



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE FARMACIA**

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD  
DE DEIODINASAS POR D-GLUCOSA EN CÉLULAS  
ENDOTELIALES DE MICROVASCULATURA  
HUMANA (HMEC-1)**

**POR**

**DANIEL ANDRÉS NÚÑEZ CÓRDOVA**

**Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción  
para optar al grado de Magíster en Bioquímica clínica e Inmunología**

**Profesor guía: Dr. Enrique Guzmán Gutiérrez  
Departamento de Bioquímica clínica e Inmunología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción**

Agosto, 2023  
Concepción, Chile

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Concepción y Programa de Postgrado por el apoyo otorgado durante la etapa de formación.

Al Dr. Claudio Aguayo, director del Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología, con su gran confianza, empatía y constante apoyo.

Al Dr. Enrique Guzmán, jefe del Laboratorio de Patologías del embarazo, por su confianza y su continua labor de guiar cada uno de mis pasos en este proceso a pesar de las dificultades.

A mi familia y amigos, por ser siempre los motores que me impulsa cada día, por su cariño y amor incondicional, por estar en los buenos y malos momentos.

## INDICE GENERAL

Indice general	3
Indice de figuras	7
Indice de tablas	10
Abreviaturas	11
Resumen	12
1. Marco teorico	14
1.1 Glándula tiroides y hormonas tiroideas.	14
1.2 Acción biológica de las hormonas tiroideas.	17
1.2.1 Función de las hormonas tiroideas en el desarrollo embrionario.	18
1.2.2 Hormonas tiroideas en el embarazo.	19
1.2.3 Transporte y metabolismo de hormonas tiroideas en placenta humana	21
1.2.4 Transporte placentario de hormonas tiroideas	21
1.2.5 Deiodinasas	22
1.3 Endotelio placentario	28
1.3.1 Efecto de la hiperglicemia en el endotelio placentario	31
1.4 Hiperglicemia y activación de PKC.	34
1.5 Efecto de D-glucosa en la expresión de deiodinasas en placenta.	38
2. Hipótesis	45

3. Objetivos	46
3.1 Objetivo general	46
3.2 Objetivos específico	46
4. Materiales y métodos	47
4.1 Cultivo de línea celular HMEC-1	47
4.2 Efecto de d-glucosa sobre la proliferación celular de la línea HMEC-1	48
4.3 Efecto de d-glucosa sobre la expresión de DIO2 y DIO3.	49
4.4 Extracción de proteínas, cuantificación y western blot.	49
4.5 Extracción de ARN total y RT-qPCR	50
4.6 Generación de cDNA por RT-PCR.	51
4.7 PCR cuantitativo (qPCR).	52
4.8 Validación del ensayo.	53
4.9 Efecto farmacológico de calfoestina C y PMA sobre eNOS en HMEC-1.	54
4.10 Efecto de calfoestina C sobre la expresión de DIO2 y DIO3 en la línea celular HMEC-1.	55
4.11 Medición de la actividad enzimática de DIO 2 y DIO3.	56
4.12 Análisis estadístico.	57

5. Resultados	58
5.1 Características morfológicas de las células endoteliales de microvasculatura humana en cultivo y ensayos de viabilidad celular en condiciones de alta glucosa	58
5.2 Ensayo de viabilidad celular	59
5.3 Análisis de los niveles de expresión para DIO2 y DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) expuestas a alta glucosa mediante <i>western blot</i> .	61
5.4 Análisis de la expresión de mRNA para DIO2 y DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana expuestas a alta glucosa.	65
5.5 Comprobación del efecto farmacológico de calfofina C sobre los niveles de expresión de mRNA para eENOS mediante RT-qPCR en células HMEC-1.	68
5.6 Evaluación de la participación de PKC en el efecto de D-glucosa sobre los niveles de expresión de mRNA y proteínas para deiodinasas en células endoteliales de microvasculatura humana.	70
5.7 Análisis de la actividad enzimática de DIO2 y DIO3 en condición de alta glucosa en la línea celular HMEC-1.	74
6. Discusión	77
6.1 Sobre el uso de la línea celular HMEC-1 como modelo de estudio.	78
6.2 Efecto de alta glucosa sobre la viabilidad celular en la línea celular HMEC-1.	80

6.3 Alta glucosa altera los niveles de expresión de deiodinasa tipo 2 y 3 en células endoteliales de microvasculatura humana.	81
6.4 Sobre la participación de PKC en el efecto de D-glucosa sobre la expresión de mRNA de deiodinasas en células endoteliales de microvasculatura humana.	84
6.5 Alta glucosa es capaz de alterar la actividad enzimática 5-deiodinasa de DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana.	86
7. Conclusion	88
8. Referencias	90

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de hormonas tiroideas.	15
Figura 2. Órganos y tejidos en el que las hormonas tiroideas ejercen acciones biológicas.	18
Figura 3. Modelo estructural de deiodinasas.	23
Figura 4. Reacciones básicas de deiodinasas.	25
Figura 5. Tinción inmunohistoquímica de deiodinasa tipo 3 en placenta y cordón umbilical.	27
Figura 6. Modelo de transporte transplacentario de HT en el embarazo.	28
Figura 7. Características de las células endoteliales micro y macrovasculara placentaria humana.	30
Figura 8. Niveles de estrés oxidativo y contenido de nitrotirosina en cultivos celulares HUVEC obtenidas de cordón umbilical humano procedente de madres con diabetes gestacional (GD) y control (C).	34
Figura 9. Vía de activación de PKC en estado de hiperglicemia y efectos celulares asociados.	37

Figura 10. Efecto de la diabetes gestacional sobre los niveles de expresión de mRNA para deiodinasas en placenta humana.	38
Figura 11. Efecto de la diabetes gestacional sobre los niveles de expresión proteico para deiodinasas en placenta humana.	39
Figura 12. Efecto de la diabetes gestacional sobre la expresión de deiodinasa tipo 2 y 3 en tejido placentario humana.	41
Figura 13. Efecto de D-Glucosa en la expresión de mRNA de DIO2 y DIO3 en explantes placentarios humanos.	44
Figura 14. Células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) exhiben características morfológicas de endotelio.	58
Figura 15. Las células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) se mantienen viables tras ser expuestas a altas concentraciones de D-glucosa.	60
Figura 16. D-glucosa aumentó los niveles de expresión proteica de DIO2	62
Figura 17. D-glucosa induce la disminución de los niveles de expresión proteica para deiodinasa tipo 3.	63
Figura 18. Relación de expresión proteica DIO2/DIO3 expuesto a D-glucosa.	64
Figura 19. Curvas de amplificación y melting de los genes DIO2, DIO3 y 28s.	67



Figura 20. Altas concentraciones de D-glucosa modifica significativamente la expresión de mRNA para DIO2 y DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1). 68

Figura 21. Calfostina C (250 nM) provoca tras 24 horas de incubación efectos farmacológicos en células HMEC-1. 70

Figura 22. Calfostina C no induce cambios significativos a nivel de expresión relativa de ARNm y proteica en DIO2 y DIO3 en condiciones de alta glucosa en células endoteliales de microvasculatura humana. 73

Figura 23. Efecto de alta glucosa en la actividad 5'- y 5-deiodinasa en células endoteliales de microvasculatura humana. 75

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación en función y localización entre deiodinasas humanas.	25
Tabla 2. Partidores utilizados para amplificar mRNA de DIO2, DIO3 y 28S.	53
Tabla 3. Partidores utilizados para amplificar mRNA de eNOS y 28S.	55
Tabla 4. Parámetros cinéticos de la actividad 5'- y 5-deiodinasa.	76

## ABREVIATURAS

BSA	suero de albúmina bovina
DIO 1	deiodinasa tipo 1
DIO 2	deiodinasa tipo 2
DIO 3	deiodinasa tipo 3
DMG	diabetes mellitus gestacional
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
FT <sub>3</sub>	T <sub>3</sub> libre
FT <sub>4</sub>	T <sub>4</sub> libre
hCG	hormona gonadotrófica coriónica humana
HT	hormonas tiroideas
HMEC-1	células endotelial de microvasculatura humana
HUVEC	células endoteliales de vena umbilical humana
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis-Mente
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NO	óxido nítrico
NTG	tolerancia normal a la glucosa
PKC	proteína kinasa c
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
RT-qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
rT <sub>3</sub>	triyodotironina reversa
SFB	suero fetal bovino
T <sub>3</sub>	3,5,3'-triyodotironina
T <sub>4</sub>	3,5,3',5'-tetrayodotironina o tiroxina
THT	transportadores de hormonas tiroideas
TSH	hormona tiroestimulante
V <sub>max</sub>	velocidad máxima

## RESUMEN

Las hormonas tiroideas son esenciales para el desarrollo normal del ser humano, pero cobran especial relevancia en la etapa fetal ya que son fundamentales en el desarrollo del sistema nervioso central, por lo que el traspaso y regulación de estas hormonas resulta fundamental. Las hormonas tiroideas atraviesan al interior de las células a través de transportadores y son metabolizadas por un grupo de enzimas denominadas deiodinasas (DIO).

Estudios previos han comprobado que patologías como diabetes gestacional alteran la expresión de las deiodinasas en tejido placentario. Actualmente, se desconoce si altos niveles de D-glucosa provoca cambios en la expresión de DIO2 y DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana y la vía de señalización involucrada, por lo tanto, esta investigación se busca analizar el efecto de D-glucosa sobre la expresión de DIO2 y DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1). Para cumplir estos objetivos se realizaron cultivos de la línea celular HMEC-1 en medio MCDB-131 en presencia de D-glucosa a diferentes concentraciones (5, 10, 15, 20 y 25 mM) por 24 horas para simular condiciones fisiológicas y patológicas. Los cambios en la expresión proteica para DIO2 y DIO3 se analizaron mediante *western blot* (n=4), mientras que los cambios a nivel de mRNA se evaluaron mediante RT-qPCR (n=3). Para evaluar si PKC está involucrada en la vía de señalización de estos cambios de expresión, se cultivaron células HMEC-1 en presencia de calfostina C (250 nM) y en condiciones de D-glucosa 20 mM y mediante RT-qPCR y *western blot* (n=3) se analizaron cambios en el patrón de expresión de DIO2 y DIO3. Finalmente, la actividad enzimática fue

estimada cuantificando rT3 y T3 utilizando como sustrato T4. Todos los resultados obtenidos se expresaron como media  $\pm$  D.E., y se analizaron estadísticamente mediante test-*t*. Los valores de  $P < 0,05$  se consideraron significativos.

En esta investigación encontramos que altas concentraciones de D-glucosa aumentaron tanto los niveles de expresión relativa de mRNA como proteica para DIO2, mientras que para DIO3 se registró una disminución en los niveles de expresión. Por otra parte, se observó que una alta concentración de D- glucosa (25 mM) afecta la actividad 5-deiodinasa, disminuyendo su velocidad máxima, pero no su Km aparente. En tanto que, la actividad 5'-deiodinasa no se vio afectada. Finalmente dilucidamos que PKC no participa en la vía de señalización involucrada en los cambios de expresión de deiodinasas cuando células de microvasculatura endotelial humana son expuestas a condiciones de alta D-glucosa.

Estos hallazgos en la alteración en la expresión de deiodinasas en condiciones de alta D-glucosa en células HMEC-1 pueden ser de gran relevancia clínica en condiciones fisiológicas como también patológicas dado el importante papel regulador del endotelio como primera barrera de la circulación sanguínea.

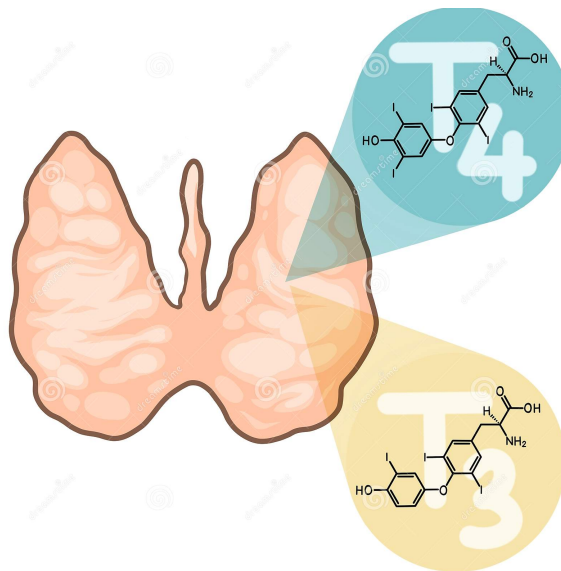
## 1. MARCO TEORICO

### 1.1 Glándula tiroides y hormonas tiroideas.

La glándula tiroides es un órgano neuroendocrino altamente vascularizado, teniendo un flujo sanguíneo muy alto en relación a su tamaño. La función principal de la tiroides consiste en biosintetizar, almacenar y secretar cantidades adecuadas de hormonas tiroideas (HT) para satisfacer las necesidades de los tejidos periféricos donde actúan.

Está situada en la región anterior del cuello, por debajo del cartílago cricoides. Tiene la forma de una mariposa y está constituido consta de 2 lóbulos adosados a los lados de la tráquea y laringe, que están unidos entre sí por el istmo. La tiroides está constituida por folículos que pueden ser considerados, tanto desde el punto de vista estructural como funcional, como las unidades primarias o secretoras de este órgano, ya que es ahí donde ocurre la síntesis hormonal y en el lumen es su depósito. Las paredes de los folículos están revestidas por células epiteliales cilíndricas. Dentro del folículo y contenido en el lumen se encuentra el coloide, el cual está compuesta por una mezcla de proteínas, principalmente de tiroglobulina (una glicoproteína de alto peso molecular), y otras iodoproteínas de menor peso molecular y proteínas séricas, entre ellas la albúmina (Livolsi, 2001). La tiroglobulina es molécula precursora de las hormonas tiroideas. Es sobre residuos de tirosina de la tiroglobulina que se llevan a cabo una serie de reacciones bioquímicas (procesos regulados por el eje hipotálamo-hipófisis y por la propia autorregulación tiroidea) que finalmente originan a las hormonas tiroideas.

Existen dos formas principales de hormonas tiroideas de importante relevancia a nivel biológico en el ser humano, la 3,5,3',5'-tetrayodotironina (comúnmente conocida como tiroxina o  $T_4$ ) y la 3,5,3'-triyodotironina ( $T_3$ ) (figura 1). La actividad biológica y otras propiedades intrínsecas de estas moléculas depende del número como también de localización de los átomos de yodo dentro de su estructura.  $T_4$  es la principal hormona producida por la tiroides, tiene una vida media relativamente larga (~8 días), tiene una mínima actividad biológica y es la molécula precursora de  $T_3$ . Mientras que  $T_3$  es la principal forma de hormona tiroidea, posee una elevada actividad biológica, pero con una vida media mucho más corta (~12 horas) en comparación a  $T_4$ .



**Figura 1.** Estructura molecular de hormonas tiroideas, tiroxina ( $T_4$ ) y triyodotironina ( $T_3$ )

En circulación,  $T_4$  y  $T_3$ , se encuentran tanto de forma libres como unidas reversiblemente a proteínas transportadoras. Solo una muy pequeña fracción se encuentra en forma libre en el plasma. Las proteínas transportadoras (principalmente globulina transportadora de tiroxina y en menor proporción la

albúmina, prealbumina fijadora de tiroxina y transtiretina) permiten mantener una distribución uniforme de hormonas tiroideas en sangre, constituyendo además un depósito de reserva de hormonas tiroideas; Por otra parte, debido a que las membranas celulares no son significativamente permeable a fracción libre de hormonas tiroideas ( $T_4$  libre o  $FT_4$  y  $T_3$  libre o  $FT_3$ ), es que son necesarios transportadores para HT, como por ejemplo transportadores de monocarboxilatos (MCTs), los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) y el transportador de L-aminoácidos (LATs), permitiendo de esta forma acceder a la fracción libre al microambiente intracelular y ejercer su acción, modular el metabolismo celular.

