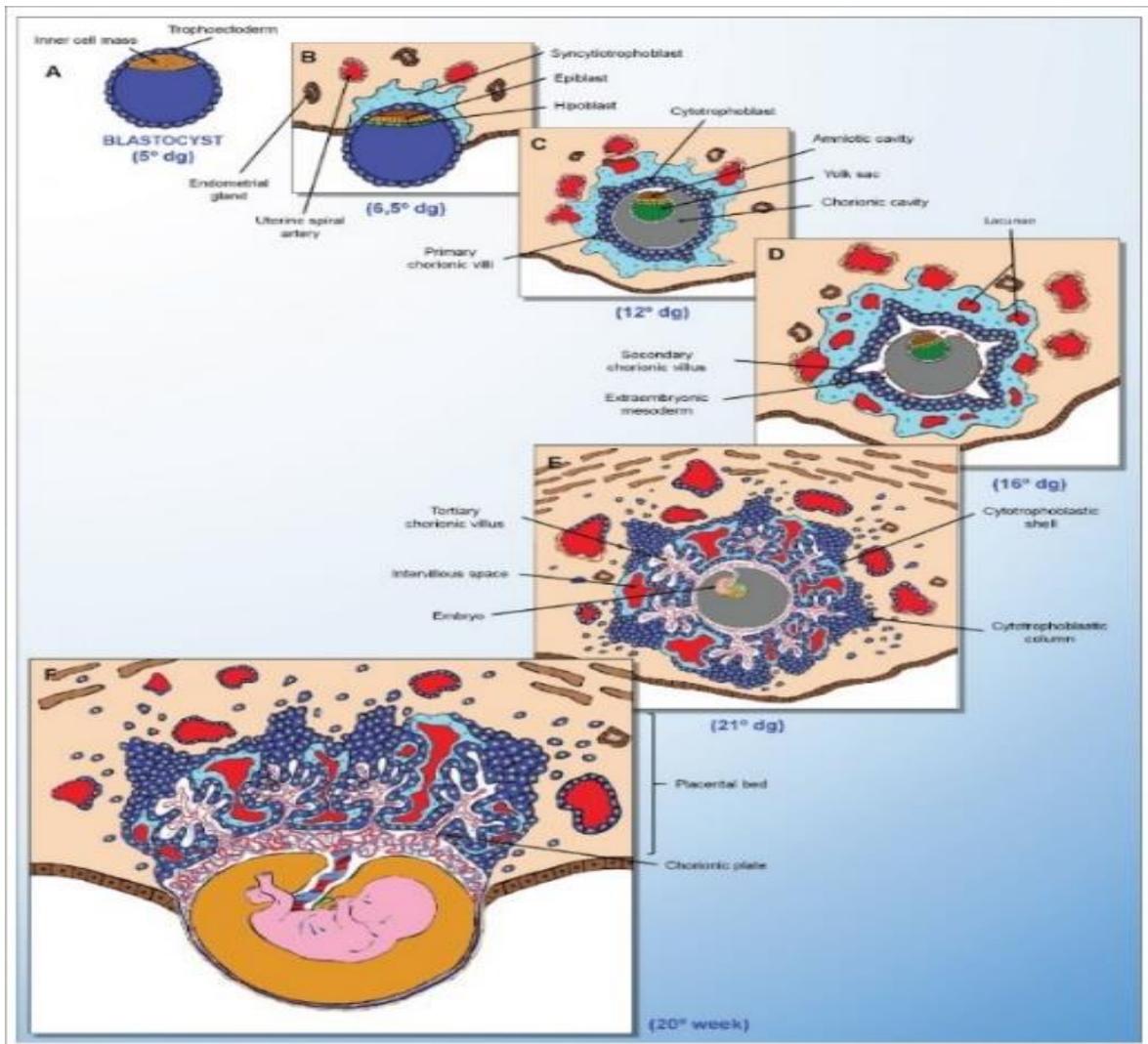


Figura 1. Desarrollo de Placenta Humana. Se observa el blastocisto, la implantación, la diferenciación del trofoblasto y sincitiotrofoblasto, la erosión de vasos sanguíneos para la formación de vellosidades coriónicas hasta finalmente completar la placentación. Tomado de [Silva y Serakides 2016](#).

Placentación. La placenta está delimitada por la placa coriónica y la placa basal. De la placa coriónica surge el cordón umbilical y las vellosidades coriónicas ramificadas; mientras que, la placa basal es la capa externa que tiene contacto con la pared uterina. Las vellosidades coriónicas forman la barrera placentaria. En este sitio se lleva a cabo la síntesis, metabolismo y transporte de hormonas esteroides. La placenta sufre cambios anatómicos en el curso del embarazo y la expresión de los genes placentarios que participan en la síntesis de hormonas ([Chatuphonprasert y cols. 2018](#); Figura 2). Como ocurre en el humano, la placenta de la coneja se desarrolla como un discoide hemocorial y está formada por dos

capas, la materna y la fetal. La placenta de la coneja se desarrolla casi en su totalidad en la primera mitad del periodo de gestación de esta especie y sufre cambios en la vascularización, siendo las arterias espirales y el aumento de la presión de sangre materna los más significativos (Fischer y cols. 2012).

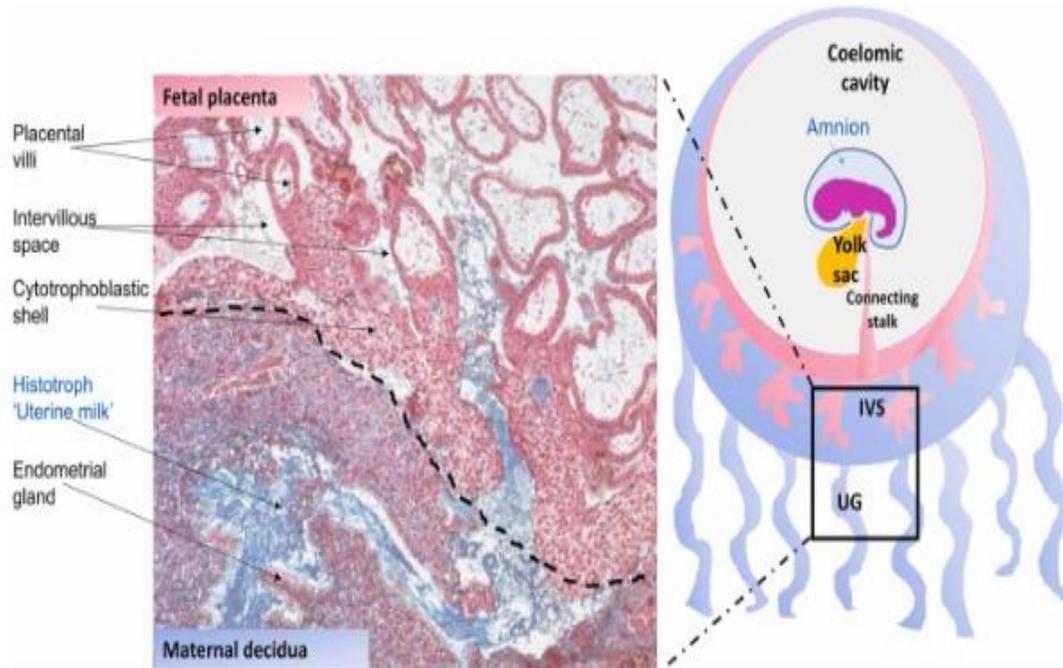


Figura 2. Componentes de la interfase materno-fetal. IVS: espacio intravelloso, UG glándulas uterinas o endometriales Tomado de Cindrova-Davies y Sferruzi-Perri 2022.

1.1.2 Alteraciones en la gestación

Durante la gestación pueden ocurrir algún error en alguna de las etapas que forman parte del proceso que puede causar complicaciones; por ejemplo, preeclampsia, prematuridad, placenta accreta, enfermedad trofoblástica, aborto e incluso muerte fetal o maternal (Chatuphonprasert y cols. 2018). La invasión del trofoblasto y la placentación en el embarazo humano y la gestación del conejo tienen similitudes, lo cual hace a la coneja el modelo animal idóneo para el estudio de enfermedades reproductivas (Fischer, 2012) y fertilidad (Marco-Jiménez & Vicente, 2018).

Aborto. El aborto se define como la interrupción o finalización prematura del embarazo. Cuando el feto es expulsado automáticamente por el cuerpo de la madre antes de la semana 20 se le conoce como aborto espontáneo (Hu, 2018). Más del 50% de abortos espontáneos tienen como causa una anomalía genética en la formación del embrión. La edad avanzada materna puede causar aneuploidía embrionaria, aumento de colágeno en el endometrio y menor respuesta hormonal del endometrio, reduciendo así las dimensiones de la decidua y la receptividad del endometrio (Yang y cols. 2014). La multiparidad, disfunción tiroidea, hiperandrogenismo, síndrome de ovario poliquístico, hiperprolactinemia, defecto de la fase lútea y diabetes son factores de riesgo para los abortos (Kaur & Gupta, 2016; Hu y cols. 2018).

Preeclampsia. Se caracteriza por hipertensión y proteinuria de ≥ 300 mg/día. Es causada por la isquemia placentaria causado a su vez por un error en el momento en que los citotrofoblastos de la placenta invaden las arterias espirales uterinas y arteriolas. Debido a esto se produce un exceso de tirosina quinasa soluble similar a Fms (sFlt-1) y este se une al Factor de crecimiento vascular (VEGF) y al factor de crecimiento placentario (PLGF), provocando así la hipertensión (El-Sayed, 2017). Esta condición cursa con niveles de estrógenos bajos (Jobe y cols. 2013).

Restricción de crecimiento uterino. Es la incapacidad del feto de completar su crecimiento. Esta complicación podría causar nacimiento prematuro, mortalidad perinatal y deficiencias posnatales como hipotermia, hipoglucemia y hemorragia pulmonar. En la edad adulta, el bajo crecimiento embrionario es un factor de desarrollo de obesidad y diabetes

mellitus tipo II (Gurugubelli y Vishnu, 2018). Las hormonas tienen un papel fundamental en el desarrollo intrauterino, desde la implantación, hasta el momento del parto, por lo que un desequilibrio puede perjudicar la maduración y crecimiento uterino, y sumando a esto, complicaciones perinatales y neonatales, se ha sugerido que la restricción de crecimiento uterino tiene una disminución de estrógenos, causado por una disminución en la aromatización placentaria, y también disminución en los niveles de progesterona (Baud y Berkane, 2019).

Placenta accreta. Se caracteriza por la inserción anormal de parte o del total de la placenta en la pared uterina. La placenta en condiciones normales está separada de la decidua basal por una matriz eosinofílica que contiene proteínas trofoblásticas y fibrina uterina que es llamada fibrinoide de Nitabuch, la ausencia de esta capa puede facilitar el acceso del trofoblasto al miometrio (Goh y cols. 2015). Su diagnóstico puede realizarse desde la semana 18 del embarazo en pacientes con múltiples cesareas realizadas previamente o placenta previa, y en la semana 32 en pacientes sin factores de riesgo. Se trata de un padecimiento asintomático por lo que su diagnóstico se realiza mediante ultrasonido transabdominal y transvaginal, resonancia magnética y Doppler (Jauniaux y cols. 2018). El hallazgo en el ultrasonido, que sugiere placenta accreta, es la cercanía o invasión de la placenta al miometrio, y en el Doppler color, la hipervascularización útero-vesical es abundante y asociada a puentes placentarios (Jauniaux y cols. 2018). La causa más descrita del desarrollo de placenta accreta es la lesión uterina, por ejemplo, en legrados y partos por cesárea, dando una mala cicatrización y permitiendo al trofoblasto y al tejido veloso invadir profundamente el miometrio, e incluso llegar a los órganos pélvicos circundantes (Silver, 2015; Jauniaux y cols. 2018). La alta invasión del trofoblasto también es afectada por factores metabólicos, mayor angiogénesis y proliferación celular, disminución de la apoptosis, alteraciones en la migración del trofoblasto, mayor expresión de metaloproteasas, problemas en la señalización del sistema inmunitario y alteraciones hormonales (Bartels y cols. 2018). La invasión de la placenta que caracteriza el acretismo placentario induce hemorragias abundantes que pueden tener desenlaces fatales en la madre (Bartels y cols. 2018). Muchos de los estudios de estas enfermedades han sido estudiados en mujeres, y algunos de estos en especies más pequeñas como ratas y ratones, y aunque la coneja ha sido un modelo de estudio empleado en estudios de reproducción aún no hay antecedentes de placenta accreta con este modelo animal.