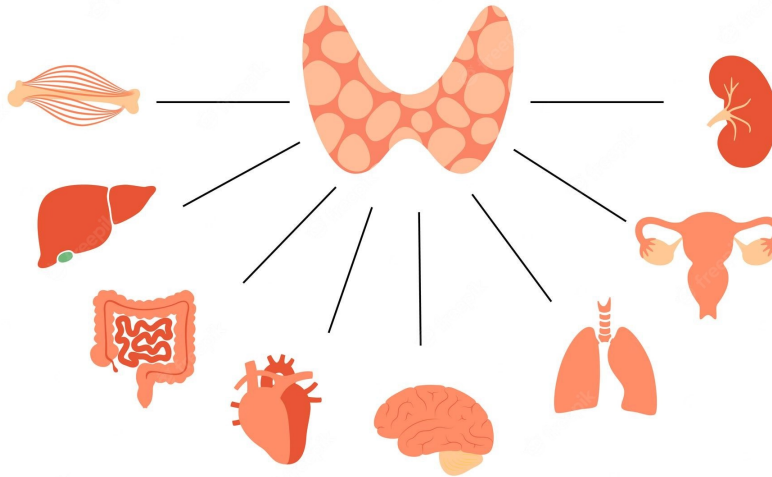
Para que  $T_3$ , principal forma biológicamente activa de hormona tiroidea, ejerza una acción fisiológica a nivel celular, debe unirse a receptores de hormonas tiroideas (RT) específicos, nucleares, ligados al ADN y que están presente en casi la totalidad de las células humanas.  $T_3$  presenta una afinidad de unión por los RT varias veces mayor que para  $T_4$ , lo que explica su función como una molécula activa y de gran relevancia fisiológica. La interacción receptor-ligando origina un cambio conformacional en el receptor provocando una disociación de complejos co-represores y el reclutamiento de complejos co-activadores, modulando de esta manera la expresión de genes que responden a dichos complejos. Además del clásico modo de acción nuclear de las hormonas tiroideas, un número de efectos rápidos en el citosol y en la membrana plasmática han sido identificados y referidos a ellos como de acción no genómica. Estas acciones de las hormonas tiroideas son mayoritariamente extracelulares, de efecto rápido y produciendo cambios electrofisiológicos a nivel celular. Hasta la fecha se ha descrito que este es un



mecanismo independiente al receptor nuclear de hormonas tiroideas, y que es mediado por la alta afinidad entre la integrina  $\alpha v \beta 3$  y las HT, induciendo cambios en los patrones de fosforilación de proteínas efectoras de distintas vías de señalización y la modulación de la disponibilidad de segundos mensajeros.

## **1.2 Acción biológica de las hormonas tiroideas.**

Las hormonas tiroideas modulan distintos procesos fisiológicos en todos los tejidos y sistemas, y esa misma diversidad dificulta la descripción de la totalidad de efectos conocidos de estas hormonas. Poseen funciones morfogénéticas e intervienen de forma decisiva en el crecimiento y diferenciación tisular, regulando numerosos procesos metabólicos tales como el consumo de oxígeno, la termogénesis, y la mineralización ósea. Igualmente, regulan procesos anabólicos como catabólicos de carbohidratos, lípidos y proteínas. Durante el desarrollo, están implicados en la maduración del sistema nervioso central, huesos e intestino. En el sujeto adulto contribuyen al mantenimiento de todos los tejidos, especialmente el hígado, sistema nervioso y corazón (figura 2).



**Figura 2.** Órganos y tejidos en el que las hormonas tiroideas ejercen acciones biológicas.

### **1.2.1 Función de las hormonas tiroideas en el desarrollo embrionario.**

Las hormonas tiroideas,  $T_4$  y  $T_3$ , juegan un papel esencial en el crecimiento y la homeostasis metabólica en humanos. En las últimas décadas, se han registrado los mayores avances en el conocimiento de las acciones de las hormonas tiroideas durante la vida fetal y neonatal en términos de diferenciación, desarrollo y maduración de tejidos tales como nervioso, óseo, pulmonar y cardiaco. (Williams *et al.*, 2005; Göbel *et al.*, 2020; Calvo *et al.*, 2002; Segura, 2014).

Entre todos los sistemas influenciados por la acción tiroidea, el sistema nervioso central (SNC) parece ser altamente sensible durante las primeras semanas del desarrollo embrionario, por lo tanto, las HT de la madre tienen una influencia considerable en el SNC y otros sistemas, ya que, en las primeras semanas de vida, el feto depende exclusivamente del aporte materno de hormonas tiroideas que recibe vía placentaria, obteniendo de esta forma cantidades suficiente de HT en la

etapa más crítica del desarrollo cerebral y psiconeurológico (semana 10-12 de la gestación). Luego, a partir de la semana 18-20, el feto empieza a sintetizar sus propias hormonas tiroideas, pero las hormonas tiroideas de origen materno aún siguen siendo imprescindibles hasta el final del embarazo (den Ouden *et al.*, 1996; Pérez-López, 2007). Cuando la disfunción tiroidea ocurre durante la vida fetal y/o perinatal, las alteraciones estructurales y funcionales del SNC pueden llegar a ser irreversibles (Segura, 2014). Entre las alteraciones estructurales y funcionales que ocurren el sistema nervioso debido a una disfunción tiroidea está el déficit en la proliferación y migración neuronal, retraso en la proliferación neuronal, deterioro en el desarrollo de dendritas y axones como también una disminución en la expresión de proteínas involucradas en la plasticidad sináptica y funciones cognitivas normales (Prezioso, *et al.*, 2018).

### **1.2.2 Hormonas tiroideas en el embarazo.**

Como ya se ha mencionado, el desarrollo de la tiroides en el feto humano comienza a partir de la semana 10-12 de gestación y se completa en el momento del nacimiento. La síntesis y secreción de hormonas tiroideas fetal se inicia a partir de la semana 18-20 de gestación (Pérez-López, 2007), por lo tanto, antes de ese periodo el feto depende de los niveles maternos de hormonas tiroideas, las cuales son capaces de alcanzar el trofoblasto y el embrión. Este hecho se sustenta en que se detectaron niveles de T<sub>4</sub> en fluido celómico humano durante la cuarta semana de gestación en fetos nacidos sin glándula tiroides o que sufrían disgenesia tiroidea (Contempré *et al.*, 1993).

Las mujeres embarazadas tienen niveles de TSH y FT<sub>4</sub> que son normales y comparables a los de las mujeres no embarazadas; sin embargo, en el primer trimestre del embarazo, hay un aumento en el nivel materno de FT<sub>4</sub> probablemente en respuesta a la hormona gonadotropina coriónica (hCG), esta hormona tiene una acción estimulante sobre la glándula tiroides aumentando la producción de hormonas tiroideas en mujeres embarazadas. La explicación de esta acción tiroestimulante es la homología entre hGC y TSH, ambas son glucoproteínas que comparten la misma subunidad  $\alpha$  y tienen una subunidad  $\beta$  con alta homología, además sus respectivos receptores presentan similitudes. Estos receptores de membrana acoplados a proteína G comparten un 45% de los dominios extracelulares donde existen los sitios de unión a las hormonas y un 70% de los dominios transmembranas. Esta acción estimulante de la hGC (y por lo tanto agonista de TSH) sobre la glándula tiroides puede ser vista como un mecanismo de protección que permite conservar el metabolismo tiroideo cuando las demandas hormonales aumentan y el feto aun es incapaz de producir T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub>. Se ha demostrado que un mayor nivel de hCG conduce a una reducción de la actividad del eje hipotálamo/hipófisis/tiroides, pero mejora la administración de hormonas tiroideas al feto en el primer trimestre del embarazo (Fantz *et al.*, 1999; Pérez-López, 2007; Chan *et al.*, 2009). En este período, la concentración de T<sub>4</sub> libre en la circulación fetal corresponde a un tercio del nivel encontrado en la circulación materna (Chan *et al.*, 2009). Este fenómeno es el resultado de una concentración reducida de la proteína de unión a TBG en la circulación fetal, lo que conduce a una concentración de T<sub>4</sub> libre suficiente para ejercer sus efectos biológicos en los tejidos embrionarios. En el segundo trimestre del embarazo, los niveles de T<sub>4</sub> libre en la

circulación fetal corresponden a aproximadamente la mitad de la concentración detectada en la circulación materna (Kilby *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2009). Por lo tanto, parece claro que los niveles de hormona tiroidea están regulados por el tejido de placentario (Burrow *et al.*, 1994). Por lo tanto, un papel de este órgano es crucial en la entrega de T<sub>4</sub> al feto. Esto es fundamental durante el primer y gran parte del segundo trimestre de gestación, ya que la tiroides fetal en desarrollo es incapaz de suministrar la cantidad de HT necesaria para el óptimo crecimiento del feto, así, el transporte de estas hormonas desde la circulación materna a la fetal a través de la placenta se convierte esencial.

### **1.2.3 Transporte y metabolismo de hormonas tiroideas en placenta humana**

La placenta humana es un órgano altamente especializado que intercambia activamente nutrientes y desechos entre las circulaciones materna y fetal. En este sentido la placenta es capaz de regular directamente la concentración de hormona tiroidea en la circulación fetal mediante la modulación de transportadores de hormonas tiroideas (THT) y el metabolismo de las hormonas tiroideas mediado por enzimas denominadas deiodinasas (Landers & Richard, 2017).

### **1.2.4 Transporte placentario de hormonas tiroideas**

Debido a la naturaleza lipofílica de las HT, históricamente se creía que estas hormonas podían atravesar pasivamente las membranas. Sin embargo, las HT están cargadas y no pueden cruzar una bicapa de fosfolípidos (Schweizer & Kohrle, 2013).

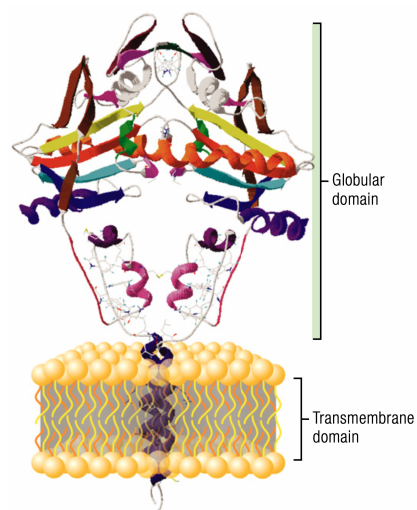
El transporte de HT a través de la membrana celular del trofoblasto se informó por primera vez en 1992 por Mitchell *et al.* y en las últimas décadas se han identificado varios transportadores de membrana en el tejido placentario capaces de transportar HT, tales como: los transportadores de L-aminoácidos (LAT), LAT1 (Ritchie & Taylor, 2001) y LAT2 (Park *et al.*, 2005); el sistema de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP), OATP1A2 (Patel *et al.*, 2003) y OATP4A1 (Sato *et al.*, 2003) y por último los transportadores de monocarboxilatos (MTC), MCT8 (Chan *et al.*, 2006) y MCT10 (Kim *et al.*, 2001). Los THT están ubicados en las membranas apical y basolateral de los citotrofoblastos, sincitiotrofoblasto y células endoteliales microvasculares (James *et al.*, 2007).

### 1.2.5 Deiodinasas

Solo las células foliculares de la glándula tiroides tienen la capacidad de producir T<sub>4</sub>, mientras que la mayoría de la T<sub>3</sub>, que es diez veces más activa que la T<sub>4</sub>, se produce por conversión de tiroxina en órganos como hígado, riñones, corazón, placenta, entre otros. En los tejidos de estos órganos, las hormonas tiroideas se metabolizan fundamentalmente por la extracción secuencial de átomos de yodo (monodesyodación) desde las hormonas tiroideas. Esta reacción es catalizada por un grupo de enzimas denominadas **deiodinasas**.

Se han identificado tres tipos diferentes de deiodinasas denominadas tipo 1 (DIO1), tipo 2 (DIO2) y tipo 3 (DIO3). Estas enzimas son proteínas integrales de membrana, posee una estructura de homodímero compuesto de un segmento transmembrana N-terminal conectado a un dominio globular más grande, este

dominio globular mira hacia el citosol y además alberga el centro catalítico (figura 3). A través de análisis de secuencia se ha revelado que las deiodinasas comparten similitud entre sí en su secuencia aminoacídica en al menos un 50%. Este grupo de enzimas poseen un peso molecular que bordea los 29 a 33 KDa dependiendo del tipo de deiodinasa (Bianco & Kim, 2006). Una característica particular de ellas es que contienen selenio dentro de su estructura, presente en forma selenocisteína, un raro aminoácido, que forma parte del centro catalítico de este tipo de enzima. La selenocisteína posee propiedades nucleofílicas que la hacen ideal para la catálisis de reacciones del tipo oxidorreductoras. El selenio es el receptor de yodo durante las reacciones de desyodización. Se ha demostrado que la mutagénesis de selenocisteína a cisteína en deiodinasa tipo 1, reduce su velocidad enzimática aproximadamente en 100 veces (Berry & Larsen, 1992).



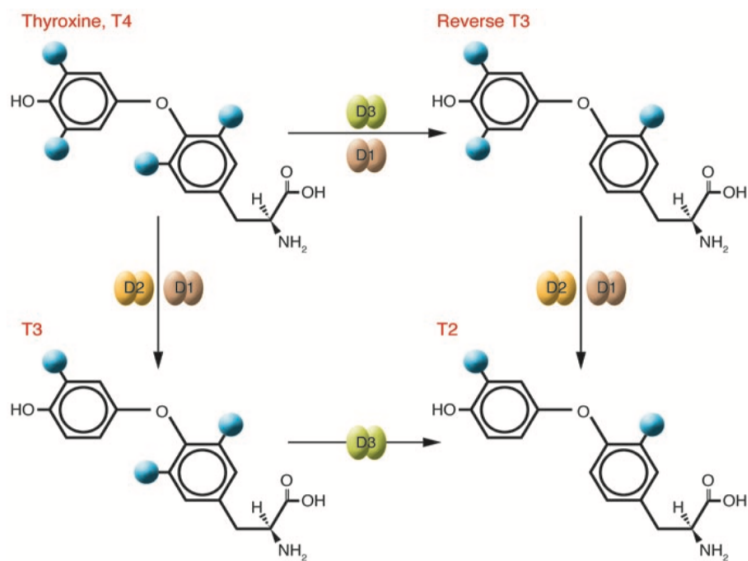
**Figura 3. Modelo estructural de deiodinasas.** La estructura de las tres deiodinasas son similares, son homodímeros integrales de membrana, compuesto por un segmento N-terminal transmembrana conectado a un dominio globular que contiene el aminoácido selenocisteína presente en el sitio activo.

La deiodinasa de tipo 1 (DIO1) cataliza la desyodación del anillo externo de  $T_4$  convirtiéndola en  $T_3$ , también puede catalizar la desyodación del anillo interno de  $T_4$  para producir  $T_3$  reversa ( $rT_3$ ), un compuesto de poca relevancia biológica; a la vez este tipo de deiodinasa también tiene la capacidad de catalizar la conversión de  $rT_3$  a 3,3'-diyodotironina ( $T_2$ , compuesto también de relevancia biológica).

Por otro lado, la deiodinasa tipo 2 (DIO2) cataliza la desyodación del anillo externo de la molécula de  $T_4$  a  $T_3$  y  $rT_3$  a  $T_2$ . DIO2 es de importancia crítica tanto para la generación local de  $T_3$  como para la homeostasis sistémica de la hormona tiroidea.