1.2 Importancia de los estrógenos en la gestación

Los estrógenos son hormonas de naturaleza liposoluble, ya que se originan a partir del colesterol. La familia de los estrógenos está compuesta por 4 hormonas, estetrol, estrona, estriol y estradiol (Kohlhepp, 2019). Los estrógenos derivan de precursores androgénicos: testosterona y androstenediona, para esto es necesaria la participación de la enzima aromatasa (Vrtačnik y cols. 2014). El estradiol (E2) es el estrógeno más predominante en la mujer (Tang y cols. 2019) y su concentración aumenta a lo largo del embarazo (Kohlhepp, 2019; Figura 3). Esta hormona es sintetizada por las células de la granulosa en los folículos ováricos, el cuerpo lúteo en desarrollo y la placenta. El E2 promueve la foliculogénesis, aumenta la expresión de los receptores de la hCG e inhibe la apoptosis de las células de la granulosa, promueve la vasodilatación de la región uteroplacentaria, aumenta el tamaño de las glándulas mamarias ayudando a mantener el embarazo y evitar abortos (Kumar y cols. 2018; Kohlhepp, 2019). A pesar de que los estrógenos se han descrito como hormonas sexuales femeninas, su fisiología no se limita a esto, también tiene acciones en el sistema inmune, nervioso, esquelético, vascular y endocrino. Sus funciones fisiológicas, no se limitan al sexo femenino, sino también tienen funciones en cuerpo humano masculino (Tabla 1).

1.2.1 Síntesis de estrógenos

La aromatasa es una enzima que se encarga de la aromatización de los andrógenos para así formar estrógenos. Esta enzima está expresada en órganos como el útero, la placenta durante el embarazo y el ovario. En la placenta, los andrógenos de las glándulas suprarrenales son catalizados para la formación de estrógenos. Poca expresión de esta enzima o una sobreexpresión pueden conducir a diferentes patologías que están relacionadas con los estrógenos, tanto en hombres como en mujeres (Czajka-Oraniec y Simpson, 2010) y, dadas estas condiciones, la gestación puede ser afectada por una alteración de esta enzima.

Tabla 1. Participación de GPR30 en funciones fisiológicas y patologías en el ser humano. Tomado de [Prossnitz & Barton, 2011](#).

Funciones Fisiológicas	Patologías
Sistema endocrino	
Secreción de insulina	Obesidad Resistencia a la insulina Diabetes Mellitus
Sistema Reproductivo	
Desarrollo de glándulas mamarias Maduración de oocitos Crecimiento de células endometriales Contracción miometrial	Cáncer de mama Carcinoma de ovario Cáncer endometrial Carcinosarcoma uterina
Sistema nervioso central	
Función neuroendocrina de cerebro	Depresión Esclerosis múltiple derrame cerebral
Sistema cardiovascular	
Crecimiento de cardiomiocitos Inhibición de apoptosis Contractilidad de cardiomiocitos Vasodilatación Liberación de óxido nítrico Inhibición de la proliferación de células del musculo liso vascular y células endoteliales Inhibición de apoptosis de células endoteliales	Daño isquemia reperfusión después de un infarto al miocardio Cardiomiopatía dilatada Cardiomiopatía hipertensiva Hipertensión arterial Enfermedad
Sistema inmune	
Diferenciación y/o regulación de células T Desarrollo de células T Inhibición de la inflamación (macrófagos)	Inflamación Autoinmunidad Atrofia tímica
Sistema Renal	
	Enfermedad renal (poteinuria)
Sistema Musculoquelético	
Diferenciación de condrocitos Crecimiento de huesos Trabecularización de huesos	Osteoporosis Artritis

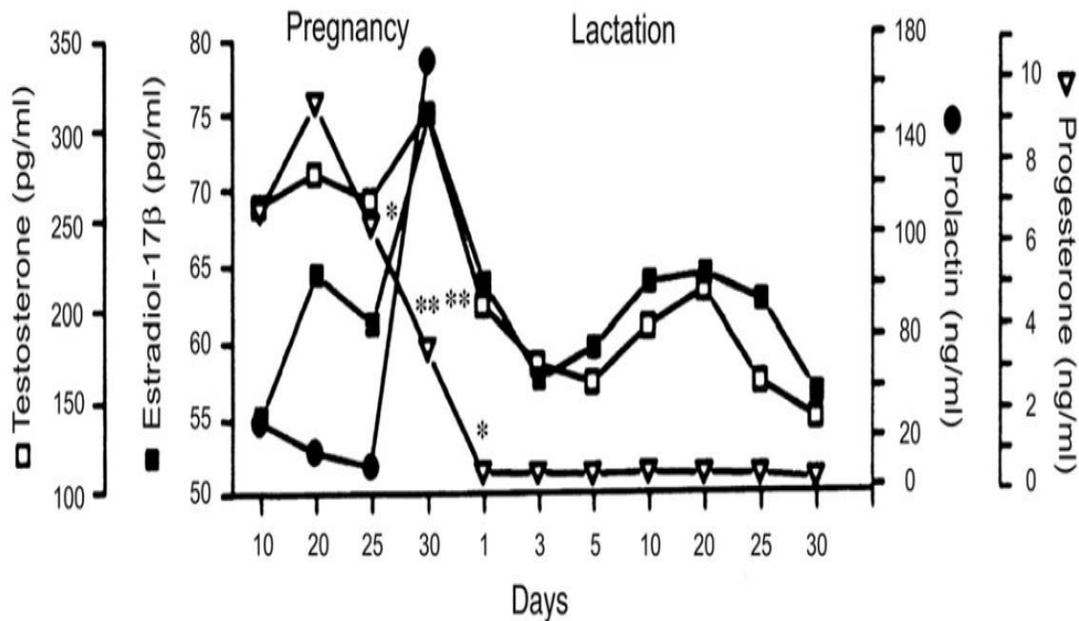


Figura 3. Niveles séricos de testosterona, estradiol, prolactina y progesterona en la coneja gestante y lactante. Tomado de [Beyer y cols. 2007](#).

1.2.2 Receptores de estrógenos

Las acciones de los estrógenos están mediadas por los receptores de estrógenos alfa ($ER\alpha$), beta ($ER\beta$) y receptor 30 acoplado a proteína G (GPR30 o GPER1) ([Tang y cols. 2019](#)). El $ER\alpha$ se encuentra distribuido a lo largo del útero, epidídimo, mama, hígado, riñón y tejido adiposo blanco; mientras que, el $ER\beta$ se encuentra en colon, glándula salival, endotelio vascular, pulmón y vejiga. Ambos se encuentran en próstata, ovario, testículos, musculo esquelético y cerebro. Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de hormonas esteroides nucleares y están compuestos por una región de dominio al ADN, un dominio de unión al ligando y un dominio N-terminal. El $ER\alpha$ tiene 3 isoformas; mientras que, el $ER\beta$ tiene 5 ([Vrtačnik y cols. 2014](#); Tabla 2).

Por su parte, el GPER1 pertenece a la familia de los receptores transmembrana acoplados a proteína G. Este receptor se une específicamente a estrógenos y desencadena la cascada de señalización intracelular característica de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) ([Prossnitz y cols. 2007](#); Tabla 1). El dominio amino se encuentra en el exterior de

la célula, el carboxilo-terminal se encuentra en el citoplasma, sin embargo, estudios recientes han sugerido también su presencia en el núcleo. Entre las acciones de GPR30 está la activación de quinasas reguladas por señales extracelulares, por sus siglas en inglés: ERK1/2 mediante la unión de estradiol, activa la vía fosfatidilinositol 3 quinasa, por sus siglas en inglés: PI3K/Akt, y también puede estimular el crecimiento de queratinocitos induciendo la expresión de ciclina D2 y c-Fos. El GPER1 actúa como factor de crecimiento del tejido conectivo, ácido graso sintasa y aumenta el crecimiento endotelial vascular (Albanito y cols. 2007; Tang y cols. 2019). El GPER1 se encuentra en distintos órganos y tejidos, y se ha relacionado con algunas patologías que se resumen en la tabla 2 (Prossnitz & Barton 2011).

CARACTERÍSTICA DEL RECEPTOR	ER α	ER β	GPER1
Superfamilia a la que pertenecen Tipo	superfamilia de receptores de hormonas esteroideas nucleares Nuclear		Superfamilia de receptores acoplados a proteína G Acoplado a proteína G unida a membrana
Estructura	Dominio de unión al ADN, dominio de unión al ligando, dominio N-terminal		7 regiones α -helicoidales transmembrana, 4 segmentos extracelulares y 4 citosólicos
Región cromosómica	6q25.1	14q23.2	7p22.3
Peso molecular	67kDa	55kDa	41kDa
Número de isoformas	3	5	1
Número de aminoácidos	595 aa	530 aa	375 aa
Distribución en tejidos humanos	útero, epidídimo, mama, hígado, riñón, tejido adiposo blanco, próstata, ovario, testículos, esqueleto, cerebro	colon, glándula salival, endotelio vascular, pulmón, vejiga, próstata, ovario, testículos, esqueleto, cerebro	sistema nervioso central y periférico, útero, ovarios, glándulas mamarias, testículos, células espermatogoniales, sistema gastrointestinal, páncreas, riñón, hígado, glándulas suprarrenales y pituitarias, tejido óseo, sistema cardiovascular, células inmunes

Tabla 2. Resumen de las características de los receptores de estrógenos. Modificado de Vrtačnik y cols. 2014.

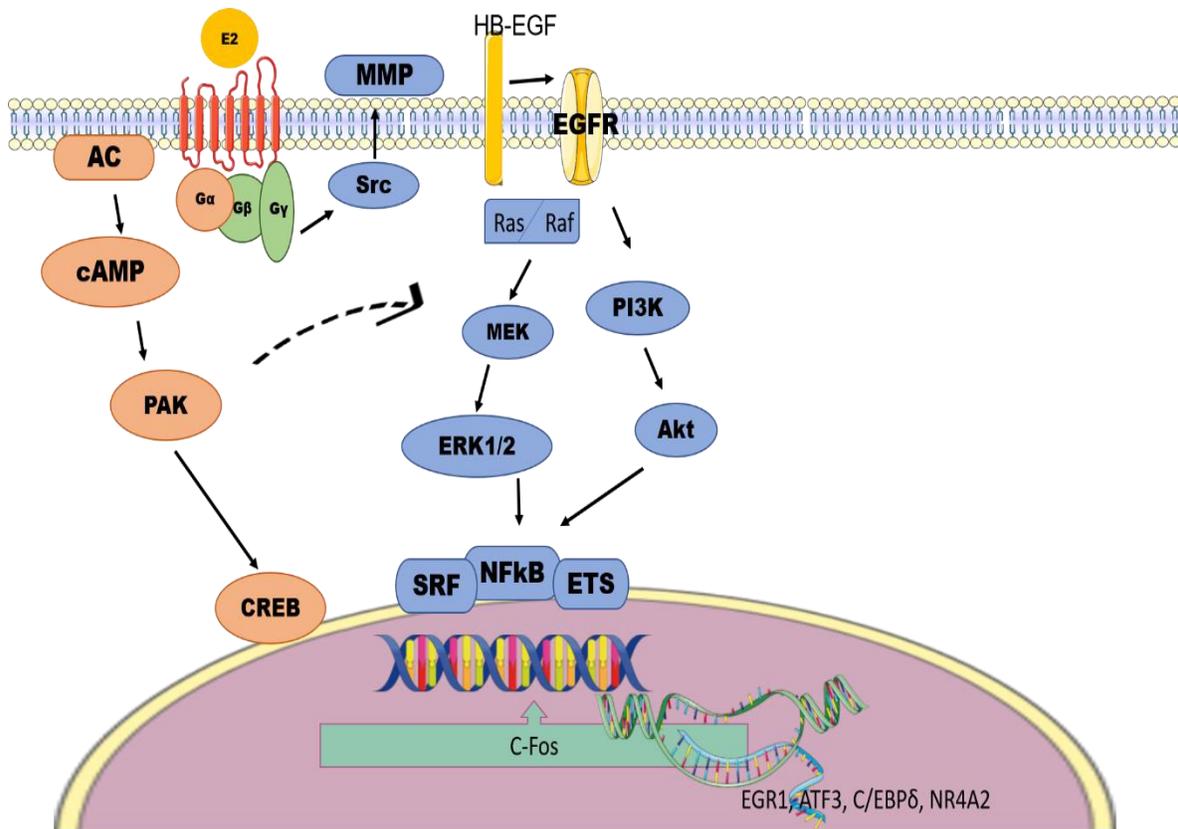


Figura 4. Resumen de las vías de señalización activadas por GPER1. Modificado de [Molina et al., 2017](#).

1.2.3 Estrógenos y alteraciones de la gestación

Placenta accreta. La hCG ha sido involucrada en el desarrollo de la placenta accreta, dado que su concentración es menor en las mujeres con este tipo de placenta ([Einerson y cols. 2019](#)). Si bien aún son escasos los estudios que relacionan a los estrógenos con el desarrollo de placenta accreta ([Saito y cols. 2019](#)), es posible que ellos pudieran estar involucrados en el descontrol de la migración del trofoblasto para producir la hiper invasión placentaria. De manera que, si la hCG está disminuida y, por ende, se modifica la síntesis estrogénica, la expresión de los ERs y de GPR30 también podría verse afectada.

Bajo peso corporal al nacimiento. Peso bajo para las semanas de gestación se ha relacionado en algunos estudios con los niveles elevado de estradiol y testosterona en la madre ([Svensson y cols. 2019](#)). De manera contraria, los niveles altos de estriol (E3) se han asociado con el desarrollo óptimo y el crecimiento adecuado del feto durante su desarrollo,

lo cual puede ser un indicador de bajo peso al nacimiento si este estrógeno se encuentra disminuido (Mucci y cols. 2003).

Diabetes gestacional. De manera normal, en el embarazo se tiene una mayor demanda de energía, por lo que se busca que el tejido adiposo absorba mayor cantidad de glucosa. Esto se logra aumentando los niveles de secreción de insulina (Plows y cols. 2018). Los estrógenos están involucrados en el desarrollo de la diabetes gestacional, ya que ocurre una disminución en su concentración en el cordón umbilical (Qi y cols. 2017).

Abortos. Se ha demostrado mediante estudios con ratas, que niveles séricos elevados de estrógenos, causan infertilidad y abortos espontáneos porque se ven afectados los genes que participan en la implantación. Dado que los niveles de estrógenos son los que determinan el tiempo de ventana de receptividad uterina, un aumento de esta hormona acortará este tiempo impidiendo una correcta implantación (Li et al., 2016).

1.3 Generalidades de las hormonas tiroideas

La glándula tiroides, forma parte del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, sintetiza y secreta la hormona tiroxina (T4) y en menor cantidad la triyodotironina (T3). Esto debido a la estimulación por la hormona estimuladora de la tiroides (TSH), a su vez estimulada por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), sintetizada en la región parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). La acción de T3 y T4 están en gran parte, regulada por su receptor (THR) y cada tejido modifica a estas hormonas de acuerdo con sus necesidades a través de tres yodotironinas desyodasas (D1, D2 y D3). Las D1 y D2 convierten T4 en T3 mediante una desyodación en posición 5' del anillo exterior. La D1 también es responsable del reciclaje de yodo de las yodotironinas inactivas. La D2 además es responsable de la conversión local de T4 a T3 activa en diferentes tejidos y D3, expresada en particular en el cerebro y en órganos de la interfaz fetal-materna, cataliza la desyodación del ion alojado en la posición 5' del anillo interno de T4 produciendo T3 inactiva (T3r) (Moog y cols. 2017). Al igual que los estrógenos, las T3 y T4 median su función mediante su receptor que pertenece también a la superfamilia de receptores nucleares, y tiene 6 isoformas, pero las más comunes son THR β 1, THR β 2 y THR α 1 (Ortiga-Carvalho y cols. 2014).

El aumento de la concentración de las hormonas tiroideas se conoce como hipertiroidismo, mientras que una ausencia de éstas es conocido como hipotiroidismo. El hipotiroidismo, a su vez, se divide en hipotiroidismo primario o clínico e hipotiroidismo secundario o subclínico. En el primer caso, se caracteriza por un decremento de T4 libre, acompañado por un aumento en la concentración de hormona estimulante de la tiroides (TSH) fuera de los rangos normales. En el segundo caso, hay un aumento en la producción de TSH, pero los niveles de T4 libre se encuentran dentro de los rangos de referencia (Chaker y cols. 2017). El hipotiroidismo afecta a múltiples órganos y sistemas como cardiovascular, neurosensorial, gastrointestinal, endocrino y metabolismo general. Todo esto mediante signos como dislipidemias, neuropatías, disminución de la sensibilidad olfativa y gustativa, función cognitiva deteriorada, hígado graso no alcohólico, desregulación de la glucosa y problemas en la fertilidad (Chaker y cols. 2017; Carlé y cols. 2014).

1.3.1 Hipotiroidismo en la gestación

En el embarazo, la aparición de la hCG es fundamental ya que su principal función es mantener y dar soporte al cuerpo lúteo. La hCG aparece a los 4 días después de la implantación para rescatar el cuerpo lúteo y su gen está expresado principalmente por el sincitiotrofoblasto, pero también por el citotrofoblasto (Kumar y Magon 2012). Durante el primer trimestre del embarazo e inicio del segundo, la relación entre la concentración media de las hormonas TSH y hCG se dirigen en direcciones contrarias, al aumentar la concentración de hCG, la TSH disminuye. Al finalizar el segundo trimestre del embarazo y durante el tercero, los niveles de hCG nuevamente disminuyen y el nivel de TSH aumenta (Haddow y cols. 2008). Por esta relación inversa, la concentración media de la T4 libre es afectada, mostrándose aumentada en el inicio del embarazo y disminuida al final del embarazo. Las modificaciones de la concentración de la tiroxina tienen efectos sobre la globulina transportadora de hormonas sexuales, además de que modifica los niveles séricos de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH) y prolactina, disminuyendo la concentración E2 y aumentando a las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). Lo que sugiere que el hipertiroidismo e hipotiroidismo están relacionados con la fertilidad y reproducción (Kumar y Magon 2012; Saran y cols. 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1 GPR30 y embarazo

Los estrógenos son capaces de favorecer la proliferación e inhibir la apoptosis del epitelio uterino (Lou y cols. 2017; He y cols. 2019). Respecto a receptores, particularmente, la presencia del GPER1 en el epitelio del tejido endometrial sugiere una participación en la migración de los espermatozoides favoreciendo la fecundación (Kolkova et al., 2010). Además, incrementa la expresión de metaloproteasas promoviendo la invasión del trofoblasto (Tong y cols. 2016). La expresión de GPER1 en las células trofoblásticas es promovida por la concentración de estrógenos (Feng y cols. 2017). Durante el embarazo, el GPER1 participa en la vasodilatación de la arteria uterina, misma que tiene función en el transporte de nutrientes y respiración materno-fetal (Bai y cols. 2020).

2.2 Hipotiroidismo y bajo peso al nacimiento

Los trastornos de la tiroides son muy frecuentes en mujeres embarazadas, pero estas deben ser tratadas ya que pueden tener consecuencias fatales. El hipotiroidismo en el embarazo puede tener consecuencias como abortos espontáneos, desprendimiento de la placenta, nacimiento prematuro, sufrimiento fetal y preeclampsia, anemia, hemorragia postparto, síndrome de dificultad respiratoria en recién nacido y bajo peso al nacimiento (Teng y cols. 2013; Hou y cols. 2013). Estos efectos han sido probados también en modelos animales, por ejemplo, se evaluó la restricción del crecimiento uterino en ratas (Silva y Serakides, 2016), el bajo peso al nacimiento (Hou y cols. 2013), preeclampsia (Sullivan y cols. 2019), e incluso abortos (Negro y cols. 2014) en humanos. En la coneja, el hipotiroidismo también afecta la histología y función uterina, aumentando su tamaño e induciendo hiperplasia uterina (Rodríguez-Castelán y cols. 2019a,b). En conejas gestantes, el hipotiroidismo durante la gestación promueve críos de bajo peso, se observó una disminución en el perímetro abdominal, y una disminución en los niveles uterinos de triglicéridos y colesterol total. Aunque los niveles de glucógeno fueron similares entre los grupos control e hipotiroideo (Rodríguez-Castelán y cols. 2019b).

2.3 Hipotiroidismo y estrógenos

El hipotiroidismo disminuye la concentración sérica de estradiol en ratas hipotiroideas (Kowalczyk-Zieba y cols. 2021) y aunque bajo esta misma condición no se modifica la concentración sérica de estrógenos en conejas vírgenes (Anaya-Hernández y cols. 2015) y gestantes, si aumenta la expresión de aromatasa en el útero (Espíndola-Lozano y cols. en escritura), ovario (Rodríguez-Castelán y cols. 2017) y páncreas (Rodríguez-Castelán y cols. 2022), sugiriendo que el cambio en la concentración de estrógenos pudiera ser local.

El hipotiroidismo regula la expresión de TR α en útero (Rodríguez-Castelán y cols. 2019b) y de TR α , TR β y GPR30 en páncreas (Rodríguez-Castelán y cols. 2022) de conejas vírgenes. El hipotiroidismo disminuye la expresión de receptores ER α , ER β y GPR30 en testículo de ratas (Yao y cols. 2018) y en bocio en humanos (Weber y cols. 2015).

Dentro de los cambios que se han reportado del hipotiroidismo sobre la expresión de la aromatasa, se encuentran los resultados obtenidos en este grupo de trabajo, en donde, en un modelo de coneja hipotiroidea no gestante, esta enzima se observó aumentada, mientras que, en un modelo de coneja gestante, los niveles de aromatasa solo se vieron incrementados en el día 20 de la gestación (Espindola Lozano y cols. en escritura).

3. JUSTIFICACIÓN

La población de mujeres embarazadas es significativa en la prevalencia de hipotiroidismo, siendo de 0.2 a 0.5% respecto a hipotiroidismo clínico y de 2 a 5% en hipotiroidismo subclínico (IMSS, 2016). El hipotiroidismo en el embarazo está asociado a complicaciones como abortos espontáneos, bajo peso al nacer y síndrome de dificultad respiratoria de recién nacido (Andersen y cols. 2016). Como se dijo anteriormente, el embarazo está regido por distintas hormonas y sustancias, siendo los estrógenos una de las hormonas más importantes de este proceso fisiológico, por lo que una alteración en la síntesis de éstos afectado por el hipotiroidismo, puede desencadenar en una complicación como el bajo peso corporal de las crías (Arbib et al., 2017).