La deiodinasa de tipo 3 (DIO3) cataliza solo la desyodación del anillo interno de  $T_4$  a  $rT_3$  y la de  $T_3$  a  $T_2$ . (Figura 4). En resumen, DIO2 genera la forma activa de la hormona tiroidea,  $T_3$ , a través de la desyodación de  $T_4$ . Por el contrario, DIO3 inactiva  $T_3$  y, en menor medida, evita que  $T_4$  se active. Finalmente, DIO1 es una enzima cinéticamente ineficiente que activa o inactiva  $T_4$  sobre una base equismolar, y su papel en la salud aún no se ha aclarado (Bianco & Kim, 2006). En la tabla 1, se muestra un resumen de la función y localización de las deiodinasas.





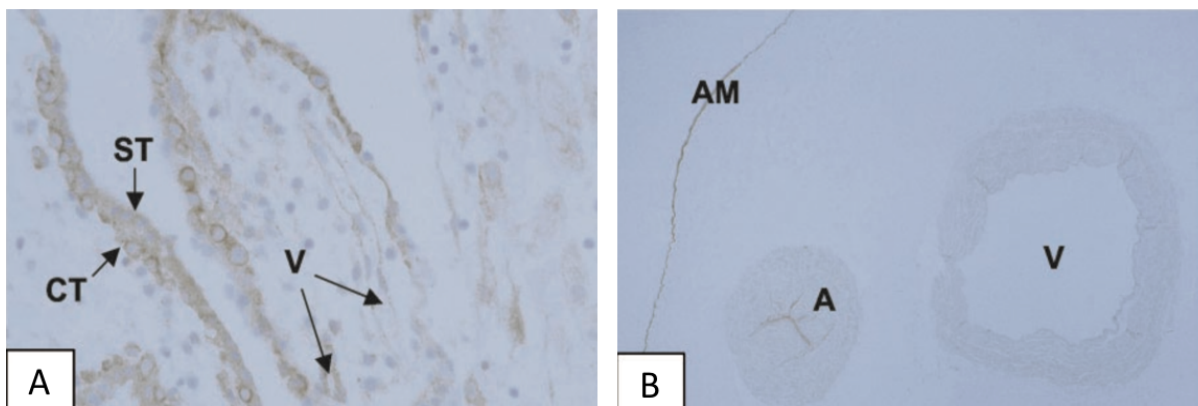
**Figura 4. Reacciones básicas de deiodinasas.** Las reacciones catalizadas por las deiodinasas eliminan restos de yodo (esferas azules) de los anillos fenólicos (anillos externos) o tirosil (anillos internos) de las yodotironinas. Estas vías pueden activar T<sub>4</sub> transformándolo en T<sub>3</sub> (a través de DIO1 o DIO2) o evitar que se active convirtiéndolo en la forma metabólicamente inactiva, rT<sub>3</sub> (a través de DIO1 o DIO3). T<sub>2</sub> es un producto inactivo común a ambas vías que se metaboliza rápidamente mediante una desyodación adicional. (Tomado de Bianco & Kim, 2006).

Parámetro	Tipo 1 (anillo externo e interno)	Tipo 2 (anillo externo)	Tipo 3 (anillo interno)
Función fisiológica	Degradación de rT <sub>3</sub> y T <sub>3</sub> S, origen de la T <sub>3</sub> plasmática especialmente en los pacientes con hipertiroidismo	Proporciona T <sub>3</sub> intracelular en tejidos específicos, origen de la T <sub>3</sub> plasmática	Inactiva la T <sub>3</sub> y la T <sub>4</sub>
Localización en los tejidos	Hígado, riñón, tiroides, hipófisis (?) (no SNC)	SNC, hipófisis, tejido adiposo pardo, placenta, tiroides, músculo esquelético, corazón	Placenta, SNC, hemangiomas, hígado fetal
Localización subcelular	Membrana plasmática	Retículo endoplasmático	Membrana plasmática
Respuesta al aumento de T <sub>4</sub>	↑	↓	↑

**Tabla 1.** Comparación en función y localización entre deiodinasas humanas.

De manera interesante, se ha reportado que en placenta humana sólo se expresan las deiodinasas del tipo 2 y 3 (Chan *et al.*, 2003). De esta manera en embarazos normales una vez que las HT (principalmente  $T_4L$ ) ingresan al trofoblasto, son captadas por THT del sincitiotrofoblasto, donde pueden ser metabolizadas por parte de DIO2 (ubicada en el retículo endoplasmático) o DIO3 (ubicada en la membrana plasmática con un sitio citoplasmático activo; Koopdonk-Kool *et al.*, 1996; Stulp *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2003) para convertirse en  $T_3$  o  $rT_3$  respectivamente. De igual forma puede ocurrir que las HT se liberen a través de THT en la membrana basolateral del sincitiotrofoblasto hacia el espacio intervelloso donde son captadas por las células endoteliales microvasculares a través de THT. En estas células endoteliales, una fracción de  $T_4$  se metaboliza para producir  $T_3$  y  $rT_3$  nuevamente a través de la acción de deiodinasas (Figura 5). Como resultado de este proceso,  $T_4$  y  $T_3$  se liberan en sangre fetal.

En el 2003, Hung *et al.*, proporcionaron la primera evidencia sobre la expresión de deiodinasas (DIO3) en células endoteliales de la unidad fetoplacentaria humana (arterias y venas umbilicales) mediante la técnica de inmunohistoquímica como se muestra en la figura 5.

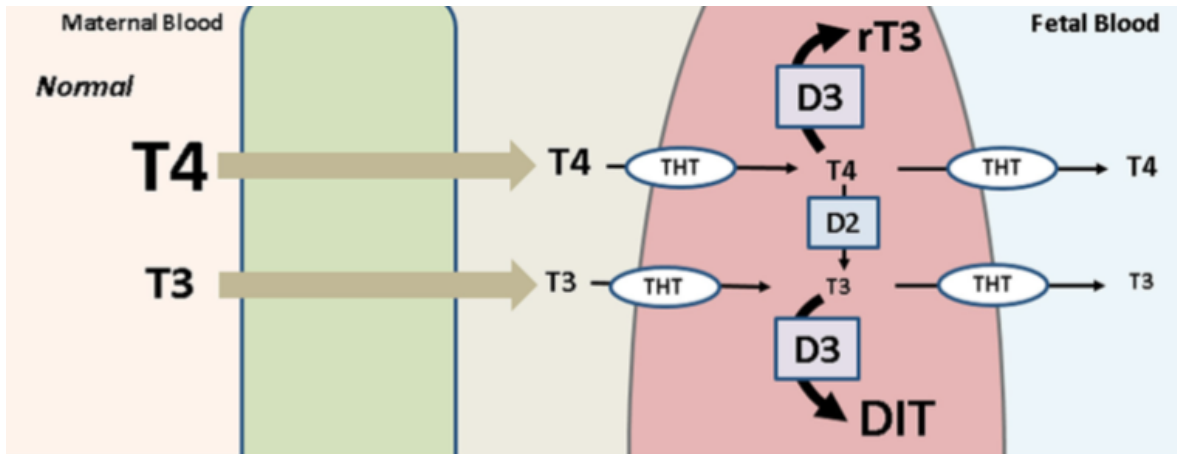


**Figura 5. Tinción inmunohistoquímica de deiodinasa tipo 3 (DIO3) en placenta (final de primer trimestre) y cordón umbilical (de término).** A) tinción intensa para DIO3 presente en sincitiotrofoblasto (ST), citotrofoblastos (CT) y células endoteliales de los microvasos fetales (V) en las vellosidades coriónicas. B) tinción de DIO3 en arterias (A) y vena (V) de cordón umbilical. Imagen tomada de Huang *et al.*, 2003

Se ha descrito que la actividad DIO3 en placenta humana es hasta 400 veces mayor que la de DIO2 (Koopdonk-Kool *et al.*, 1996). Por otro lado, utilizando placentas humanas perfundidas, se ha demostrado que, a menos que se inhiba la actividad DIO3, T<sub>4</sub> no es capaz de cruzar la placenta en cantidades significativas (Mortimer *et al.*, 1996). Por lo tanto, el equilibrio de la actividad de DIO2 y DIO3 juega un papel importante en el desarrollo fetal para garantizar que se mantengan niveles seguros de HT (Richard *et al.*, 1998) y por lo tanto son considerados como factores principales capaces de controlar el traspaso transplacentario de T<sub>4</sub> de la madre al feto (Mortimer *et al.*, 1996).

Actualmente no hay información documentada sobre el funcionamiento metabolismo de hormonas tiroideas a través de la placenta humana en embarazos

que se desarrollen en un entorno intrauterino hiperglucémico como en la diabetes mellitus tipo II o diabetes gestacional.



**Figura 6. Modelo de transporte transplacentario de hormonas tiroideas en el embarazo.** En células del sincitiotrofoblasto de embarazos normales (normal),  $T_3$  y  $T_4$  proveniente de sangre materna son transportados hacia sangre fetal por medio de transportadores de hormona tiroidea (THT) a través del endotelio microvascular (Endotelio).  $T_3$  y  $T_4$  son metabolizados por las deiodinasas tipo 2 (DIO2, formando  $T_3$ ) y tipo 3 (DIO3, formando  $rT_3$  y DIT), lo que conduce a la modulación del suministro de estas hormonas a la sangre fetal. Tomado y modificado de Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2014.

### 1.3 Endotelio placentario

La placenta humana es un órgano altamente vascularizado fundamental para el crecimiento y desarrollo fetal hasta el momento del parto. Tanto los pequeños como los grandes vasos sanguíneos que conforman la placenta están revestidos en su interior por tejido endotelial. Este tejido juega un papel importante en procesos

biológicos tales como en el desarrollo y remodelamiento vascular, mantención del tono vascular, fluidez sanguínea, coagulación, angiogénesis e intercambio de nutrientes entre la madre y el feto (Sobrevia *et al.*, 2011; Krüger-Genger *et al.* 2019). Estas funciones endoteliales se llevan a cabo gracias a la capacidad de sintetizar y liberar moléculas vasodilatadoras (óxido nítrico, prostaglandina I<sub>2</sub>, adenosina), como también moléculas de carácter vasoconstrictor (endotelina y angiotensina). (Ajne & Ahlborg *et al.*, 2005; Krüger-Genger *et al.* 2019).

Se ha demostrado que el endotelio placentario derivado de la microvasculatura (vasos sanguíneos de pequeño calibre, con un diámetro igual o inferior a 100  $\mu$ m) cumple ciertas características funcionales diferentes al endotelio derivado de la macrovasculatura (Sobrevia *et al.*, 2011; Rizzoni *et al.*, 2015). Por lo tanto, estos endotelios presentan diferencias con respecto a la capacidad de captar y/o metabolizar sustratos necesarios tanto para la modulación del tono vascular del lecho vascular placentario como también en la síntesis de óxido nítrico (NO), procesos de angiogénesis, entre otros. Con respecto a la capacidad de síntesis de óxido nítrico se conoce que las células endoteliales de la microcirculación placentaria humana (hPMEC) generan menor cantidad de NO en comparación a las células endoteliales (macrovasculares) de vena umbilical humana (HUVEC) (Dye *et al.* 2004). Estos cambios son debido a la expresión diferencial de ciertos genes implicados en la codificación de proteínas (transportadores, enzimas, receptores, factores de crecimiento) fundamentales para los procesos anteriormente mencionados. Pese a estas importantes diferencias, es también necesario resaltar que las células endoteliales tanto de la macrovasculatura como de la microvasculatura tienen algunas funciones en común que en caso necesario les

permitirán responder al unísono (Acurio, 2015). La figura 7 resume y compara algunas de las características reportadas para el endotelio macrovascular y microvascular placentario humano.

Characteristic	Macrovascular		Microvascular	
	Cell type	Finding	Cell type	Finding
PROKR1 expression <sup>a</sup>	HUVEC	+	HPEC	+
PROKR2 expression <sup>a</sup>	HUVEC	+	HPEC	+
EG-VEGF stimulated proliferation	HUVEC	-	HPEC	+
EG-VEGF stimulated migration	HUVEC	-	HPEC	+
EG-VEGF stimulated survival	HUVEC	+	HPEC	+
Homeobox genes expression				
<i>DIX3</i>	HUVEC	+	PLEC	+
<i>DIX4</i>	HUVEC	+	PLEC	+
<i>MSX2</i>	HUVEC	+	PLEC	+
<i>GAX</i>	HUVEC	+	PLEC	+
<i>HLX1</i>	HUVEC	+	PLEC	++++
<i>TLX1</i>	HUVEC	+	PLEC/HPEC	++++
<i>TLX2</i>	HUVEC	+	PLEC/HPEC	++++
<i>PHOX1</i>	HUVEC	+	PLEC/HPEC	++
<i>MEIS2</i>	HUVEC	++	PLEC/HPEC	+
<i>TGIF</i>	HUVEC	++	PLEC/HPEC	+
aLDL internalization	HUVEC	+	PLEC <sup>b</sup>	+
VEGF stimulated proliferation	HUVEC	+	PLEC <sup>b</sup>	+
FGF2-stimulated proliferation	HUVEC	+	PLEC <sup>b</sup>	+
PIGF1-stimulated proliferation	HUVEC	+	PLEC <sup>b</sup>	+++++++
PIGF2-stimulated proliferation	HUVEC	+	PLEC <sup>b</sup>	+++++++
PAL-Eexpression <sup>a</sup>	LPV	++	SPV	+
QBEND10 expression <sup>a</sup>	LPV	++	SPV	+
1F10 expression <sup>a</sup>	LPV	+	SPV	+
HM15/3 expression <sup>a</sup>	LPV	++	SPV	+
Transferrin receptor expression <sup>a</sup>	LPV	++	SPV	+
IgC receptor expression <sup>a</sup>	LPV	++	SPV	+

**Figura 7. Características de las células endoteliales micro y macrovasculara placentaria humana.** + denota presencia o función, - denota ausencia o no función. HUVEC, células endoteliales de la vena umbilical humana; HPEC, células endoteliales microvasculares placentarias humanas cultivadas; PLEC, células

endoteliales microvasculares placentarias no cultivadas (recién aisladas); PROKR1 y 2, receptor 1 y 2 del factor de crecimiento endotelial vascular derivado de la glándula endocrina; EG-VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular derivado de la glándula endocrina; PAL-E, marcador de células endoteliales; QBEND10, antígeno CD34 de células progenitoras hematopoyéticas; 1F10, marcador de células endoteliales diferenciadas; HM15/3, marcador de células endoteliales; LPV, grandes vasos placentarios; SPV, pequeños vasos placentarios; *DLX3*, *DLX4*, *MSX2*, *GAX*, *HLX1*, *TLX1*, *TLX2*, *PHOX1*, *MEIS2*, *TGIF* genes homeobox; NECA, 50-N-etil-carboxamidoadenosina; TNF, factor de necrosis tumoral; aLDL, lipoproteína de baja densidad acetilada; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; FGF2, factor de crecimiento de fibroblastos 2; PIGF1 y 2, factor de crecimiento placentario 1 y 2. (Tomado y modificado de Sobrevia *et al.*, 2011).

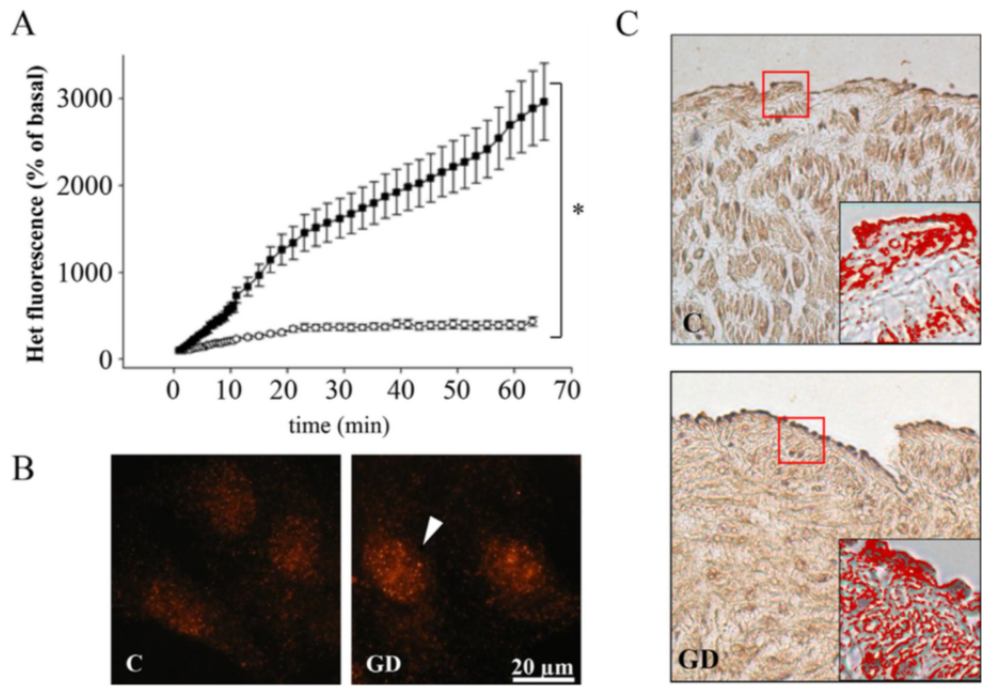
### **1.3.1 Efecto de la hiperglicemia en el endotelio placentario**

Muchas afecciones patológicas que ocurren durante el embarazo como la diabetes mellitus gestacional están íntimamente relacionadas con daño en el endotelio placentario tanto a nivel macrovascular como microvascular (Westermeier *et al.*, 2009, Leiva *et al.*, 2011, Aouache *et al.*, 2018). Estas patologías muestran respuestas diferenciales frente a ciertos moduladores locales (tales como óxido nítrico, adenosina, entre otros) debido a alteraciones en algunos mecanismos de señalización a nivel celular producto de un entorno intrauterino alterado, propio de la enfermedad (Sobrevia *et al.*, 2011). Este daño producido, pronto conlleva en un desequilibrio o pérdida de las funciones endoteliales esenciales, incluida la

modulación del tono vascular, angiogénesis y la capacidad de actuar como barrera física y metabólica. Cuando esta función celular se encuentra alterada o deteriorada hablamos de **disfunción endotelial**, que en el caso en particular de mujeres con diabetes mellitus gestacional se encuentra principalmente asociada a la circulación fetoplacentaria (Nguyen-Neo *et al.*, 2019). Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen de la disfunción endotelial fetoplacentaria inducida por DMG en gran parte aún son desconocidos, pero dado que esta patología se caracteriza por un estado de hiperglicemia, la alta concentración de glucosa es uno de varios factores que inducen la disfunción endotelial en la DMG (Cosentino *et al.*, 1997; Mordwinkin *et al.*, 2013; Nguyen-Ngo *et al.* 2019). Se ha demostrado que la hiperglucemia conduce a una mayor producción intracelular de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (tales como anión superóxido, radical hidroxilo, peroxinitrito) a través de varias fuentes enzimáticas, originando en un estado de desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los sistemas antioxidantes que tiene el organismo. Este desbalance conduce a un estado de estrés oxidativo (Sies., *et al* 2007; Aouache *et al.*, 2018). Los efectos del estrés oxidativo observado sumado a una respuesta inflamatoria crónica causada por la sobreexpresión de citoquinas pro-inflamatorias (producto de la enfermedad), inducen una serie de cambios fisiopatológicos que contribuyen al daño endotelial acelerado y a la disfunción. Uno de los cambios más importantes que se producen en la disfunción endotelial es la alteración local en aquellos mecanismos involucrados en la síntesis y biodisponibilidad de óxido nítrico endotelial alterándose de esta forma el control del tono vascular, siendo una de las manifestaciones más temprana de disfunción endotelial (Sobrevia *et al.*, 2009).



Varios estudios han observado que, bajo condiciones de hiperglicemia, el NO es capaz de reaccionar rápidamente con el anión superóxido para formar peroxinitrito, una molécula oxidante altamente potente capaz de difundir a través de las membranas fosfolipídicas, provocando la nitrosilación de proteínas y otras macromoléculas. Como se muestra en la figura 8, un estudio realizado por Di Fulvio *et al.*, 2014, revela que hay una mayor producción de anión superóxido en células HUVECs obtenidas de cordón umbilical de recién nacidos cuyas madres padecieron diabetes mellitus gestacional (HUVEC-GD) en comparación a HUVEC control. También se evidenció mediante inmunofluorescencia mayor tinción de nitrotirosina (marcador proteico de daño oxidativo provocado por peroxinitrito) en HUVEC-GD en comparación a HUVEC control. Este hecho nos indica que el óxido nítrico producido reacciona rápidamente con anión superóxido para producir peroxinitrito, que a su vez es capaz de reaccionar y modificar proteínas, mediante nitrosilación. En consecuencia, se produce daño celular además de una disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico en el endotelio. Por lo tanto, estos mecanismos moleculares junto a otros (aquí no mencionados) que ocurren en las células endoteliales de la vasculatura placentaria conducen finalmente a alteraciones en la homeostasis vascular provocando efectos adversos en el desarrollo y crecimiento fetal, así como también para la salud de la madre (Nguyen-Ngo *et al.*, 2019).



**Figura 8. Niveles de estrés oxidativo y contenido de nitrotirosina en cultivos celulares HUVEC obtenidas de cordón umbilical humano procedente de madres con diabetes gestacional (GD) y control (C).** **A**, comparación de niveles de producción de anión superóxido en el tiempo entre HUVECs-Control (círculos blancos) y HUVECs-GD (cuadrados negros). **B**, inmunofluorescencia de residuos de nitrotirosina (marcador de generación de peroxinitrito en tejidos y/o células y ocupado para medir daño oxidativo). **C**, localización inmunohistoquímica de nitrotirosina en secciones representativa de vena umbilical de cordón humano. Tomado de Di Fulvio *et al.*, 2014.

**1.4 Hiperglicemia y activación de PKC.**

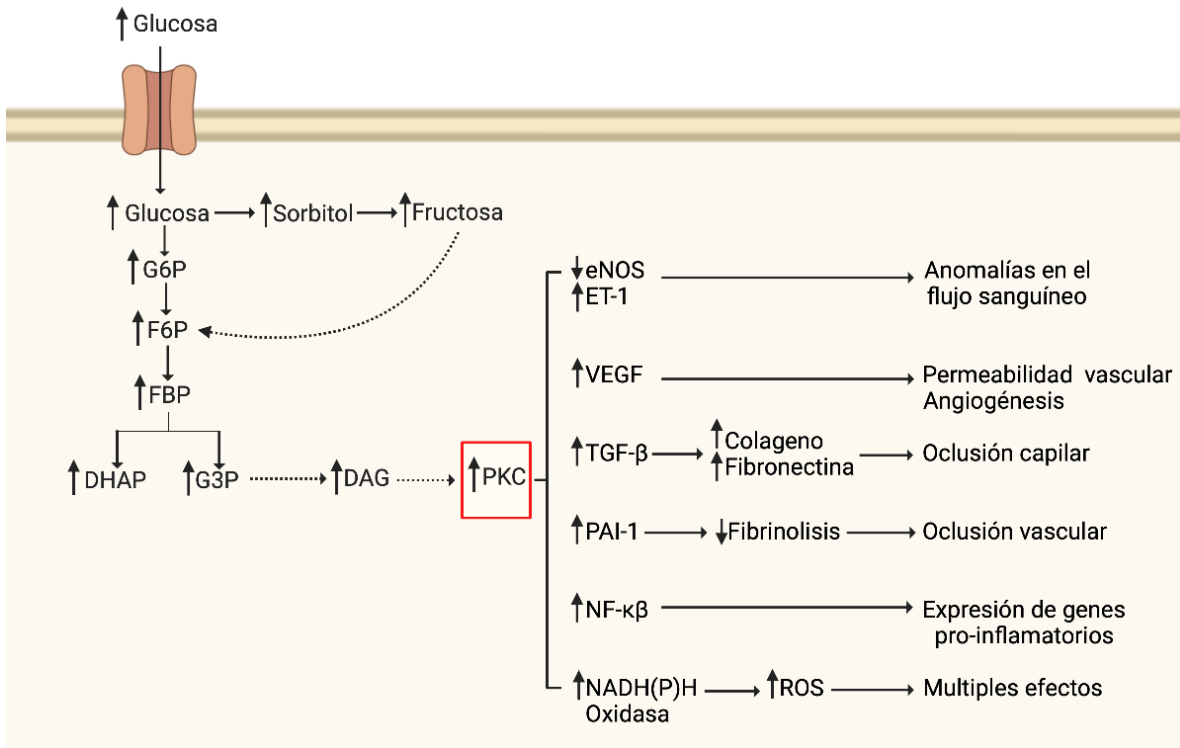
Se han propuesto varias vías bioquímicas para explicar los efectos adversos de la hiperglicemia. Los posibles mecanismos celulares de las complicaciones vasculares diabéticas inducidas por hiperglicemia son la activación de la vía

diacilglicerol (DAG)- proteína kinasa C (PKC), incremento en la activación de la vía polioliol, mayor producción de especies reactivas de oxígeno, de productos finales de glicación avanzada. La hiperglicemia induce cambios intra y extracelulares y estos efectos están mediados por alteración de las vías de transducción de señales que luego inducen efectos patológicos al alterar la expresión genética y la función de proteínas causando disfunción y daño celular.

En condiciones fisiológicas, la glucosa ingresa a las células gracias a transportadores específicos (GLUT). Una vez en el interior de las células, glucosa se convierte en glucosa-6-fosfato por acción enzimática de hexoquinasa. En presencia de un exceso de glucosa, hexoquinasa se satura, activándose la vía de los polioles. En esta vía, la enzima aldosa reductasa (AR), participa de modo conjunto con la glucosa para oxidar NADPH hasta NADP y producir sorbitol (Romero, 1998). Un estado de hiperglicemia hace posible una mayor activación de esta vía, y por tanto de síntesis de sorbitol. La activación de la vía de los polioles se acompaña de una sobreproducción de fructosa intracelular, que después de convertirse en fructosa-6-fosfato, entra en la vía glucolítica y, de esta manera, la vía de los polioles y la glicólisis se acoplan. Como resultado, el gliceraldehido-3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se incrementan y son utilizados por las enzimas glicerol-3-fosfato acetiltransferasa y la monoacilglicerol-3-fosfato acetiltransferasa para la síntesis *de novo* de diacilglicerol (DAG), como se representa en la Figura X. El diacilglicerol constituye un activador natural de la proteína kinasa C (PKC), el cual aumenta su expresión en diabetes mellitus (Hernández, *et al.*, 2011).

La proteína kinasa C es una familia de proteínas del tipo serina/treonina quininas relacionadas tanto funcional como estructuralmente. Tanto calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) como DAG pueden regular la actividad de PKC y dependiendo si la isoforma contiene dominios de unión para  $\text{Ca}^{+2}$  y DAG es como esta se clasifica (convencional, nueva o atípica).

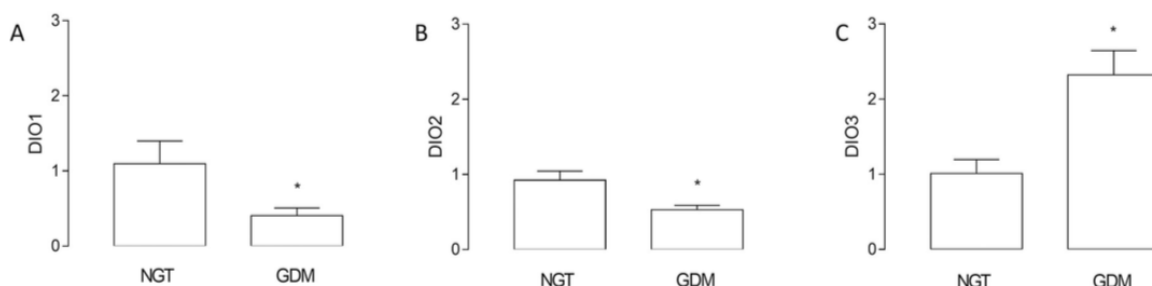
La activación de PKC tiene varios resultados patogénicos, al afectar la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), endotelina-1 (ET-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), y el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) todos los cuales juegan un papel en trastornos vasculares. También se ha asociado con la activación de NF- $\kappa$ B (que conecta con estrés oxidativo inducido por hiperglicemia con inflamación) y NAD(P)H oxidasa. De esta forma, la activación de PKC en condiciones de hiperglicemia se asocia con modificaciones vasculares, como aumento en la permeabilidad, contractilidad, síntesis de matriz extracelular, crecimiento celular y también apoptosis, angiogénesis, adhesión leucocitaria y activación e inhibición de citoquinas (figura 9). Estas perturbaciones en la homeostasis de las células vasculares causadas por las diferentes isoformas de PKC están vinculadas al desarrollo de patologías que afectan tanto a los grandes como pequeños vasos sanguíneos (Papachristoforou *et al*; 2020).



**Figura 9. Vía de activación de PKC en estado de hiperglicemia y efectos celulares asociados.** PKC (proteína kinasa C), G6P (glucosa 6 fosfato), F6P (fructosa 6 fosfato), FBP (fructosa 1,6, bifosfato), G3P (gliceraldehído 3 fosfato), DAG (diacilglicerol), DHAP (dihidroxiacetona fosfato), eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial), ET-1 (endotelina 1), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$ ), PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno 1), NF- $\kappa$ B (factor de nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) . Tomado y modificado de Díaz-Flores *et al.*, 2004.

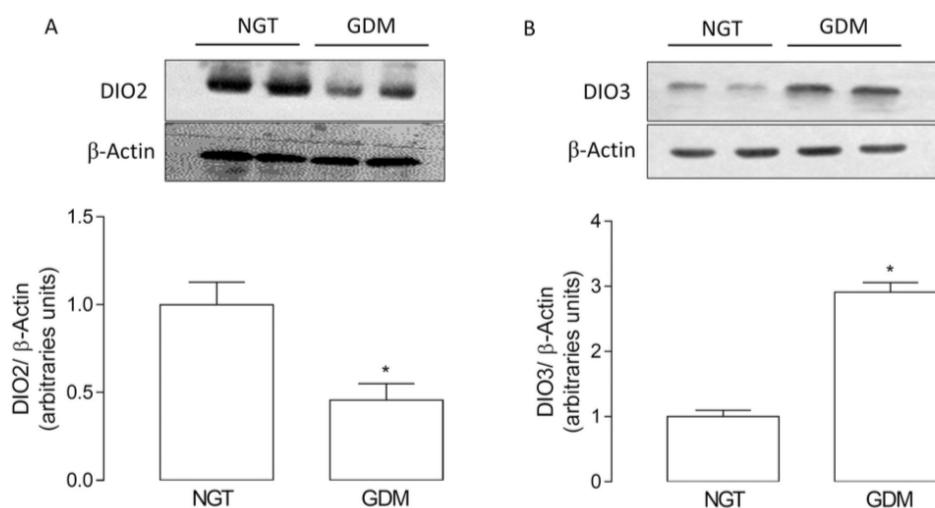
### 1.5 Efecto de D-glucosa en la expresión de deiodinasas en placenta.

A partir de resultados obtenidos por nuestro laboratorio (Gutiérrez-Vega; *et al.* 2020) se logró analizar tanto los niveles de expresión de mRNA como también proteicos de las enzimas deiodinasa tipo 1, 2 y 3 (figura 10). Se encontró una disminución (47% aprox.) en los niveles de mRNA para DIO2 y un incremento (2.3 veces) en los niveles de mRNA para DIO3 en homogenizados de placentas con diabetes mellitus gestacional (DMG) en comparación a placentas proveniente de embarazos con tolerancia normal a la glucosa (NTG). Para el caso de DIO1, se encontró que no había diferencias significativas en ambos grupos evaluados.