El hipotiroidismo regula la expresión de receptores de estrógenos. Por ejemplo, en el útero, el hipotiroidismo modifica la expresión del ER α (Rodríguez-Castelán y cols. 2019b); mientras que en el páncreas aumenta la expresión del ER α y reduce la expresión del ER β y GPER1 (Rodríguez-Castelán y cols. 2022). Particularmente, el GPER1 está presente en el endometrio normal y en la decidua durante el embarazo. Su expresión se modifica en cada etapa del embarazo, así como en cada región del útero, por lo cual tienen una alta influencia en el mantenimiento del embarazo, además de estar muy ligada al proceso de la correcta fertilización (Kolkova y cols. 2010). El GPER1 regula la invasión del trofoblasto promoviendo genes involucrados en la respuesta de hipoxia, apoptosis, proliferación, inflamación y estrés oxidativo (Cheng y cols. 2021; Shu y cols. 2021). Su expresión está directamente relacionada con el contenido de estrógenos (Shu y cols. 2021).

Por lo anteriormente descrito, en el presente estudio pretendemos analizar la influencia del hipotiroidismo en la expresión la GPER1 en el útero de conejas gestantes, que nos permitiera sugerirlo como un mecanismo para explicar el bajo peso al nacimiento (Rodríguez-Castelán y cols. 2019a).

4. HIPÓTESIS

El crecimiento fetal, que es afectado por el hipotiroidismo, se relaciona con menor concentración de estradiol, expresión de aromatasa y expresión de GPER1 en el útero de conejas de 20 días de gestación.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar si el crecimiento fetal, que es afectado por el hipotiroidismo, se relaciona con la concentración de estradiol, la expresión de aromatasa y GPER1 en útero de conejas de 20 días de gestación.

5.2 Objetivos específicos

En conejas de 20 días de gestación controles e hipotiroideas:

1. Determinar el número y características morfométricas de los fetos.
2. Cuantificar la concentración de estradiol mediante ELISA en sitios de implante de fetos con normo y bajo peso
3. Cuantificar la expresión de aromatasa mediante western blot e inmunohistoquímica en sitios de implante de fetos con normo y bajo peso
4. Cuantificar la expresión de GPER1 mediante western blot e inmunohistoquímica en sitios de implante de fetos con normo y bajo peso

6. METODOLOGÍA

Animales de experimentación. El cuidado, manejo y experimentación con los animales se realizó de acuerdo con la legislación mexicana bajo la NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y al reglamento interno para el cuidado de animales de laboratorio del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx). Se utilizaron 12 conejas de la raza chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) gestantes de entre 8-12 meses de edad. Los animales se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ con ciclos de 16 h luz/8 oscuridad en el bioterio del CTBC. Los animales se alojaron en jaulas individuales de acero inoxidable (50 x 60 x 40 cm) y fueron alimentadas con 120 gramos de alimento cuando no se encuentran gestante y 300 gramos cuando están gestando. Se les proporcionó 300 ml de agua *ad libitum*. El consumo de agua y alimento fue registrado diariamente. Se realizaron promedios del registro de alimento y agua por semana para cada uno de las conejas y posteriormente se obtuvieron los promedios por grupo. Los animales fueron divididos en dos grupos: grupo control y grupo hipotiroideo de conejas gestantes de 20 días. Se registró el peso corporal 1 cada semana de las conejas gestantes. Se realizaron promedios de las medidas por semana por animal y posteriormente se realizaron los promedios por grupo.

Inducción del hipotiroidismo. El hipotiroidismo se indujo en los animales mediante el tratamiento de metamizol diluido en agua potable en una concentración del 0.2% durante 30 días. Para el grupo gestante de 20 días se ajustó el tratamiento con metamizol 10 días previo a la cópula para tener 30 días de tratamiento. Al finalizar el tratamiento se realizó eutanasia con sobredosis de anestésico pentobarbital sódico.

Morfometría fetal. Se obtuvo la porción media del útero de los sitios con implante que alojaron críos de peso promedio, bajo y alto. También se tomó una porción de útero sin implante de ambos cuernos uterinos, siendo destinada la porción izquierda para el análisis mediante inmunohistoquímica y la derecha para el análisis con western blot y PCR. Se registró el peso y medidas corporales de cada uno de los críos. Se utilizó un vernier digital

para tomar las mediciones de longitud y ancho de cabeza, longitud y ancho abdominal, longitud corporal y peso de feto y de la placenta.

Inmunohistoquímica. La región izquierda del útero se fijó en bouin por 12 horas, posteriormente se inició la deshidratación mediante alcoholes de distinta concentración (60-100%) de manera ascendente y en diferentes lapsos de tiempo, una vez deshidratado, se procedió a incluirlos en parafina para su conservación y uso. Una vez que tuvimos el órgano incluido en parafina, se realizaron cortes histológicos de un grosor de 5µm con ayuda del micrótopo Leica RM, m y se colocaron 6 cortes por laminilla, se dejaron madurar durante 30 días, al término de proceso se eligió la laminilla para realizar la técnica de inmunohistoquímica de acuerdo con el método adivina-biotina-peroxidasa. Se incubaron en una solución buffer de citratos (pH=6) durante tres noches y se incubaron con el primer anticuerpo (1:250; ab39742; Abcam incorporation, Cambridge, USA) en una cámara húmeda a 4°C durante una noche. Una vez realizado esto, se incubaron con un anticuerpo secundario (1:500) sc-2004, santa cruz biotechnology, TX, USA), durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, los cortes se lavaron con una solución buffer de fosfatos (PBS; pH=7) y se incubaron con el ABC durante 1 h y se realizó el revelado con una solución de diaminoenzidina (DAB) al 0.05% y H₂O₂ al 3% en PBS hasta observar el marcaje en el tejido de útero con ayuda de un microscopio de luz visible (Nikon ECLIPSE E600). Los cortes fueron deshidratados en alcoholes en concentraciones descendentes y fijados con Cytoseal TM60 y un cubreobjetos.

Western Blot. Se obtuvo aproximadamente 50mg de tejido uterino de los sitios con implante y clasificándolo en bajo peso, normo peso y macrosómicos. Se machacaron para obtener extractos, usando un homogeneizador electrónico (TissueTearor, bioSpec Products, Inc.) en buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM glicina, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 1mM DL-Ditiotreitol añadido con inhibidor de proteasa). Treinta microgramos de extracto fueron desnaturalizados en Laemmli's sample buffer y SDS-PAGE y se electroblotaron en membranas de nitrocelulosa (Laboratorios Bio-Rad). Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau para confirmar que el contenido de la proteína fuera igual en todas las líneas. Las membranas se sumergieron en leche al 17.0% en tampon trisalino (TSBT) con tween al 0,2% y se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario, seguido del anticuerpo secundario. La señal se detectó usando un kit de

quimioluminiscencia (West Pico Signal, Thermo Scientific). La señal quimioluminiscente se capturó y analizó con un analizador de señal quimioluminiscente (MyECL Imager, Thermo Fisher Scientific). La expresión de GPER1 se midió por densitometría normalizándola contra la señal del rojo de Ponceau.

ELISA. Al realizar la eutanasia se obtuvo una muestra sanguínea mediante punción cardiaca, con ayuda de un equipo de venopunción. Se recolectó la muestra en un tubo color rojo (no contiene ningún anticoagulante), el cual se dejó reposar y se centrifugó a 3500 RPM durante 5 minutos. Se separó el suero. El suero obtenido durante el sacrificio se almacenó para su análisis a -80 °C. Para la extracción de hormonas esteroideas totales se colocaron 100 µL de suero en un tubo de vidrio. Se agregó a cada tubo 1mL de éter etílico y se agitó durante 30s. Posteriormente, se colocaron las muestras en el congelador hasta la separación de fases. La fase orgánica fue recolectada y el éter etílico se evaporó en baño María a 40°C en una campana de extracción. A continuación, se agregó 1 mL de metanol a cada tubo, se agitó por 10 s, y se centrifugó (5000 rpm, 5 min). El etanol se evaporó en baño María a 80°C en una campana de extracción. El extracto fue resuspendido en 55 µL de buffer de ELISA (PBS 50Mm/ 0.1% gelatina). Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm por 1 min. Posteriormente, las muestras se incubaron por 10 min a 37°C en baño María. La cuantificación se hizo por la técnica de ELISA siguiendo las indicaciones contenidas en los kits de los fabricantes.

Análisis estadístico. Los datos recabados se registraron en una base de datos y fueron analizados con ANOVA de una vía o Kruskall Wallis, t-Student p U-Mann Whitney, según corresponda. Se usó la prueba de Kolmogorov para comprobar la normalidad de los datos. La significancia estadística fue considerada con $P \leq 0.05$. Todo esto se llevó a cabo mediante el programa estadístico *Prism graphPad*.

7. RESULTADOS

7.1 Consumo de alimento y ganancia de peso en las conejas

Se tuvieron 11 hembras controles y 8 hembras hipotiroideas. En la primera semana, cuando los animales aún no estaban gestantes, ambos grupos consumieron la misma cantidad de alimento ($U= 25.5$; $P=0.12$). Sin embargo, en el primer tercio de la gestación, el consumo de alimento de las hembras hipotiroideas fue menor que las hembras controles ($t=3.0$; $df= 17$; $P= 0.006$). Esto mismo fue observado en el segundo tercio de la gestación ($t=2.4$; $df= 17$; $P= 0.02$) (Figura 4). Respecto a la ingesta de agua, los animales tiran mucha agua, particularmente los animales hipotiroideos, por lo que su análisis no es fiable. Por tal razón no se muestran.

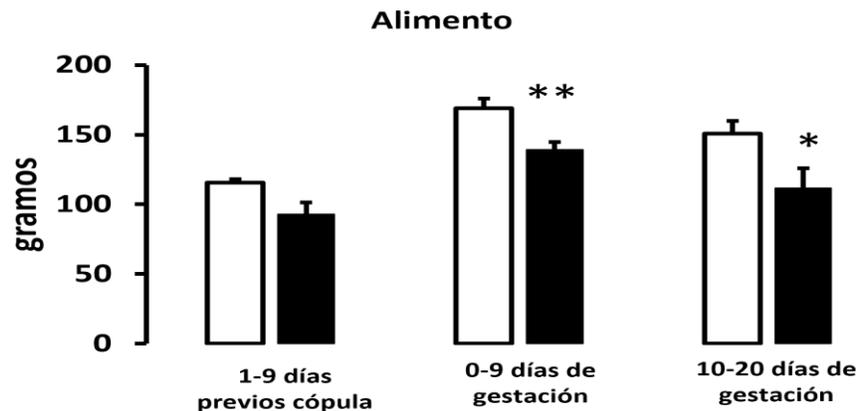


Figura 4. Ingesta de alimento del grupo control (barra blanca) e hipotiroideo (barra negra). * $P<0.01$; ** $P=0.006$.

La edad de las madres fue similar entre ambos grupos (Tabla 4). La ganancia de peso de las conejas considerando el peso inicial (inicio del experimento) y final (día del sacrificio) fue similar entre los grupos control e hipotiroideo (Tabla 4).

7.2 Implantes y reabsorciones

El número de implantes vivos y reabsorciones de las hembras controles e hipotiroideas fue similar (Tabla 4). El total de implantes mostró una tendencia a ser menor en el grupo hipotiroideo (Tabla 4).

VARIABLE	CONTROL n=11	HIPOTIROIDEO n= 8	ESTADÍSTICA
Edad materna (meses)	7.1 ± 0.1	7.4 ± 0.3	U= 36.5; P= 0.36
Incremento de peso de la madre (gramos)	9.3 ± 1.5	6.8 ± 2.1	t= 1.0; df=17; P=0.32
Implantes vivos	9.8 ± 0.7	8.1 ± 1 0.5	t= 1.4; df=17; P=0.17
Reabsorciones	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.4	U= 42.5; P= 0.92
Implantes totales	10.3 ± 0.5	8.8 ± 1 0.6	t= 1.9; df=17; P=0.06

Tabla 4. Datos maternos y fetales de los grupos control e hipotiroideo.

7.3 Pesos y tamaños fetales

Se realizaron histograma de distribución con los pesos, anchos de abdomen y longitud corporal de los fetos. Encontrándose que las madres hipotiroideas tuvieron fetos con menor peso y menor longitud, aunque no se observaron diferencias en el ancho de abdomen (Figura 5). De este histograma de distribución se propuso un punto de corte de 4.6 g para diferenciar el bajo y el normopeso fetal. Tomando en cuenta los datos anteriormente explicados, los sitios de implante que incluyen placenta y útero fueron clasificados en: 1) implante de coneja

control de un feto con bajo peso (CBP), 2) implante de coneja hipotiroidea de un feto con bajo peso (HBP), 3) implante de coneja control de un feto con normopeso (CNP) y 4) implante de coneja hipotiroidea de un feto con normopeso (HNP).

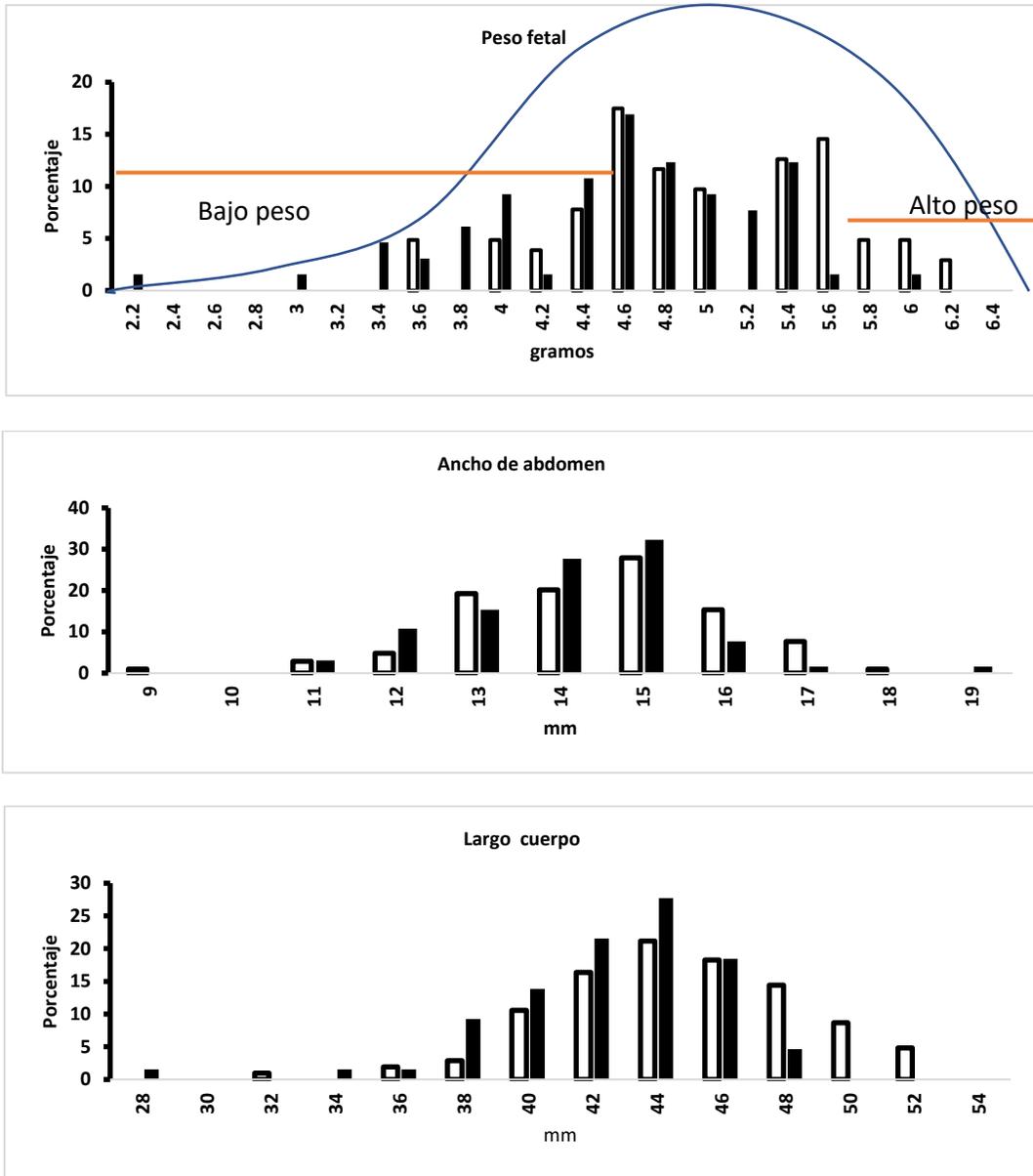


Figura 5. Histograma de distribución de pesos (arriba), ancho de abdomen (intermedio) y longitud corporal (abajo) de fetos de madres control (blanca) e hipotiroideas (negro).

7.4 Niveles de estradiol en suero e implantes

El análisis de estradiol en suero de las hembras controles e hipotiroideas mostró que no hubo diferencias significativas entre los grupos (Figura 6; $t=0.66$; $P=0.52$). Respecto al contenido de estradiol en la interfase materno-fetal, dependiendo del peso fetal, encontramos que, quizá debido a la n de 3 animales, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 6; $K=5.9$; $P=0.11$). Si agrupamos los fetos controles y los hipotiroideos independientemente del tamaño, los implantes provenientes de animales hipotiroideos tuvieron una menor concentración de estradiol que los controles ($t=2.9$; $df=10$; $P=0.01$).

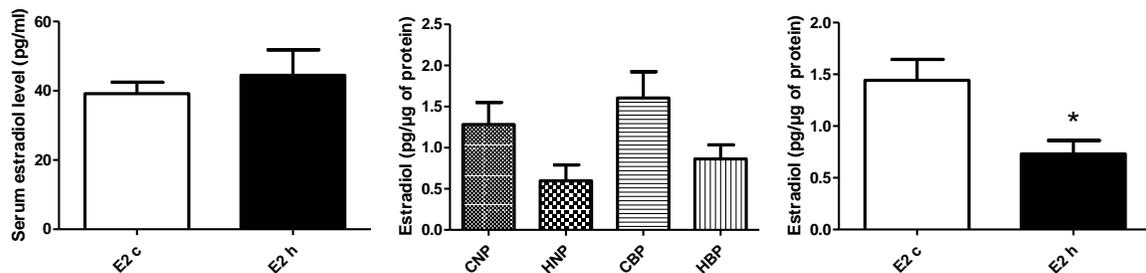


Figura 6. Contenido de estradiol en suero (izquierda) de madres controles ($n=6$) e hipotiroideas ($n=6$) y en implantes uterinos (centro) de fetos provenientes de animales controles e hipotiroideos de acuerdo con su peso corporal: control normopeso (CNP, $n=3$), hipotiroideo normopeso (HNP; $n=3$), control con bajo peso (CBP; $n=3$) e hipotiroideo con bajo peso (HBP; $n=3$). Análisis de estradiol en implantes solo entre controles ($n=6$) e hipotiroideos (derecha, $n=6$). La n corresponde al número de implantes en cada categoría de peso y no al número de madres.

7.5 Expresión de aromatasa

Para la expresión de la enzima aromatasa se utilizó como control positivo testículo de rata. No se encontraron diferencias en la expresión de la enzima entre los implantes considerando el peso corporal de los fetos (Figura 7; $F=1.38$; $P=0.02763$).

Se realizó la descripción de la inmunolocalización de aromatasa en los sitios de implante de hembras controles e hipotiroideas. Se identificaron los diversos tipos celulares tanto maternos (células gigantes, epitelio, glándulas, músculo y estroma) como fetales (espongiotrofoblasto y células gigantes). Se muestra algunos ejemplos de la expresión de aromatasa (Figura 8).

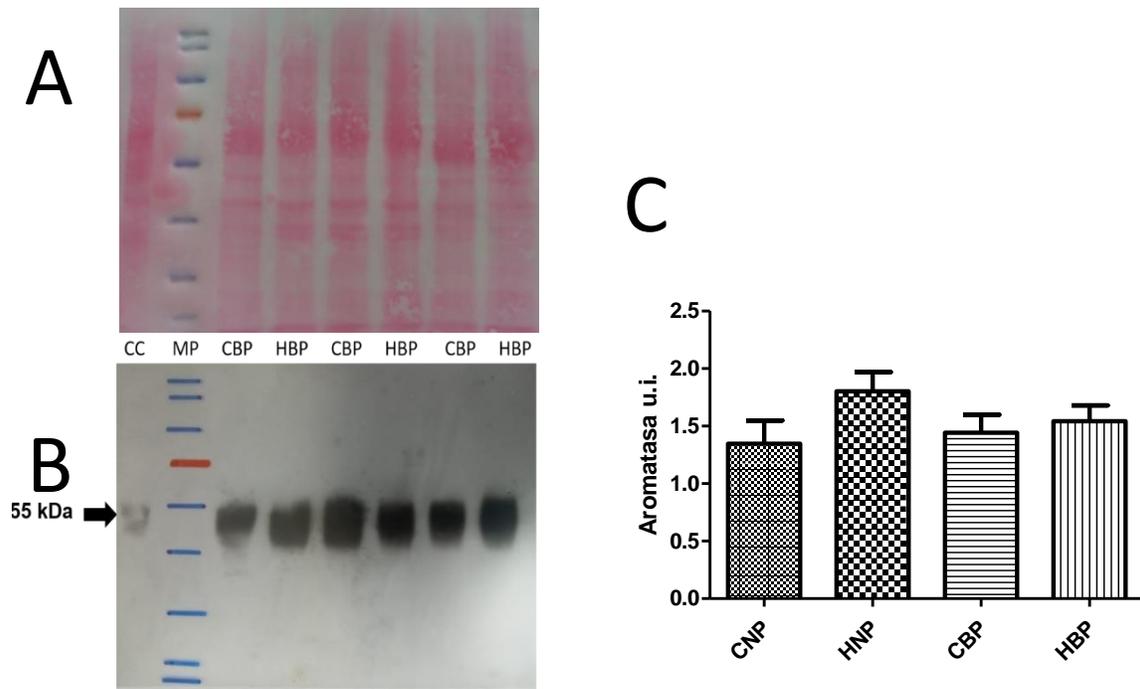


Figura 7. Expresión de aromatasa en implantes uterinos de fetos provenientes de animales controles e hipotiroides de acuerdo con su peso corporal: control normopeso (CNP, n=6), hipotiroido normopeso (HNP; n=6), control con bajo peso (CBP; n=6) e hipotiroido con bajo peso (HBP; n =6). A: membrana de rojo de Ponceau; B: western blot; C: Cuantificación relativa de aromatasa. La n corresponde al número de implantes en cada categoría de peso y no al número de madres. No hay implantes hermanos en el mismo grupo.