**Figura 10. Efecto de la diabetes gestacional sobre los niveles de expresión de mRNA para deiodinasas en placenta humana.** Niveles de expresión de mRNA para deiodinasas (DIO1, DIO2 y DIO3) fueron medidos usando RT-qPCR ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) en placentas procedentes de embarazos que cursaron diabetes mellitus gestacional (DMG) y embarazos con tolerancia normal a la glucosa (NTG). Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  error estándar. \*P < 0,05 en comparación al grupo NTG. N=20 por grupo.

Acorde a los resultados anteriores, se encontró que los niveles de expresión proteicos para deiodinasa tipo 2 estaban también reducidos (54% aprox.) y para deiodinasa tipo 3, los niveles proteicos estaban aumentado (2.9 veces) en placentas que cursaron con DMG (figura 11). Los niveles de expresión proteica para deiodinasa tipo 1 no pudieron determinar con la técnica utilizada. Acorde a lo que se ha reportado en literatura la enzima deiodinasa tipo 1 no se encuentra expresada en placenta, por lo tanto, se concluye que los niveles de expresión de la enzima deiodinasa 1 son muy bajos para ser determinados mediante *western blot*.

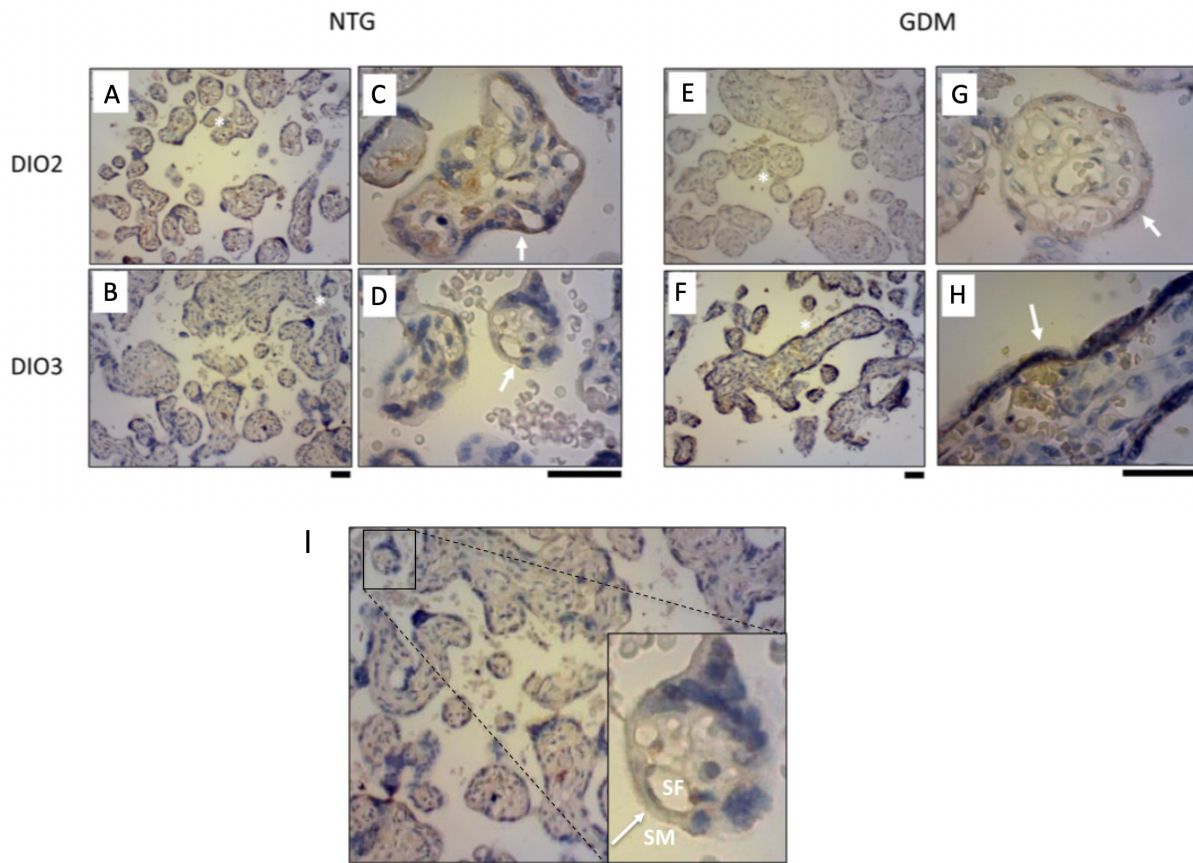


**Figura 11. Efecto de la diabetes gestacional sobre los niveles de expresión proteica para deiodinasas en placenta humana.** Niveles de expresión de proteica para deiodinasas tipo 2 y 3 fueron medidos mediante *western blot* en placentas procedentes de embarazos que cursaron diabetes mellitus gestacional (DMG) y embarazos con tolerancia normal a la glucosa (NTG). Se usó  $\beta$ -actina como control de carga. El resultado de los análisis densitométricos fueron expresados como

DIO/ $\beta$ -actina y los valores se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar. \*P < 0,05 en comparación al grupo NTG. N=8-9 por grupo.

También se logró inmunodetectar, mediante inmunohistoquímica, la localización de las proteínas deiodinasa tipo 2 y 3 en homogeneizados de placenta humana de embarazadas con tolerancia normal a la glucosa y con diabetes mellitus gestacional. Los datos determinaron que la expresión de las enzimas deiodinasa tipo 2 y 3 se encuentra principalmente en el sincitiotrofoblasto y endotelio microvascular como se muestra en la figura 12 (imagen I) . Por otra parte, la inmunoreactividad para deiodinasa tipo 2 fue menor en placentas provenientes de embarazos que cursaron DMG en comparación a placentas de mujeres embarazadas con tolerancia normal a la glucosa (figura 12). Mientras que deiodinasa tipo 3 tuvo una mayor inmunoreactividad en DMG con respecto al grupo control (NTG) figura 12. Cabe destacar que ningún cambio se encontró para deiodinasa tipo 1 tanto en tejido placentario proveniente de NTG y DMG (dato no mostrado en figura 12).





**Figura 12. Efecto de la diabetes gestacional sobre la expresión de deiodinasa tipo 2 y 3 en tejido placentario humano.** Mediante inmunohistoquímica se realizó la inmunodetección de deiodinasa tipo 2 y 3 en tejido placentario en condiciones de tolerancia normal a la glucosa (NTG, A-D) y diabetes mellitus gestacional (DMG, E-H). Las imágenes A, B, E y F tienen un aumento 400x, mientras que las imágenes C-D,G y H un aumento de 1000x. El asterisco blanco en A-B y E-F indican punto de aumento para las imágenes C-D y G-H respectivamente. Las flechas en blanco en C-D y G-H indican al sincitiotrofoblasto en el tejido placentario. Barra negra 50  $\mu$ m. N=5 por grupo. La imagen I corresponde a un aumento de la imagen D, donde se muestra la expresión de DIO 2 en microvasculatura placentaria. SF, sangre fetal; SM, sangre materna.

Como se ha mencionado anteriormente, otros autores han descrito la presencia de deiodinasas en tejido placentario. Chan *et al*; 2003, analizaron los niveles de expresión de mRNA para DIO2, los cuales se encuentran significativamente más altos en placentas normales durante las 20 primeras semanas del embarazo en comparación con placentas de término. También se evidenció que para DIO3 los niveles de expresión de mRNA incrementan a través de la gestación en comparación a muestras de placenta de término. Durante el primer trimestre de la gestación, el sincitiotrofoblasto muestra una fuerte inmunoreactividad para deiodinasa tipo 3, mientras que una débil inmunoreactividad para deiodinasa tipo 2, mientras que la inmunoreactividad es más alta para deiodinasa tipo 2 en comparación al tipo 3 durante el tercer trimestre del embarazo. Estos hallazgos sugieren que la alta expresión de deiodinasa tipo 3 puede regular los niveles de T3 que cruzan desde la circulación materna a la fetal.

Actualmente, algunos estudios han evidenciado cambios opuesto en algunas patologías. Se ha evidenciado un aumento en los niveles de expresión de mRNA para DIO2 y una disminución para DIO3 en hipocampo, amígdala y corteza prefrontal en ratones con epilepsia. Por otro lado, en tumores papilares de tiroides se ha demostrado que la expresión de deiodinasa tipo 2 disminuyó, mientras que para deiodinasa tipo 3 incrementó. Así mismo, se ha observado que en un modelo de privación/reperfusión de oxígeno-glucosa en línea celular de cardiomiocito humanos (AC16, HCM), se produce una disminución a nivel de expresión de mRNA y proteico para deiodinasa tipo 2, mientras que aumentan para deiodinasa tipo 3, estos resultados son similares a los encontrados en recién nacidos prematuros que cursan con hemorragia intraventricular, donde los investigadores sugieren un

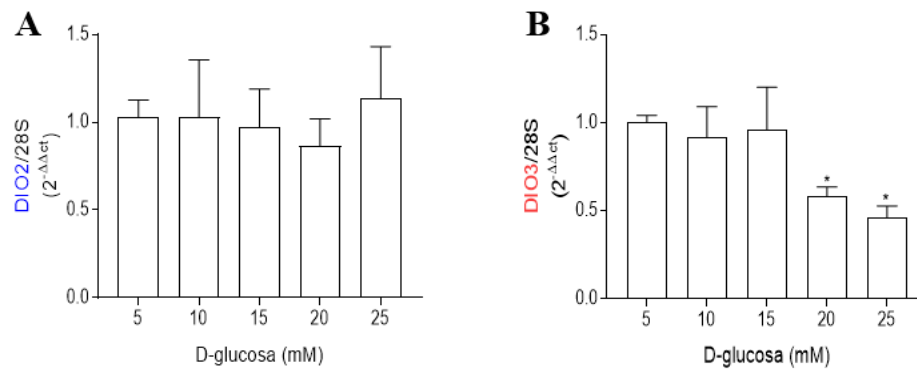
posible mecanismo de hipoxia-isquemia y estrés oxidativo. Estos hallazgos están asociados con estudios de isquemia cerebral en ratas (Margaill *et al*; 2005) y estrés oxidativo en cultivos de astrocitos en ratas (Lamirand *et al*; 2008). Todos estos cambios sugieren que estas enzimas posiblemente estén mediadas por un mecanismo competitivo dependiente de la hipoxia y el estrés oxidativo, que también son condiciones presentes en diabetes mellitus gestacional.

Si bien no se han observado cambios en inmunoreactividad para deiodinasas en otras patologías del embarazo como preeclampsia; esta es la primera evidencia que muestra una diferencia significativa en la inmunoreactividad entre placenta normal (NTG) y diabetes mellitus gestacional para deiodinasa tipo 2 y 3.

#### **1.5.1 Efecto de D-glucosa en la expresión de mRNA para DIO2 y DIO3 en explantes placentarios.**

Otro hallazgo interesante realizado por nuestro laboratorio en el año 2021 (investigación de tesis de magister) evidenciaron que no ocurren cambios significativos en la expresión mRNA para DIO2 cuando explantes placentarios son expuestos por 12 horas a diferentes concentraciones de D-glucosa, rango entre 5 a 25 mM, (ver figura 13.A). En cuanto a DIO3, se observó que la expresión de mRNA disminuyó significativamente (42% aprox.) después de 20 mM respecto a la condición control, D-glucosa 5 mM (Figura 13.B). Con los datos anteriores entonces se concluye que, la alta glucosa disminuye la expresión de mRNA para DIO3 en modelo de explante placentario humano, sin observar cambios para el mRNA de DIO2. Por lo tanto, alta glucosa es capaz de alterar la expresión de deiodinasas en tejido placentario. Estos cambios en la expresión de deiodinasas podrían constituir

una desregulación en los mecanismos por el cual la placenta humana tiene la intención de mantener y entregar niveles normales de hormonas tiroideas al feto.



**Figura 13. Efecto de D-Glucosa en la expresión de mRNA de DIO2 y DIO3 en explantes placentarios humanos.** Mediante RT-qPCR se determinó la expresión de mRNA tanto de DIO2, n=4 (**A**) como DIO3, n=4 (**B**) provenientes de cultivos de explantes placentarios a distintas concentraciones de D-glucosa por 12 horas. Valores expresados en media  $\pm$  desviación estándar con \* $p < 0.05$  respecto al resto de las condiciones.

## **2. HIPÓTESIS**

Un aumento en los niveles de D-glucosa disminuye la expresión y actividad enzimática de deiodinasa tipo 2 mientras que en deiodinasa tipo 3 aumenta, a través de un mecanismo dependiente de PKC en la línea celular de endotelio de microvasculatura humana HMEC-1

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Analizar el efecto de D-glucosa sobre la expresión y actividad enzimática de deiodinasa tipo 2 y 3 en células endoteliales de la microvasculatura humana (HMEC-1) y establecer si es un mecanismo regulatorio dependiente de PKC.

#### **3.2 Objetivos específico**

1.- Determinar la expresión de deiodinasa tipo 2 y 3 en células HMEC-1 a diferentes concentraciones de D-glucosa.

2.- Establecer si el efecto de D-glucosa sobre la expresión y actividad de deiodinasas tipo 2 y 3 implica la participación de PKC en células HMEC-1.

3.- Evaluar la actividad enzimática 5- y 5'-deiodinasa en células HMEC-1 a diferentes concentraciones de D-glucosa.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cultivo de línea celular HMEC-1

La línea celular HMEC-1, corresponde a una línea humana inmortalizada de células endoteliales microvasculares dérmicas. Las principales características de la línea celular es que poseen un fenotipo adherente y crecen en densidades más altas en comparación con las células endoteliales microvasculares normales (Ades *et al.*, 1992). Esta línea celular fue gentilmente donada por el Ph.D. Rodrigo Moore (Universidad de Talca, Chile).

La línea celular HMEC-1 fue cultivada y mantenida, hasta lograr un total de confluencia, en placas de 100 mm a 37°C, en atmosfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>, en medio de cultivo MCDB 131 (Sigma-Aldrich) suplementado con factor de crecimiento epidérmico (EGF; 10 ng/ml), hidrocortisona (1µg/ml) y 10% de suero bovino fetal (SBF, Hyclone) además de penicilina/estreptomina (100 U/mL). Las células endoteliales alcanzaron un 100% de confluencia, formando una sola capa de células en toda la superficie de cultivo (monocapa), entre 3 a 7 días.

Una vez logrado el 100% de confluencia, las células endoteliales de microvasculatura fueron despegadas de la matriz extracelular por acción enzimática. Para esto, los cultivos celulares fueron lavados 2 a 3 veces con PBS 1x (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM; pH 7,4) a 37°C y luego expuestos a solución de tripsina 1x, por un tiempo de 3 minutos a 37°C. Transcurrido este periodo de incubación, la acción de la tripsina fue detenida mediante la adición de medio de cultivo MCDB 131 (ie. conteniendo suero bovino fetal) y la suspensión celular fue cultivada en nuevas placas, expandiendo de esta

forma la línea celular. Una vez alcanzado el número de placa y confluencia necesaria para realizar los experimentos, las células fueron deprivadas de suero por 4 horas, reemplazando el medio por un medio MCDB 131 sin suero. Las células fueron identificadas como células endoteliales por sus características morfológicas al ser vistas al microscopio.