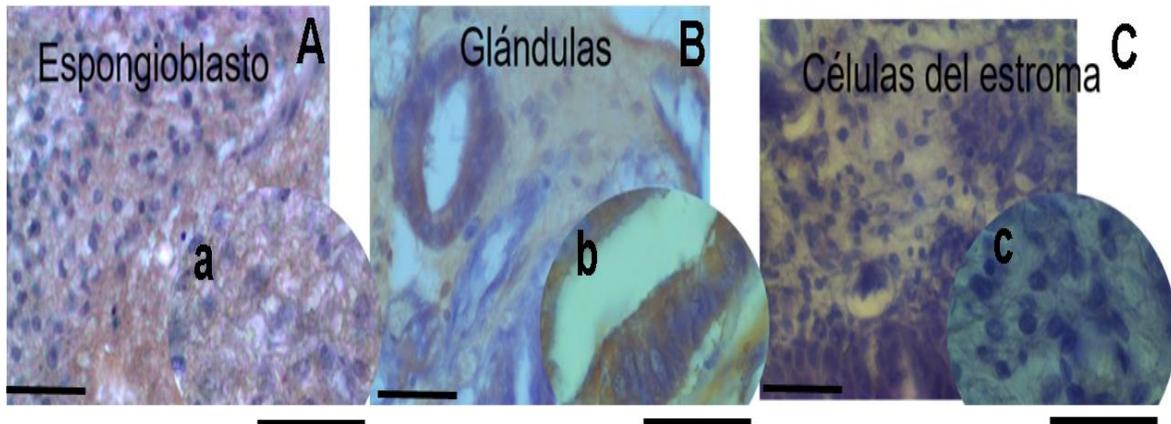


Figura 8. Imágenes representativas de expresión de aromatasa en implantes controles mediante inmunohistoquímica. Se muestran células del estroma, placenta (espongioblasto; A y a), glándulas (B y b) y estroma (C y c). Escalas A-B= 50 μ m, a-c= 20 μ m.

Los implantes controles con bajo y normopeso mostraron una inmunolocalización de la expresión de aromatasa similar en todos los tipos celulares. Mientras que los implantes hipotiroideos con normo y bajo peso mostraron una mayor expresión de aromatasa en el espongioblasto y glándulas que los implantes controles normopeso y bajo peso (Tabla 5). La expresión de esta enzima en las células gigantes del estroma fue mayor en los implantes hipotiroideos con normopeso.

	Hipotiroideos		Controles	
	Bajo peso n=3	Normo Peso n=3	Bajo Peso n=3	Normo peso n=3
Sincitiotrofoblasto	(+)	(+)	(+)	(+)
Espongioblasto	(++)	(++)	(+)	(+)
Células gigantes	(+)	(++)	(+)	(+)
Epitelio	(+)	(+)	(+)	(+)
Glándulas	(++)	(++)	(+)	(+)
Músculo	(+)	(+)	(+)	(+)
Estroma	(+)	(++)	(+)	(+)

Tabla 5. Localización de la expresión de aromatasa mediante inmunohistoquímica en sitios de implante con bajo y normopeso de madres controles e hipotiroideas. La n corresponde al número de implantes en cada categoría de peso y no al número de madres. No hay implantes hermanos en el mismo grupo.

7.6 Expresión de GPER1

Para la expresión de GPER1 se utilizó como control positivo ovario de coneja. No se encontró diferencia en la expresión de la proteína entre los implantes considerando el peso corporal (Figura 9; F=0.096; P= 0.961).

Se realizó la descripción de la inmunolocalización de GPER1 en los sitios de implante de las hembras controles e hipotiroideas. Se identificaron los diversos tipos celulares tanto maternos (células gigantes, epitelio, glándulas, músculo y estroma) como fetales (espongiotrofoblasto y células gigantes) (Figura 10).

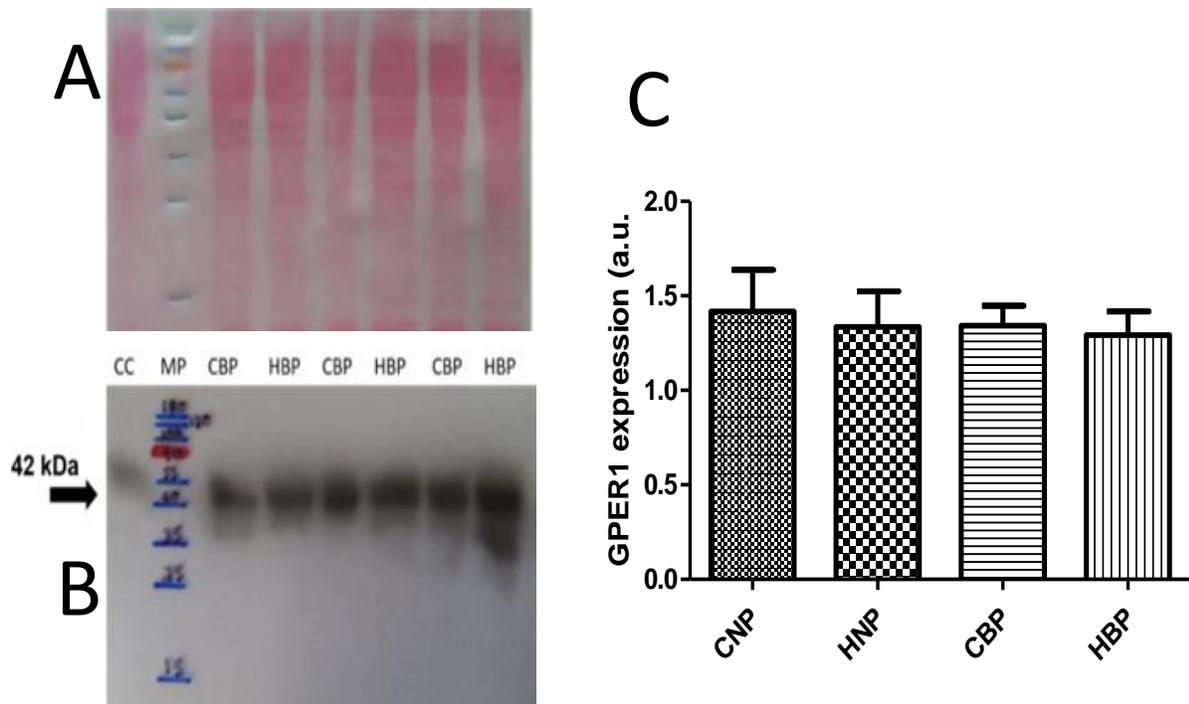


Figura 9. Expresión de receptor GPER1 en implantes uterinos de fetos provenientes de animales controles e hipotiroides de acuerdo con su peso corporal: control normopeso (CNP, n=6), hipotiroido normopeso (HNP; n=6), control con bajo peso (CBP; n=6) e hipotiroido con bajo peso (HBP; n=6). A: membrana de rojo de Ponceau; B: western blot; C: Cuantificación relativa de la proteína de GPER1. La n corresponde al número de implantes en cada categoría de peso y no al número de madres. No hay implantes hermanos en el mismo grupo.

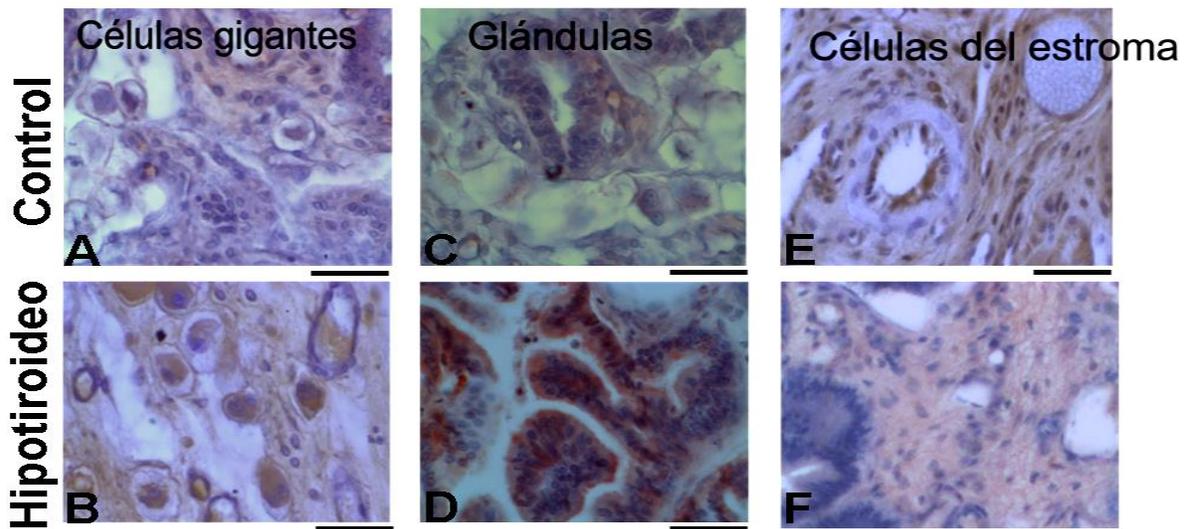


Figura 10. Imágenes representativas de expresión de GPER1 mediante inmunohistoquímica en implantes uterinos controles e hipotiroides. Se muestran células de placenta (células gigantes, A y B), glándulas (C y D) y estroma (E y F). Escalas A y B= 50 μ m, C-F=20 μ m.

Los implantes controles con bajo peso mostraron una mayor inmunolocalización en el sincitiotrofoblasto en comparación con los normopeso. Mientras que los implantes hipotiroideos con normopeso mostraron una mayor expresión de GPER1 en el espongioblasto y estroma que los implantes controles normopeso (Tabla 6).

Hipotiroideos		Controles	
Bajo peso n=3	Normo Peso n=3	Bajo Peso n=3	Normo peso n=3
Sincitiotrofoblasto	(+)	(+)	(++)
Espongioblasto	(+)	(++)	(+)
Células gigantes	(+)	(+)	(+)
Epitelio	(+)	(+)	(+)
Glándulas	(+)	(+)	(+)
Músculo	(+)	(+)	(+)
Estroma	(+)	(++)	(+)

Tabla 5. Localización de la expresión de GPER1 mediante inmunohistoquímica en sitios de implante con bajo y normopeso de madres controles e hipotiroideas. La n corresponde al número de implantes en cada categoría de peso y no al número de madres. No hay implantes hermanos en el mismo grupo.

8. DISCUSIÓN

8.1 Consumo de alimento en las conejas hipotiroideas

A lo largo del experimento y reportado previamente en los resultados, se observó que las hembras que son tratadas con metimazol para inducir el hipotiroidismo tiene una menor ingesta de alimento. Sin embargo, esta disminución en el consumo de alimento no modifica la ganancia de peso corporal de la madre. Este resultado puede ser atribuido al sabor amargo del metimazol y al aumento en la sensibilidad a los sabores reportada durante el embarazo en humanos (Choo y Dando 2017) que también pudiesen estar presentes en el embarazo de la coneja. A pesar de la menor ingesta de alimento, las hembras con hipotiroidismo mostraron una ganancia de peso similar a las conejas controles. Ello podría ser consecuencia de la mayor acumulación de tejido adiposo, como ya se reportó por nuestro grupo de investigación en conejas vírgenes (Rodríguez-Castelán y cols. 2017). Acompañado de una pérdida de masa muscular (Milanesi y cols. 2017), como ya se ha descrito en humanos.

8.2 Hipotiroidismo y crecimiento fetal

El hipotiroidismo modifica las características morfológicas e induce bajo peso corporal en las crías de conejas. Estos resultados confirman lo reportado previamente en nuestro grupo de trabajo (Rodríguez-Castelán et al., 2018). La relación entre hipotiroidismo y restricción del crecimiento originando bajo peso corporal al nacimiento ha sido observado en humanos (Hou y cols. 2013) y ratas (Silva y Serakides et al., 2016). Este bajo peso corporal es consecuencia de la restricción del crecimiento, lo que podría afectar el desarrollo de los órganos en la etapa fetal, en consecuencia, asociarse con complicaciones perinatales y neonatales (Baud y Berkane, 2019).

El menor crecimiento fetal en las crías de madres hipotiroideas podría relacionarse con la acumulación de reservas de glucógeno y lípidos en el útero, así como hormonas que participan en la distribución de energía como fuente de alimento entre la madre y el feto. Al inicio de la gestación, el tejido uterino, a través de las glándulas endometriales, proporciona nutrientes requeridos al trofoblasto. Posteriormente, la placenta es un órgano con diversas

rutas metabólicas y capacidad de transporte de lípidos, glucosa, aminoácidos, etc., requerido para el crecimiento fetal (Cindrova-Davies y Sferruzi-Perri 2022). La dieta materna tiene un impacto muy importante en el desarrollo fetal, ajustándose las características de las células placentarias (Watkins y cols. 2015). A este respecto, en estudios previos hemos encontrado que el hipotiroidismo modifica el contenido de glucógeno y lípidos en el útero de conejas vírgenes (Rodríguez-Castelán y cols. 2019b) y gestantes (Espíndola -Lozano y cols. en proceso). A la par del glucógeno también se aumenta la expresión de GLUT4 de los implantes de hembras hipotiroideas en el día 20 de gestación (Espíndola -Lozano y cols. en proceso). Estos hallazgos muestran que efectivamente, el hipotiroidismo regula el metabolismo uterino y con ello podría interferir con el crecimiento fetal. Cabe mencionar que el útero cuenta con receptores a hormonas tiroideas de tipo α y β , a través de los cuales pudiera estar ejerciendo sus efectos (Rodríguez-Castelán y cols. 2019b).

Dentro de las hormonas que se sabe interfieren con el crecimiento fetal están los estrógenos, ya que bajos niveles de estrógenos se asocian con un bajo crecimiento fetal (Mucci y cols. 2003; Baud y Berkane, 2019). Aunque Anaya-Hernández y cols., en 2015, describieron que los niveles de estrógenos a nivel sérico no se ven modificados bajo la condición de hipotiroidismo en conejas vírgenes, se desconoce lo que ocurra en la interfaz materno-fetal. En el presente estudio encontramos que, en las conejas gestantes, el hipotiroidismo tampoco afecta la concentración de estradiol circulante. La concentración de estradiol tampoco es modificada a nivel placentario dependiendo del peso corporal de los fetos. En este último punto, faltaría aumentar el número de los animales para confirmar nuestros hallazgos.

Considerando que el contenido de estrógenos en el útero podría provenir de la circulación, pero también de la síntesis local de esta hormona, fue que analizamos la expresión de aromatasa en la interfaz materno-fetal. No encontramos diferencias en la expresión de aromatasa en los implantes de acuerdo con el peso corporal fetal mediante western blot. Sin embargo, la inmunolocalización de la enzima aromatasa en las conejas hipotiroideas aumenta en algunos tipos celulares como el espongioblasto y las glándulas uterinas. Curiosamente estas células están relacionadas con las reservas metabólicas para la nutrición embrionaria y fetal (Cindrova-Davies y Sferruzi-Perri 2022). Ello sugiere que la falta de diferencias significativas en el western blot podrían deberse a los cambios al alta y

la baja en los diferentes tipos celulares presentes en la interfaz materno-fetal. Existen pocos trabajos que muestren una interacción entre hormonas tiroideas y la enzima aromatasa. En el páncreas (Rodríguez-Castelán y cols. 2022) y en el ovario (Rodríguez-Castelán y cols. 2017), el hipotiroidismo reduce la expresión de esta enzima.

Previamente reportamos que el hipotiroidismo regula la expresión de ER α en el útero de conejas vírgenes (Rodríguez-Castelán y cols. 2019b). En el presente estudio nos enfocamos a la expresión del receptor de membrana GPER, el cual se expresa en células del trofoblasto (Feng y cols. 2017) y regula la vasodilatación de la arteria uterina, afectando la nutrición fetal (Bai y cols. 2020). Este receptor también regula la contracción uterina durante el parto (Maiti y cols. 2011). Si bien no encontramos diferencias en la expresión de GPER mediante el western blot entre los implantes dependiendo del peso fetal, tanto el peso fetal como la condición de hipotiroidismo modifica la expresión en los tipos celulares de la interfase materno-fetal, particularmente del sincitiotrofoblasto y espongioblasto. En este sentido, el GPER1 en la placenta está directamente relacionado con la concentración de estrógenos, participando en la regulación de la hipoxia y oxigenación, así como en el control de la apoptosis, proliferación, inflamación y estrés oxidativo de estos tejidos (Shu y cols. 2021). Existen pocos trabajos que muestren una interacción entre hormonas tiroideas y GPER1. En el páncreas, el hipotiroidismo reduce la expresión de este receptor (Rodríguez-Castelán y cols. 2022). De acuerdo con lo observado podemos decir que el cambio en la expresión de GPER1 por hipotiroidismo depende el tipo celular, de manera que tampoco se puede generalizar un efecto estimulante o depresor.

Nuestros resultados sugieren que el hipotiroidismo promueve una reducción en el peso corporal fetal. Si bien este se podría relacionar con efectos en el metabolismo uterino que interfieran con el crecimiento, también podrían existir cambios a nivel hormonal. En el presente estudio, mostramos que las hormonas tiroideas afectan la síntesis local de estrógenos en la interfase materno-fetal (aromatasa) y sus acciones mediadas por GPER1 de manera diferencial dependiendo del tipo celular. Afectando, particularmente, a células relacionadas con la reserva energética, lo que sugiere que los estrógenos podrían modificar el metabolismo placentario y, por ende, el desarrollo de los órganos y crecimiento de los fetos.

9.CONCLUSIONES

- 1.- Se confirmó que el hipotiroidismo induce bajo peso corporal fetal, lo que podría causar bajo peso al nacimiento.
- 2.- La concentración de estradiol circulante en conejas gestantes controles e hipotiroideas al día 20 es similar. Sin embargo, si se observa una reducción en la concentración de esta hormona en la interfaz materno-fetal. Ello nos sugiere que el estradiol podría regular los cambios metabólicos ya reportados en conejas hipotiroideas gestantes.
3. Aunque no encontramos diferencias en la producción local de estradiol (aromatasa) entre implantes controles e hipotiroideos asociados al peso corporal de los fetos, los cambios observados mediante inmunohistoquímica sugieren que algunos tipos celulares del implante podrían variar en la síntesis estrogénica dependiendo del estatus tiroideo y del peso corporal fetal.
4. La expresión de GPER1 no es diferente en los implantes controles e hipotiroideos asociados al peso corporal de los fetos. Sin embargo, los cambios observados mediante inmunohistoquímica sugieren que algunos tipos celulares del implante podrían variar en la señalización de este receptor dependiendo del estatus tiroideo y del peso corporal fetal.
5. Las acciones del estradiol en la interfase materno-fetal en condición normal e hipotiroidea varían dependiendo del tipo celular, afectándose las células relacionadas con el metabolismo.

10. PERSPECTIVAS

- 1.- Analizar hormonas con función metabólica como insulina y glucagón, esperando que estén involucradas en el crecimiento fetal.
- 3.- Analizar si la posición del feto podría interferir con su tamaño.

11. REFERENCIAS

- Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., Musti, A. M., Andò, S., & Maggiolini, M. (2007). G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Research*, 67(4), 1859–1866.
- Anaya-Hernández, A., Rodríguez-Castelán, J., Nicolás, L., Martínez-Gómez, M., Jiménez-Estrada, I., Castelán, F., & Cuevas, E. (2015). Hypothyroidism affects differentially the cell size of epithelial cells among oviductal regions of rabbits. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(1): 104-111.
- Andersen, S. L., Olsen, J., & Laurberg, P. (2016). Hypothyroidism and pregnancy loss: comparison with hyperthyroidism and diabetes in a Danish population-based study. *Clinical Endocrinology*, 85(6), 962–970.
- Arbib, N., Hadar, E., Sneh-Arbib, O., Chen, R., Wiznitzer, A., Gabbay-Benziv, R. (2017). First trimester thyroid stimulating hormone as an independent risk factor for adverse pregnancy outcome. *Journal of Maternal, Fetal, and Neonatal Medicine*. 30(18):2174-2178.
- Bai, J., Qi, Q. R., Li, Y., Day, R., Makhoul, J., Magness, R. R., & Chen, D. B. (2020). Estrogen Receptors and Estrogen-Induced Uterine Vasodilation in Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4349.
- Bartels, H. C., Postle, J. D., Downey, P., & Brennan, D. J. (2018). Placenta Accreta Spectrum: A Review of Pathology, Molecular Biology, and Biomarkers. *Disease Markers*, 2018, 1507674.
- Baud, O. y Berkane, N. (2019). Cambios hormonales asociados con la restricción del crecimiento intrauterino: impacto en el cerebro en desarrollo y el neurodesarrollo futuro. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 179.
- Beyer C, Hoffman KL, González-Flores O. (2007). Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: similarities and differences with the rat. *Hormone & Behavior*. 52(1):2-11.

- Carlé, A., Pedersen, I. B., Knudsen, N., Perrild, H., Ovesen, L., & Laurberg, P. (2014). Hypothyroid symptoms and the likelihood of overt thyroid failure: a population-based case-control study. *European Journal of Endocrinology*, 171(5), 593-602.
- Cha, J., Sun, X., & Dey, S. K. (2012). Mechanisms of implantation: strategies for a successful pregnancy. *Nature Medicine*, 18(12), 1754–1767.
- Chaker, L., Bianco, A. C., Jonklaas, J., & Peeters, R. P. (2017). Hypothyroidism. *Lancet* (London, England), 390(10101), 1550–1562.
- Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K., & Ellinger, I. (2018). Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport, and Metabolism in the Human Placenta. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1027.
- Cheng, J.C., Fang, L., Li, Y., Thakur, A., Hoodless, P.A., Guo, Y., Wang, Z., Wu, Z., Yan, Y., Jia, Q., Gao, Y., Han, X., Yu Y, Sun YP. (2021). G protein-coupled estrogen receptor stimulates human trophoblast cell invasion via YAP-mediated ANGPTL4 expression. *Commun Biology*. Nov 12;4(1):1285.
- Chesnutt, A.N. (2004). Physiology of normal pregnancy. *Critical Care Clinics*, 20(4), 609–615.
- Choo, E., Dando, R. (2017). The Impact of Pregnancy on Taste Function. *Chemical Senses*. 1;42(4):279-286.
- Cindrova-Davies, T., Sferruzzi-Perri, A.N. (2022). Human placental development and function. *Semin Cell Dev Biol*. 131:66-77.
- Czajka-Oraniec, I., & Simpson, E.R. (2010). Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynologia Polska*, 61(1), 126–134.
- Einerson, B.D., Straubhar, A., Soisson, S., Szczotka, K., Dodson, M.K., Silver, R.M., & Soisson, A.P. (2019). Hyperglycosylated hCG and placenta accreta spectrum. *American Journal of Perinatology*, 36(01), 022-026.
- El-Sayed A. (2017). Preeclampsia: A review of the pathogenesis and possible management strategies based on its pathophysiological derangements. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 56(5), 593–598.

- Espíndola-Lozano, M., Zepeda-Pérez, D., Romano-Castillo, M., Méndez-Tepepa, M., Taxis-Taxis, J., Arroyo-Helguera, O.E. & Cuevas-Romero, E. Hypothyroidism increases the size of fetuses associated with an augment of glycogen and changes in the expression of GLUT4, LDH, and PPAR γ in the uterus of pregnant rabbits. En proceso de escritura.
- Feng, X., Zhou, L., Mao, X., Tong, C., Chen, X., Zhao, D., Baker, P. N., Xia, Y., & Zhang, H. (2017). Association of a reduction of G-protein coupled receptor 30 expression and the pathogenesis of preeclampsia. *Molecular Medicine Reports*, 16(5), 5997–6003.
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A., & Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction (Cambridge, England)*, 144(1), 1–10.
- Goh, W. A., & Zalud, I. (2015). Placenta accreta: diagnosis, management, and the molecular biology of the morbidly adherent placenta. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 29(11), 1795–1800.
- Guía de práctica clínica: Diagnóstico y tratamiento de hipotiroidismo primario y subclínico en el adulto (2016). Instituto Mexicano del Seguro Social. México.
- Gurugubelli Krishna, R., & Vishnu Bhat, B. (2018). Molecular mechanisms of intrauterine growth restriction. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 31(19), 2634–2640.
- Haddow, J. E., McClain, M. R., Lambert-Messerlian, G., Palomaki, G. E., Canick, J. A., Cleary-Goldman, J., Malone, F. D., Porter, T. F., Nyberg, D. A., Bernstein, P., D'Alton, M. E., & First and Second Trimester Evaluation of Risk for Fetal Aneuploidy Research Consortium (2008). Variability in thyroid-stimulating hormone suppression by human chorionic [corrected] gonadotropin during early pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(9), 3341–3347.
- He, W. H., Jin, M. M., Liu, A. P., Zhou, Y., Hu, X. L., Zhu, Y. M., & Liu, A. X. (2019). Estradiol promotes trophoblast viability and invasion by activating SGK1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117, 109092.