#### **4.2 Efecto de D-glucosa sobre la proliferación celular de la línea HMEC-1**

Para determinar el efecto de D-glucosa sobre la proliferación celular en la línea celular HMEC-1, las monocapas de células endoteliales fueron incubadas en las condiciones antes descritas. Se procedió a plaquear en placa de 24 pocillos (12.000 células/pocillo) y se mantuvieron en crecimiento por un periodo de 12 horas, para lograr su adhesión. Posterior a la deprivación de suero, los cultivos fueron desafiados a diferentes concentraciones de D-glucosa, 5 mM (control), 10 mM, 15 mM, 20 mM y 25 mM, por un periodo de 24 horas. Además, se utilizó como control positivo insulina (10 nM) y como control negativo DMSO al 30%. Transcurrido el tiempo de desafío, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1x y fijadas por 15 minutos con 200 uL de una solución de ácido acético (5% v/v) en metanol. Finalmente, los pocillos fueron lavados con solución *buffer* SSC (NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M, pH 7.0) y las células fueron incubadas con 300 uL de solución de yoduro de propidio (500 nM) por 5 minutos en oscuridad. A través microscopía de fluorescencia se obtuvieron imágenes de 10 campos por pocillo para cada condición y el recuento de células se realizó utilizando el software ImageJ, mediante análisis de las imágenes obtenidas.



### **4.3 Efecto de D-glucosa sobre la expresión de DIO2 y DIO3.**

Cultivos de la línea celular HMEC-1 fueron crecidos en condiciones anteriormente descritas. Las células fueron desafiados a diferentes concentraciones de D-glucosa, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM y 25 mM, por un periodo de 24 horas con el objetivo de determinar si aumentos en la concentración de D-glucosa es capaz de provocar cambios en la expresión de deiodinasas.

### **4.4 Extracción de proteínas, cuantificación y *Western Blot*.**

Cultivos HMEC-1 confluentes, cultivados en placas de 100 mm de diámetro, fueron lavadas (3 veces) con PBS 1x (4°C) y, posteriormente, lisadas con 100  $\mu$ L de *buffer* de lisis, pH 7,4 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, Tritón-x100 0,5% v/v, SDS 0,1% p/v, desoxicolato de sodio 0,5% p/v), cocktail de inhibidores de proteasas (1x). Los lisados fueron traspasados a tubos eppendorf rotulados y posteriormente centrifugados a 13000 x g por 10 minutos para finalmente ser almacenados a -20°C. La concentración de proteínas fue determinada mediante una curva de calibrado y utilizando el *kit* comercial DC Protein Assay (Bio-Rad), el cual corresponde a un ensayo colorimétrico basado en el método de Lowry. Como estándar de proteína, se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) (0,2-1,5 mg/mL). Las absorbancias de cada muestra fueron medidas en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch, Biotek) a una longitud de onda de 750 nm.

Los lisados proteicos (200  $\mu$ g) fueron denaturados con la adición de *buffer* de carga (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, SDS 1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,005%) y calentados a 95°C durante 5 minutos. Posterior a esto, los

lisados fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) (4 horas, 120 voltios) y transferidos a membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (toda la noche, 25 voltios). Las membranas fueron bloqueadas por 1 hora (en agitación) con una solución compuesta de leche descremada (5%) en *buffer* TBS/Tween, pH 7,6 (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0,05% Tween-20) para posteriormente ser incubadas con anticuerpos primarios (*anti* DIO2, 1:2000 (Invitrogen); *anti* DIO3, 1:2000 (Invitrogen); *anti*  $\alpha$ -tubulina, 1:4000 (SantaCruz)). Luego, las membranas fueron lavadas. (3 veces) con TBS-Tween 0,05% e incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con HRP dirigido contra la IgG de la especie utilizada para generar el anticuerpo primario, según corresponda. Las bandas de proteínas fueron detectadas mediante el *kit* comercial de quimioluminiscencia (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence, Thermo Scientific). Las membranas fueron escaneadas utilizando el equipo C-DiGit Blot Scanner (LI-COR, Biosciences) junto con el software Image Studio Lite (LI-COR Biosciences).

Luego de la transferencia, la membrana debe ser teñida con Rojo Ponceau (Ponceau S 0,5%, ácido acético glacial 1% v/v, peróxido de hidrógeno).

#### **4.5 Extracción de ARN total y RT-qPCR**

La extracción de ARN se realizó utilizando el método de TRIZOL (Invitrogen). Los cultivos HMEC-1, 100% confluentes fueron expuestos a TRIZOL (1 mL) y con ayuda de un rastrillo las células fueron desprendidas de las plazas de cultivo y almacenadas en tubos eppendorf rotulados y almacenadas a -80°C hasta su utilización. Los lisados celulares fueron mezclados con cloroformo (200  $\mu$ L) agitando

intensamente por 10 segundos, incubando por un tiempo de 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugado a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue separado y mezclado con alcohol isopropílico (500 uL), para luego ser centrifugado nuevamente a 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue lavado con alcohol etílico (75%) frío y nuevamente centrifugado a 1.700 g por 5 minutos. El precipitado fue secado cuidadosamente al aire y resuspendido en agua libre de DNAsa y RNAsa (20 uL). Finalmente, el ARN obtenido fue incubado a una temperatura entre los 55-60°C en termobloque. La concentración de ARN total presente en cada una de las muestras fue determinada por análisis espectrofotométrico (Epoch, microplate spectrophotometer; Biotek Instruments) y la pureza fue evaluada mediante la relación de densidad óptica 260 nm/ 280 nm. La integridad del ARN obtenido en cada una de las muestras (1 µg de ARN total) fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (90 minutos, 70 voltios). Finalmente, el ARN total fue rotulado y almacenado a -80°C hasta su uso (transcripción a cDNA).

#### **4.6 Generación de cDNA por RT-PCR.**

Para la generación de cDNA se usó el kit comercial (GoScript™ Reverse Transcriptase, Promega). El cDNA fue sintetizado a partir de la combinación de 1 ug de ARN, en una primera mezcla de reacción, que contenía partidores oligo(dT) (0,5 ug/reacción) y agua libre de nucleasas necesaria para completar un volumen final de 5 uL. La mezcla fue incubada 5 minutos a 70°C. Por otro lado, se preparó una segunda mezcla de reacción, la cual contenía *buffer* de reacción (5x), MgCl<sub>2</sub>

(1,5 mM), mezcla de dNTP (0,5 mM por cada dNTP), inhibidor de RNAsa (20 unidades), transcriptasa reversa (5 unidades, GoScript™, Promega) y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de reacción de 15 uL. Posteriormente, ambas mezclas de reacción se combinaron y se incubó por 5 minutos a 25°C, luego 42°C por 1 hora y finalmente a 70°C por 15 minutos. Los cDNA sintetizados fueron rotulados y almacenados a -80°C hasta su uso.

#### **4.7 PCR cuantitativo (qPCR).**

Los ensayos de PCR cuantitativo se llevaron a cabo en el termociclador AriaMx (Agilent Technologies, U.S), donde se utilizaron partidores específicos para 28S, DIO2 y DIO3 y eNOS (ver tabla 2). Cada tubo de reacción incluyó: 4 uL de 5X Fast Evagreen qPCR Master Mix (Biotium), 0,5 uL de partidor sentido (10 uM), 0,5 partir anti-sentido (10 uM), 2 uL de cDNA y 13 uL de agua libre de nucleasas, completando un volumen final de reacción de 20 uL. Las condiciones de amplificación usadas fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos (activación de la polimerasa), seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos (denaturación), 54°C para 28S y DIO3 y 57°C para DIO2 por 30 segundos (alineamiento), 72°C por 45 segundos (extensión) y una etapa de extensión final a 72°C por 10 minutos. Finalmente se llevó a cabo un incremento de temperatura de 0,1°C desde los 50°C hasta 95°C, en la cual, se registraron las señales de fluorescencia para obtener curvas de disociación o *melting* de los productos amplificados. Se utilizó agua libre de nucleasas como control negativo de contaminación (*No Template Control*, NTC). La aplicación de la subunidad

ribosomal 28S fue utilizado como control interno (*housekeeping*) para normalizar los resultados. Los Cq y gráficos de curvas de disociación fueron obtenidos utilizando el software AriaMx (Agilent Technologies). Por último, se calculó la expresión de mRNA de interés mediante cuantificación relativa, por medio de la fórmula  $2^{-\Delta\Delta ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño de producto
Deiodinasa 2 (DIO2)	F: TCGATGCCTACAAACAGGTGA R: TTGCCACTGTTGTCACCTCC	94 pb
Deiodinasa 3 (DIO3)	F: TCGAGCGTCTCTATGTCATC R: TCATCATAGCGTTCCAACCA	109 pb
28S	F: TTGAAAATCCGGGGGAGAG R: ACATTGTTCCAACATGCCAG	100 pb

**Tabla 2.** Partidores utilizados para amplificar mRNA de DIO2, DIO3 y 28S.

#### 4.8 Validación del ensayo.

Se realizaron diluciones seriadas (1:10) del cDNA de las muestras. La curva estándar incluyó 5 puntos de dilución, cada uno por triplicado. Se representó gráficamente el valor de Cq obtenido frente al logaritmo en base 10 de la concentración de cDNA. Los puntos de la curva se ajustaron a una recta mediante regresión lineal. A partir de la pendiente de la curva estándar obtenida se determinó la eficiencia de las reacciones de amplificación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$

Así mismo el coeficiente de correlación  $R^2$  obtenido en la regresión lineal se utilizó para determinar la linealidad de los ensayos de qPCR.

#### **4.9 Efecto farmacológico de calfofostina C y PMA sobre eNOS en HMEC-1.**

Para demostrar que calfofostina C y PMA ejercen un efecto farmacológico, monocapas de células de la línea HMEC-1 fueron incubadas en condiciones descritas anteriormente y posteriormente fueron expuestas por 24 horas con un inhibidor de PKC, calfofostina C (250 nM); un activador de PKC, PMA (500 nM) y una mezcla de calfofostina C y PMA a las concentraciones descritas. Finalizado el tiempo de incubación se realizó extracción de ARN total, cuantificación, evaluación de integridad y pureza (metodologías descritas anteriormente). Se obtuvo el cDNA, mediante RT-PCR para luego llevar a cabo un qPCR. Se utilizaron partidores específicos para los genes 28S y eNOS (ver tabla 3). Las condiciones de amplificación usadas fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos (activación de la polimerasa), seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos (denaturación), 54°C para 28S y eNOS por 30 segundos (alineamiento), 72°C por 45 segundos (extensión) y una etapa de extensión final a 72°C por 10 minutos. Finalmente se llevó a cabo un incremento de temperatura de 0,1°C desde los 50°C hasta 95°C para obtener las curvas de disociación de los productos amplificados. Los Cq y gráficos de curvas de disociación fueron obtenidos utilizando el software

AriaMx (Agilent Technologies). Mediante cuantificación relativa se calculó la expresión de ARN, utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño de producto
28S	F: TTGAAAATCCGGGGGAGAG R: ACATTGTTCCAACATGCCAG	100 pb
eNOS	F: CCAGCTAGCCAAAGTCACCAT R: GTCTCGGAGCCATACAGGATT	354 pb

**Tabla 3.** Partidores utilizados para amplificar mRNA de eNOS y 28S.

#### **4.10 Efecto de calfofostina C sobre la expresión de DIO2 y DIO3 en la línea celular HMEC-1.**

Para determinar si la proteína kinasa C (PKC) es capaz de regular la expresión de deiodinasas (DIO2 y DIO3) en presencia y/o ausencia de alta glucosa, cultivos endoteliales de microvasculatura (HMEC-1) fueron crecidos según condiciones ya descritas. Luego, los cultivos fueron expuestos a una condición normal de glucosa (5 mM) y a una condición de alta glucosa (20 mM) en presencia y ausencia de calfofostina C (250 mM) por un tiempo de 24 h. Posteriormente se procedió a obtener y cuantificar las proteínas totales de los extractos celulares (según metodología descrita anteriormente), para luego finalmente analizar los cambios de expresión de deiodinasas tipo 2 y tipo 3 por Western blot (metodología previamente descrita).

#### 4.11 Medición de la actividad enzimática de deiodinasa 2 y 3.

300 ug de proteínas total provenientes de células de la línea HMEC-1 expuesta a condiciones de D-glucosa 5 mM (control) y 25 mM (alta glucosa) fueron expuestas en presencia de 1,4-ditiotreitol (DTT) a T<sub>4</sub> (MP Biomedicals, LLC, Solon, OH, EE. UU.) (0–500 nM) a una temperatura de 37 °C por un tiempo de 15 minutos. La reacción fue detenida usando etanol absoluto (4 °C). Luego, la muestra se centrifugó a 10.500 g (4 °C, 8 min). El sobrenadante fue utilizado para cuantificar los niveles de T<sub>3</sub> y rT<sub>3</sub>, mediante ensayos comerciales del tipo ELISA competitivo, Invitrogen.

Para la determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas DIO2 y DIO3, en primer lugar, la conversión de T<sub>4</sub> saturable a la velocidad inicial se ajustó a la curva (del tipo hipérbola asintótica) de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos de conversión de T<sub>4</sub>, como lo es, la velocidad máxima (V<sub>max</sub>) y la constante de Michaelis-Menten aparente (Km) fueron calculados según la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_o = \frac{V_{max} \cdot [T_4]}{K_m + [T_4]}$$

Donde V<sub>o</sub> representa la velocidad inicial y [T<sub>4</sub>] la concentración de T<sub>4</sub>. Para facilitar el cálculo de los parámetros cinéticos y obtenerlos con mayor precisión es que se linealizó matemáticamente la ecuación de Michaelis-Menten, utilizando la representación de Eadie-Hosftee:

$$v = V_{max} - K_m \frac{v}{[S]}$$



Cada ensayo se realizó por quintuplicado y la actividad de DIO2 se expresó en ng/mL/ $\mu$ g de proteína/min (actividad 5'-desyodasa) y DIO3 se expresó en pg/L/ $\mu$ g de proteína/min (actividad 5-desyodasa). Para comparar el efecto de alta glucosa sobre la actividad de la desyodasa, calculamos la eficiencia catalítica de la enzima utilizando la relación  $V_{max}/K_m$ .

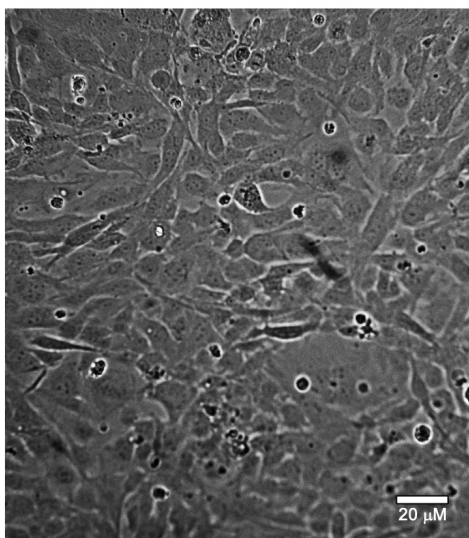
#### **4.12 Análisis Estadístico.**

La mayoría de los ensayos fueron realizados triplicado (N=3). Las variables cuantitativas fueron expresadas en promedio y desviación estándar. Para el análisis estadístico y comparación de los resultados obtenidos entre los grupos estudiados (normal y en condiciones de alta glucosa) se empleó en análisis no paramétrico de Kruskal y Wallis, y en aquellos casos en los cuales existían diferencias significativas, la prueba Mann Whitney. El nivel nominal de significancia estadística ( $P$ ) fue establecida en menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ). Todos los datos obtenidos fueron ingresados a una base electrónica en Microsoft Excel® y el posterior análisis fue realizado con el software GraphPad 9.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características morfológicas de las células endoteliales de microvasculatura humana en cultivo y ensayos de viabilidad celular en condiciones de alta glucosa.

Las células endoteliales fueron cultivadas hasta lograr una monocapa tal como se indicó en Materiales y Métodos. Las monocapas de células endoteliales muestran un fenotipo característico de células endoteliales, presentando una morfología celular alargada, hexagonal a veces irregular y una disposición en cultivo en forma de “empedrado” (Figura 14).

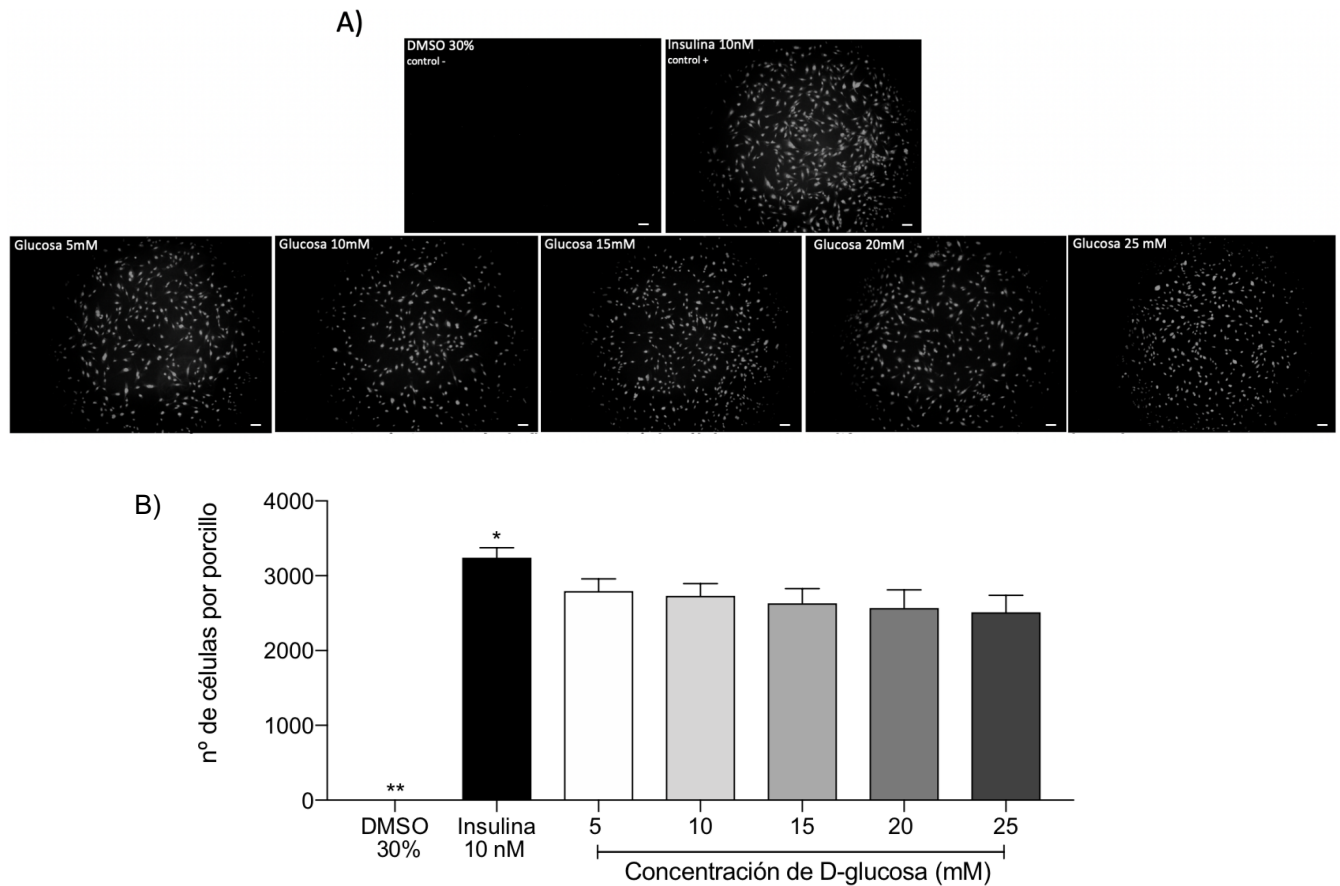


**Figura 14. Células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) exhiben características morfológicas de endotelio.** Fotografía al microscopio de luz (40x) de un cultivo confluyente de células endoteliales de microvasculatura humana cultivadas *in vitro* en medio MCDB 131. La barra corresponde a 20 μm.

## 5.2 Ensayo de viabilidad celular

Se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante incorporación de yoduro de propidio en células HMEC-1 expuestas en condiciones de baja y alta glucosa (5 - 25 mM) por un periodo de 24 horas (ver Materiales y Métodos) con la finalidad de evaluar posibles efectos glucotóxicos y que afecten la viabilidad celular en células endoteliales de microvasculatura humana al estar expuesta a un ambiente de alta glucosa.

A las diferentes condiciones de D-glucosa a las cuales fueron expuesta las células endoteliales de microvasculatura humana se observó que hubo una discreta disminución, pero no significativa, en el número promedio de células por pocillo a altas concentraciones de D-glucosa tras 24 horas de cultivo, (figura 15). Por lo tanto, altas concentraciones de D-glucosa no causan un efecto tóxico en células HMEC-1 que afecten significativamente su viabilidad tras ser expuestas tanto a baja como a altas concentraciones de D-glucosa por un periodo de 24 horas.



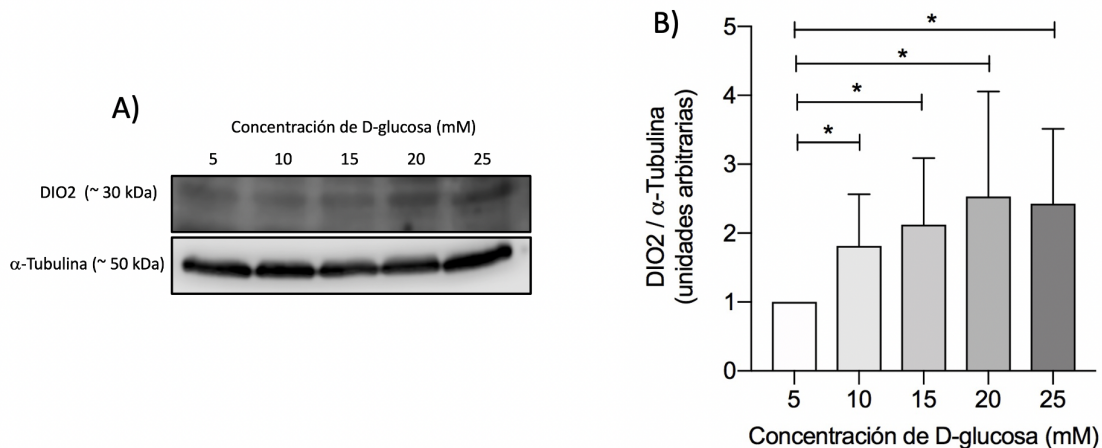
**Figura 15. Células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) se mantienen viables tras ser expuestas a altas concentraciones de D-glucosa.**

**A)** Imágenes representativas, obtenidas mediante microscopía de fluorescencia 10X, de células endoteliales de microvasculatura humana expuestas a condiciones de baja y alta glucosa por 24 horas. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (500 nM). Todas las imágenes tienen el mismo aumento. La barra representa 200  $\mu$ m. **B)** Representación gráfica del efecto de la concentración de D-glucosa sobre la viabilidad celular en células endoteliales de microvasculatura humana. \*Insulina 10 nM (control positivo) estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) con el resto de las condiciones. \*\* DMSO 30% (control negativo) estadísticamente

significativo ( $p < 0,05$ ) con el resto de las condiciones. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  desviación estándar. N=3.

### **5.3 Análisis de los niveles de expresión para DIO2 y DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1) expuestas a alta glucosa mediante *western blot*.**

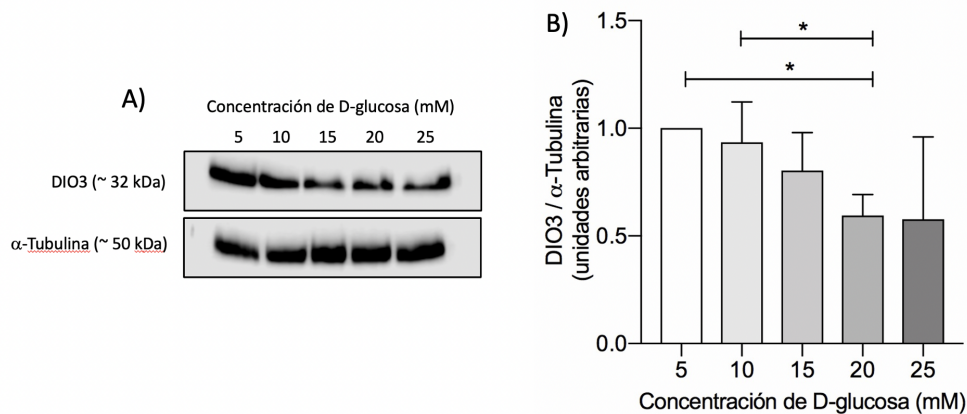
El efecto de D-glucosa sobre los niveles de expresión proteica de las enzimas DIO2 y DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana se determinó mediante *western blot*. Los resultados obtenidos evidenciaron aumentos en los niveles de expresión proteica para DIO2 en células HMEC-1 a medida que se aumentó la concentración de D-glucosa (hasta 20 mM) a la que fueron expuesta en comparación a células HMEC-1 cultivadas en condición 5 mM de D-glucosa (control), ver figura 16. Por otra parte, en cultivos expuestos a 25 mM de D-glucosa no se observaron cambios significativos en el nivel de expresión proteica para deiodinasa tipo 2 con respecto a los cultivos HMEC-1 expuestos a 20 mM de D-glucosa.



**Figura 16. D-glucosa aumentó los niveles de expresión proteica para deiodinasa tipo 2.** Análisis de la expresión de DIO2 mediante *western blot* en células HMEC-1 cultivadas a diferentes concentraciones de D-glucosa. **A)** Resultado representativo de un *western blot*, donde se utilizó como control de carga  $\alpha$ -tubulina. **B)** Representación gráfica de los niveles de expresión para deiodinasa tipo 2 en células HMEC-1, cuando son desafiadas a diferentes concentraciones de D-glucosa por 24 horas. Los valores fueron normalizados mediante el control de carga  $\alpha$ -tubulina y expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$ , N=4.

Situación distinta se observa cuando se analizaron los niveles de expresión proteica para DIO3 en las mismas condiciones de D-glucosa utilizada para DIO2 (figura 17). Los resultados obtenidos nos muestran que existe una disminución significativa en la expresión de deiodinasa tipo 3 a medida que aumenta la concentración de D-glucosa a la que fueron expuestas las células endoteliales de

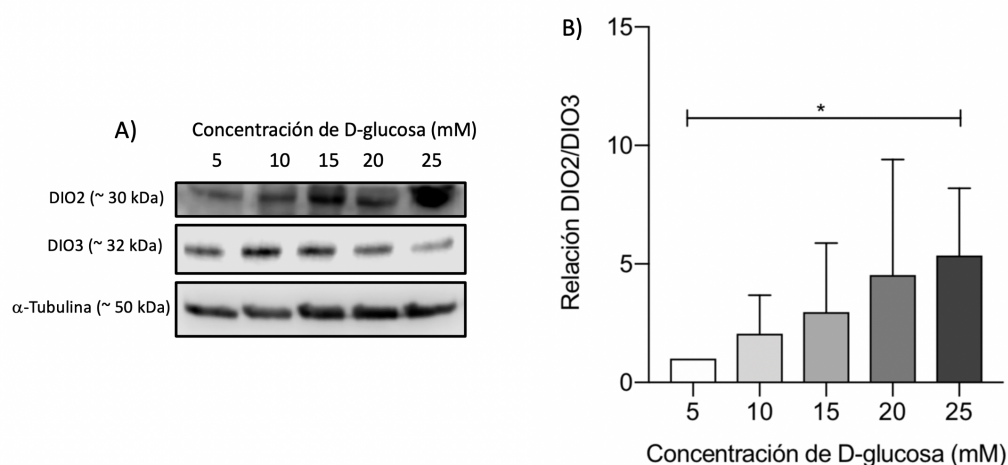
microvasculatura humana en comparación a aquellas que fueron cultivadas en condición 5 mM de glucosa (control). De igual forma como sucedió para DIO2, células HMEC-1 desafiada con D-glucosa a una concentración 25 mM, no se evidencian cambios en el nivel de expresión proteico para DIO3 cuando se compara con la condición 20 mM.



**Figura 17. D-glucosa induce la disminución de los niveles de expresión proteica para deiodinasa tipo 3.** Análisis de la expresión de DIO3 mediante *western blot* en células HMEC-1 cultivadas a diferentes concentraciones de D-glucosa. **A)** Panel izquierdo muestra un *western blot* representativo (N=4), se utilizó como control de carga  $\alpha$ -tubulina. **B)** Panel derecho corresponde a la representación gráfica de los niveles de expresión para deiodinasa tipo 3 en células HMEC-1, cuando son desafiadas a diferentes concentraciones de D-glucosa por 24 horas. Los valores fueron normalizados mediante el control de carga  $\alpha$ -tubulina y expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. \*p < 0,05, N=4.

Finalmente, cuando se analizó la relación del nivel expresión proteica entre DIO2 y DIO3 en células HMEC-1, desafiadas con alta glucosa (figura 18), encontramos que la proporción de expresión proteica de DIO2 es mayor con respecto a la expresión proteica de DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana y esta proporción se ve incrementada a medida que las células HMEC-1 son expuestas a concentraciones mayores de D-glucosa.

A la luz de los resultados obtenidos, se evidencia que los niveles de expresión proteica para deiodinasas tipo 2 y tipo 3 en células endoteliales de microvasculatura humana se ven alterados significativamente cuando son desafiadas en condiciones de alta glucosa.



**Figura 18. Relación del nivel de expresión proteica DIO2/DIO3 expuesto a D-glucosa.** Análisis de la relación del nivel de expresión entre DIO2 y DIO3 en células HMEC-1 cultivadas a diferentes concentraciones de D-glucosa. **A)** *western blot* representativo de un ensayo. **B)** Representación gráfica de la relación del nivel de expresión proteica DIO2/DIO3 en células HMEC-1, cuando son desafiadas a diferentes concentraciones de D-glucosa por 24 horas. Los valores fueron



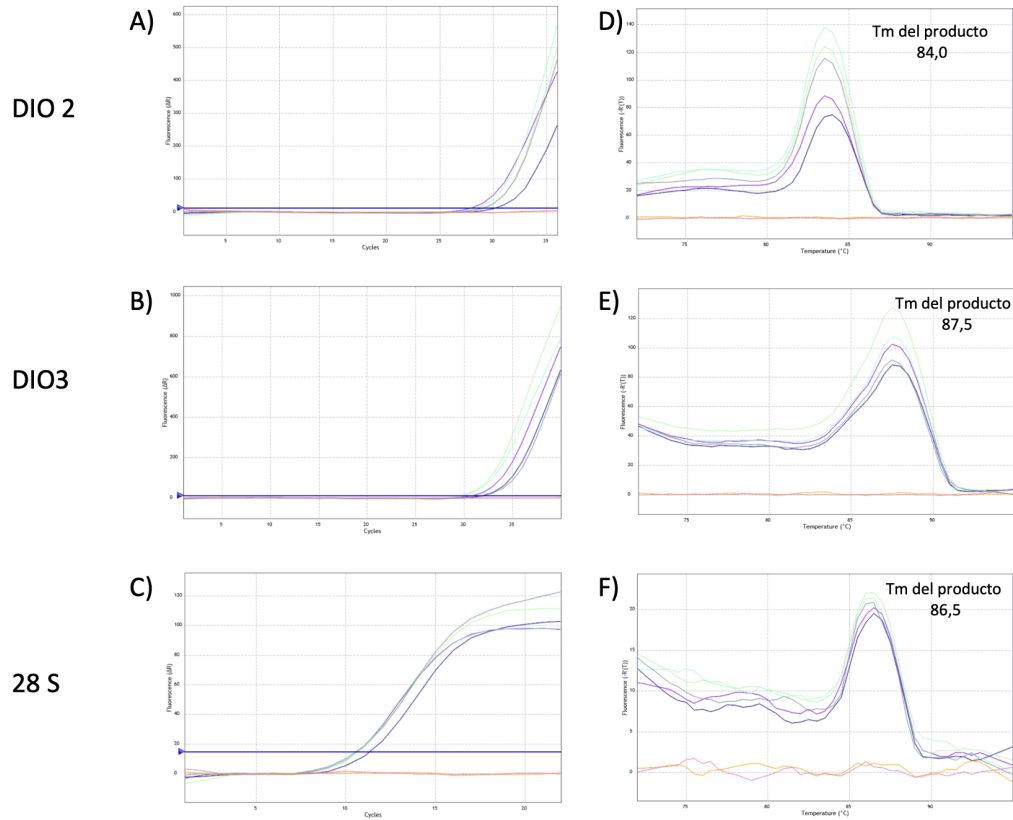
normalizados mediante el control de carga  $\alpha$ -tubulina y expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$ , N=4.