- Hou, Y., Wang, Q., Li, G., Sun, X., & Liu, C. (2013). Ultrasonic morphology of uterus and ovaries in girls with pituitary hyperplasia secondary to primary hypothyroidism. *Hormone and Metabolic Research*, 45(9), 669–674.
- Hu, H. T., Xu, J. J., Lin, J., Li, C., Wu, Y. T., Sheng, J. Z., Liu, X. M., & Huang, H. F. (2018a). Association between first cesarean delivery and adverse outcomes in subsequent pregnancy: a retrospective cohort study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 18(1), 273.
- Jauniaux, E., Collins, S., & Burton, G. J. (2018). Placenta accreta spectrum: pathophysiology and evidence-based anatomy for prenatal ultrasound imaging. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(1): 75-8.
- Jobe, S. O., Tyler, C. T., & Magness, R. R. (2013). Aberrant synthesis, metabolism, and plasma accumulation of circulating estrogens and estrogen metabolites in preeclampsia implications for vascular dysfunction. *Hypertension*: 61(2), 480–487.
- Kaur, R., & Gupta, K. (2016). Endocrine dysfunction and recurrent spontaneous abortion: An overview. *International Journal of Applied & Basic Medical Research*, 6(2), 79–83.
- Kohlhepp, L.M., Hollerich, G., Vo, L., Hofmann-Kiefer, K., Rehm, M., Louwen, F., Zacharowski, K., & Weber, C.F. (2018). Physiologische Veränderungen in der Schwangerschaft. *Der Anaesthesist*, 67(5), 383–396.
- Kolkova, Z., Noskova, V., Ehinger, A., Hansson, S., & Casslén, B. (2010). G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER, GPR 30) in normal human endometrium and early pregnancy decidua. *Molecular Human Reproduction*, 16(10), 743–751.
- Kowalczyk-Zieba, I., Staszkiwicz-Chodor, J., Boruszewska, D., Lukaszuk, K., Jaworska, J., Woclawek-Potocka, I. (2021). Hypothyroidism Affects Uterine Function via the Modulation of Prostaglandin Signaling. *Animals (Basel)*. 11(9):2636.
- Kumar, A., Banerjee, A., Singh, D., Thakur, G., Kasarpalkar, N., Gavali, S., Gadkar, S., Madan, T., Mahale, S. D., Balasinor, N. H., & Sachdeva, G. (2018). Estradiol: A Steroid with Multiple Facets. *Hormone and Metabolic Research*, 50(5), 359–374.
- Kumar, P. y Magon, N. (2012). Hormonas en el embarazo. *Revista Médica de Nigeria*, 53 (4), 179–183.

- Li, J., Chen, Z., Zhou, X., Shi, S., Qi, H., Baker, P. N., & Zhang, H. (2016). The imbalance between proliferation and apoptosis-related impaired GPR30 expression is involved in preeclampsia. *Cell and Tissue Research*, 366(2), 499–508.
- Lou, Y., Hu, M., Wang, Q., Yuan, M., Wang, N., Le, F., Li, L., Huang, S., Wang, L., Xu, X., & Jin, F. (2017). Estradiol Suppresses TLR4-triggered Apoptosis of Decidual Stromal Cells and Drives an Anti-inflammatory TH2 Shift by Activating SGK1. *International Journal of Biological Sciences*, 13(4), 434–448.
- Marco-Jiménez, F., & Vicente, J. S. (2018). Overweight in young males reduce fertility in a rabbit model. *PloS One*, 13(12), e0209378.
- Maiti, K., Paul, J.W., Read, M., Chan, E.C., Riley, S.C., Nahar, P., Smith, R. (2011). G-1-activated membrane estrogen receptors mediate increased contractility of the human myometrium. *Endocrinology*. 152(6):2448-55.
- Milanesi, A., Lee, J.W., Yang, A., Liu, Y.Y., Sedrakyan, S., Cheng, S.Y., Perin, L., Brent, G.A. (2017). Thyroid Hormone Receptor Alpha is Essential to Maintain the Satellite Cell Niche During Skeletal Muscle Injury and Sarcopenia of Aging. *Thyroid*. 27(10):1316-1322.
- Molina, L., Figueroa, C.D., Bhoola, K.D., Ehrenfeld, P. (2017). GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 21(8):755-766.
- Moog, N. K., Entringer, S., Heim, C., Wadhwa, P. D., Kathmann, N., & Buss, C. (2017). Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development. *Neuroscience*, 342, 68–100.
- Mucci, L.A., Lاجiou, P., Tamimi, R.M., Hsieh, C.C., Adami, H.O., & Trichopoulos, D. (2003). Pregnancy estriol, estradiol, progesterone, and prolactin about birth weight and other birth size variables (United States). *Cancer Causes & Control* 14(4), 311–318.
- Negro, R., & Stagnaro-Green, A. (2014). Diagnosis and management of subclinical hypothyroidism in pregnancy. *BMJ*, 349, g4929.

- Ortiga-Carvalho, T. M., Sidhaye, A. R., & Wondisford, F. E. (2014). Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nature reviews. Endocrinology*, 10(10), 582–591.
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3342.
- Prossnitz, E.R., & Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 7(12), 715–726.
- Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B., & Sklar, L.A. (2007). GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265-266, 138–142.
- Qi, X., Gong, B., Yu, J., Shen, L., Jin, W., Wu, Z., Wang, J., Wang, J., Li, Z. (2017). Decreased cord blood estradiol levels in related to mothers with gestational diabetes. *Medicine (Baltimore)*. 96(21):e6962.
- Rodríguez-Castelán, J., Méndez-Tepepa, M., Carrillo-Portillo, Y., Anaya-Hernández, A., Rodríguez-Antolín, J., Zambrano. E., Castelán, F., Cuevas-Romero, E. (2017). Hypothyroidism Reduces the Size of Ovarian Follicles and Promotes Hypertrophy of Periovarian Fat with Infiltration of Macrophages in Adult Rabbits. *Biomedical Research International*. 2017;2017:3795950.
- Rodríguez-Castelán, J., Zepeda-Pérez, D., Rojas-Juárez, R., Aceves, C., Castelán, F., Cuevas-Romero, E. (2022). Effects of hypothyroidism on the female pancreas involve the regulation of estrogen receptors. *Steroids*. 181:108996.
- Rodríguez-Castelán, J., Del Moral-Morales, A., Piña-Medina, A. G., Zepeda-Pérez, D., Castillo-Romano, M., Méndez-Tepepa, M., Espindola-Lozano, M., Camacho-Arroyo, I., & Cuevas-Romero, E. (2019a). Hypothyroidism induces uterine hyperplasia and inflammation related to sex hormone receptors expression in virgin rabbits. *Life Sciences*, 230, 111–120.
- Rodríguez-Castelán, J., Zepeda-Pérez, D., Méndez-Tepepa, M., Castillo-Romano, M., Espíndola-Lozano, M., Anaya-Hernández, A., Berbel, P., & Cuevas-Romero, E. (2019b). Hypothyroidism Alters the Uterine Lipid Levels in Pregnant Rabbits and

- Affects the Fetal Size. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 19(6), 818–825.
- Romero-Vargas, R. (2014). *Manual Manejo reproductivo en una granja de conejos*. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. 11.
- Saito, K., Kuwahara, A., Ishikawa, T., Morisaki, N., Miyado, M., Miyado, K., Fukami, M., Miyasaka, N., Ishihara, O., Irahara, M., & Saito, H. (2019). Endometrial preparation methods for frozen-thawed embryo transfer are associated with altered risks of hypertensive disorders of pregnancy, placenta accreta, and gestational diabetes mellitus. *Human Reproduction*, 34(8), 1567–1575.
- Saran, S., Gupta, B. S., Philip, R., Singh, K. S., Bende, S. A., Agroiya, P., & Agrawal, P. (2016). Effect of hypothyroidism on female reproductive hormones. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 20(1), 108–113.
- Shu, C., Han, S., Xu, P., Wang, Y., Cheng, T., Hu, C. (2021). Estrogen and Preeclampsia: Potential of Estrogens as Therapeutic Agents in Preeclampsia. *Drug Design, Development, and Therapy*. 15:2543-2550.
- Silva, J. F., & Serakides, R. (2016). Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. *Cell Adhesion & Migration*, 10(1-2), 88–110.
- Silver, R. M., Fox, K. A., Barton, J. R., Abuhamad, A. Z., Simhan, H., Huls, C. K., Wright, J. D. (2015). Center of excellence for placenta accreta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 212(5), 561-568.
- Sullivan, S.A. (2019). Hypothyroidism in pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 62(2), 308-319.
- Svensson, K., Just, AC, Fleisch, AF, Sanders, AP, Tamayo-Ortiz, M., Baccarelli, AA, Wright, RJ, Téllez-Rojo, MM, Wright, RO y Burris, HH (2019). Niveles de hormonas sexuales salivales prenatales y peso al nacer para la edad gestacional. *Revista de Perinatología*: 39 (7), 941–948.
- Tang, Z. R., Zhang, R., Lian, Z. X., Deng, S. L., & Yu, K. (2019). Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease. *Cells*, 8(10), 1123.

- Teng, W., Shan, Z., Patil-Sisodia, K., & Cooper, D.S. (2013). Hypothyroidism in pregnancy. *The lancet. Diabetes & Endocrinology*, 1(3), 228–237.
- Tong, C., Feng, X., Chen, J., Qi, X., Zhou, L., Shi, S., Kc, K., Stanley, J. L., Baker, P. N., & Zhang, H. (2016). G protein-coupled receptor 30 regulates trophoblast invasion and its deficiency is associated with preeclampsia. *Journal of Hypertension*, 34(4), 710–718.
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochemia Medica*, 24(3), 329–342.
- Watkins, A.J., Lucas, E.S., Marfy-Smith, S., Bates, N., Kimber, S.J., Fleming, T.P. (2015). Maternal nutrition modifies trophoblast giant cell phenotype and fetal growth in mice. *Reproduction*. 149(6):563-75.
- Weber, R., Bertoni, A. P., Bessestil, L. W., Brum, I. S., & Furlanetto, T. W. (2015). Decreased Expression of GPER1 Gene and Protein in Goiter. *International Journal of Endocrinology*. 2015:869431.
- Yang, Y., Ding, L. L., & Ji, X. Q. (2014). The relationship between age, number of abortions, and miscarriage outcomes in patients with threatened abortion. *J. Ningxia Med. Univ*, 36, 229-231.
- Yao, Y., Chang, X., Wang, D., Ma, H., Wang, H., Zhang, H., Li, C., & Wang, J. (2018). Roles of ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways in mitochondria-mediated apoptosis in testes of hypothyroid rats. *Toxicology Research*, 7(6), 1214–1224.
- Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., Wang, H., & Armant, D. R. (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(5), 939–980.