#### **5.4 Análisis de la expresión de mRNA para DIO2 y DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana expuestas a alta glucosa.**

Mediante ensayos de PCR cuantitativo en tiempo real se determinó los valores de Cq de los productos amplificados a través de gráficos de curvas de amplificación en escala exponencial de los genes de interés de este estudio (DIO2 y DIO3). También se evaluó la especificidad de los productos PCR a través de un análisis de curvas de melting (ver figura 19). Tanto para DIO2 y DIO3 además del gen control 28S, se observó un solo peak de amplificación. El valor de la temperatura de melting promedio para DIO2 fue de 84,0°C, para DIO3 87,5 y 28s 86,5°C. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en las temperaturas de disociación o melting de los productos amplificados para los genes analizados en condiciones de alta glucosa a la que fueron sometidas células endoteliales de microvasculatura humana. A raíz de estos datos, se concluyó que el producto amplificado tanto para DIO2, DIO3 como también para 28S por RT-qPCR en células HMEC-1 fue el mismo en cada una de las condiciones descritas.

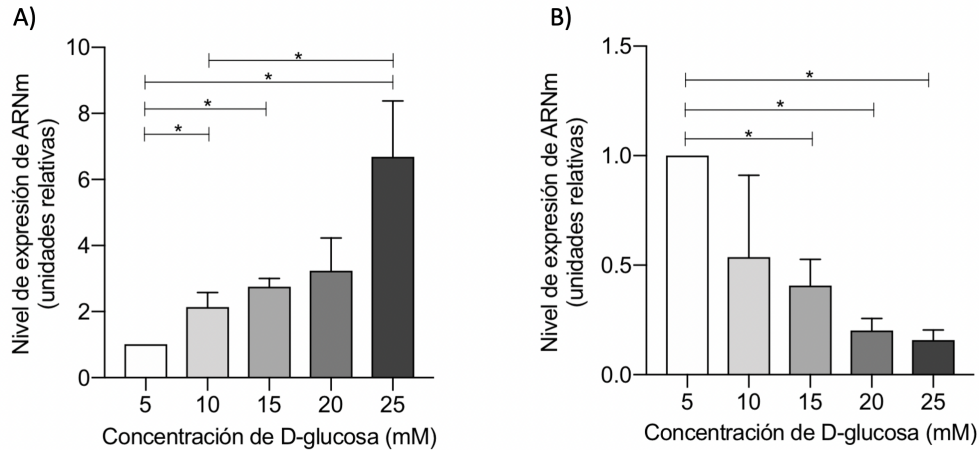
Por otra parte, también se determinó la expresión relativa de deiodinasa tipo 2 como deiodinasa tipo 3, definida como el nivel de expresión de mRNA para DIO2 o DIO3 respecto al nivel de expresión de mRNA de un gen control, en este caso se utilizó el gen 28S. Se calculó la expresión de mRNA de interés mediante cuantificación relativa, por medio de la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

Los resultados obtenidos evidenciaron un aumento significativo, respecto a la condición control (D-glucosa 5 mM), en los niveles de expresión relativa de mRNA para DIO2 en células endoteliales de microvasculatura humana a medida que se incrementó la concentración de D-glucosa a la que fueron expuestas estas células por un tiempo de 24 horas (figura 20 A). Por otra parte, los análisis en el nivel de expresión relativa de mRNA para DIO3 evidenciaron que a medida que se aumentó la concentración de D-glucosa a la que células HMEC-1 son incubadas, la expresión relativa de mRNA para DIO3 disminuyó progresivamente cuando es comparada con la condición control (figura 20 B). Con estos resultados se concluye y se demuestra nuevamente que en células endoteliales de microvasculatura expuestas a condiciones de alta glucosa experimentan alteraciones significativamente en los niveles de expresión relativos de mRNA para deiodinasa tipo 2 y 3.



**Figura 19. Curvas de amplificación y melting de los genes DIO2, DIO3 y 28s.**

La amplificación de cDNA se realizó mediante RT-qPCR. Se muestran las curvas de amplificación en escala exponencial para DIO2 (A), DIO3 (B) y 28S (C); Después de la amplificación se obtuvieron curvas de melting para los mismos genes (D, E y F respectivamente).

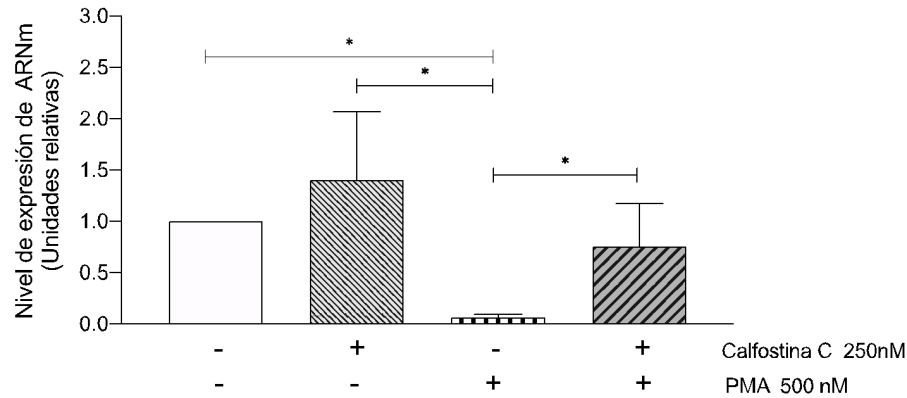


**Figura 20. Altas concentraciones de D-glucosa modifica significativamente la expresión de mRNA para DIO2 y DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1).** **A)** Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de mRNA para DIO2 en células HMEC-1 tras ser incubadas por 24 horas a diferentes concentraciones de D-glucosa. **B)** Gráfico que representa los niveles de expresión relativa de mRNA para DIO3 obtenidos en células HMEC-1 tras ser desafiadas a crecientes concentraciones de D-glucosa por un periodo de 24 horas. Los valores corresponden a la razón DIO2 o DIO3/28S. 28S se utilizó como control interno, y está expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$ . N=4.

### 5.5 Comprobación del efecto farmacológico de calfofostina C sobre los niveles de expresión de mRNA para eNOS mediante RT-qPCR en células HMEC-1.

Para comprobar y validar que calfofostina C (250 nM) es capaz de modular efectos farmacológicos en células endoteliales de microvasculatura humana, es que se evaluaron los niveles de expresión relativos de mRNA para el gen eNOS (técnica

RT-qPCR) en presencia de calfofina C 250 nM (inhibidor de PKC) y PMA 500 nM (activador de PKC) bajo condición de D-glucosa 5 mM. En la figura 21 se observa que los niveles de expresión relativos de mRNA para eNOS aumentan, aunque no significativamente en células HMEC-1 expuestas por un periodo de 24 horas a calfofina C (250 nM) en comparación a la condición control. Por otro lado, células HMEC-1 tratadas con PMA (500 nM) mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión de mRNA para eNOS con respecto tanto a la condición control como a la condición calfofina C (250 nM). Por último, cuando células endoteliales de microvasculatura humana son incubadas en presencia de PMA más calfofina C a las concentraciones ya señaladas, se aprecia que los niveles de expresión relativa de mRNA para eNOS, aumentan significativamente al ser comparados con la condición PMA (500 nM) y por otro lado, disminuyen levemente con respecto al control, pero de forma no significativa. Por consiguiente, esta evidencia nos dice que, calfofina C (250 nM) aumenta los niveles de expresión relativa de mRNA para eNOS al ser incubada por 24 horas en células HMEC-1. Además, calfofina C es capaz de revertir los efectos farmacológicos de PMA (500 mM). Con los datos anteriores se comprueba entonces que, calfofina C a una concentración de 250 nM y en un tiempo de 24 horas, presenta un efecto farmacológico sobre células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC-1).



**Figura 21. Calfo C (250 nM) provoca tras 24 horas de incubación efectos farmacológicos en células HMEC-1.** Mediante RT-qPCR se midieron los cambios en el nivel de expresión relativa de mRNA para eNOS en células HMEC-1 incubadas por 24 horas con calfo C (250 nM), PMA (500 nM) y calfo C + PMA. Los valores fueron normalizados con respecto a un gen housekeeping (28S) y expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar, \* $p < 0,05$ . N=3.

### 5.6 Evaluación de la participación de PKC en el efecto de D-glucosa sobre los niveles de expresión de mRNA y proteínas para deiodinasas en células endoteliales de microvasculatura humana.

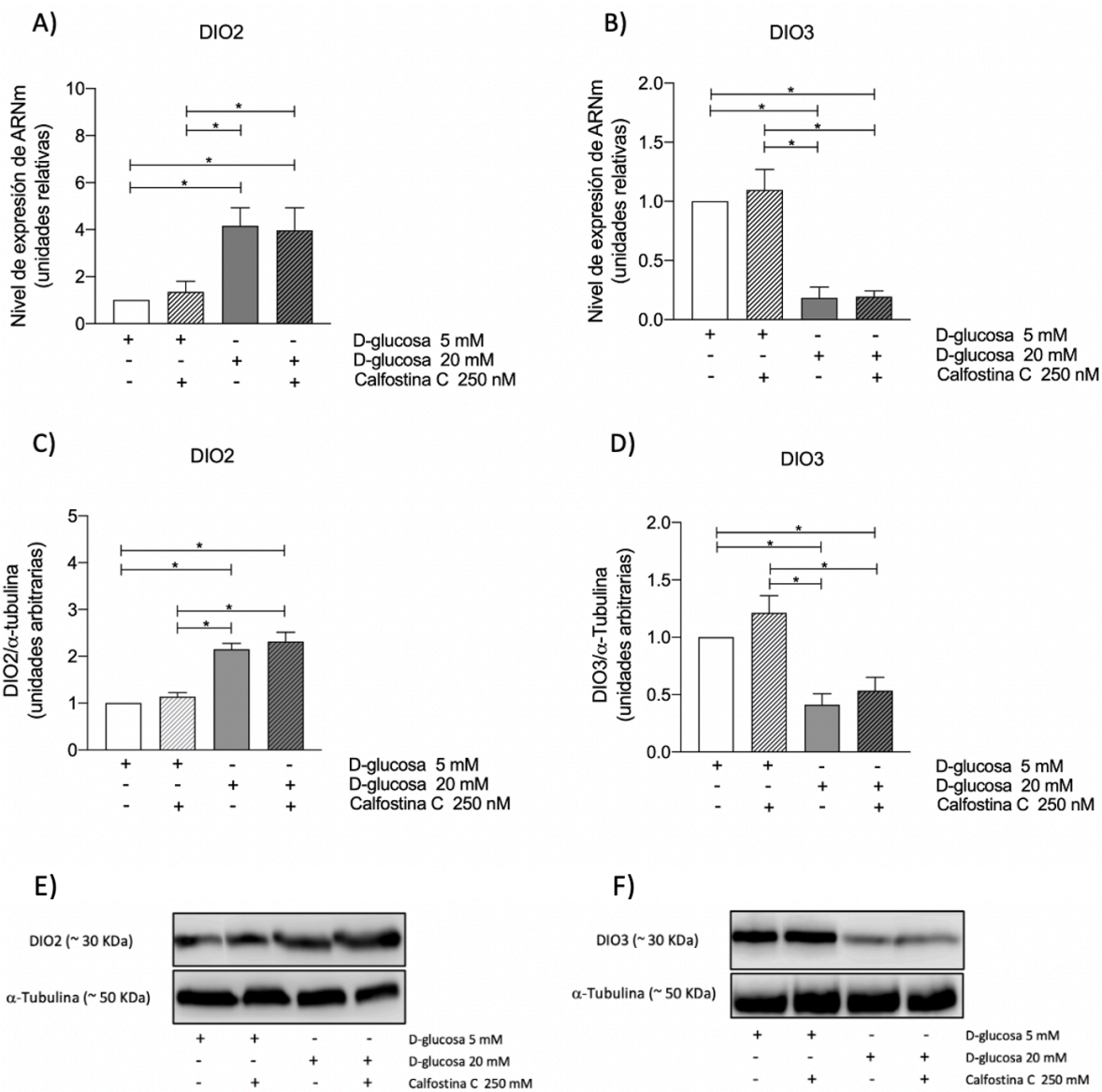
Para evaluar si los efectos en los cambios de expresión de deiodinasas tipo 2 y 3 en células HMEC-1 son debidos a la activación de alguna vía de señalización donde participa la proteína PKC, se utilizó un inhibidor de esta proteína, calfo C, en presencia y ausencia de una condición de alta glucosa (20 mM) para finalmente medir los cambios tanto en la expresión proteica como a nivel de mRNA para DIO2 y DIO3 mediante ensayos de *western blot* y RT-qPCR.

Los resultados que se muestran en la figura 22 A y B, señalaron que cuando células endoteliales microvaculares fueron incubadas por un tiempo de 24 horas en presencia de calfofina C 250 nM y en condición de D-glucosa 20 mM no se registraron cambios significativos en los niveles de expresión relativo de mRNA para DIO2 y DIO3 con respecto a una condición de D-glucosa 20 mM y en presencia de calfofina C (ver figura 22 A). Similares son los resultados obtenidos a nivel de expresión relativa de mRNA para DIO2 y DIO3 cuando células HMEC-1 fueron cultivadas en presencia y ausencia de calfofina C 250 nM bajo la condición de D-glucosa 5 mM (control) no registrándose cambios significativos a nivel de mRNA. Los únicos cambios significativos registrados son cuando se comparan cambios en la concentración de D-glucosa, resultados acordes a los mostrados anteriormente en la figura 20.

Por otro lado, también se buscó comparar los niveles de expresión proteica para DIO2 y DIO3 (figura 22 C y D respectivamente) en las mismas condiciones anteriormente descritas, diferentes concentraciones de D-glucosa (5 mM y 20 mM) en presencia y ausencia de calfofina C. Los resultados obtenidos son parecidos a los de los niveles relativos de mRNA, ya que no existen cambios significativos en la expresión proteica tanto para DIO2 como para DIO3 en condiciones de D-glucosa 20 mM en presencia y ausencia de calfofina C. De igual manera, no se apreciaron diferencias significativas en la expresión a nivel de proteína en DIO2 y DIO3. Solo se apreciaron cambios en la expresión proteica de DIO2 y DIO3 cuando se compararon cambios en la concentración de D-glucosa, acorde a los resultados ya expuestos (figura 16 y 17).

Dado que calfofostina C es un inhibidor de PKC y al no observarse cambios significativos a nivel de expresión relativo de mRNA y proteínas tanto para DIO2 como para DIO3 cuando células HMEC-1 son incubadas con este inhibidor en condiciones normales y de alta glucosa, es que se concluye que PKC no participa en la vía de señalización involucrada en los cambios de expresión de deiodinasas cuando células de microvasculatura endotelial humana son expuestas a condiciones de alta D-glucosa.





**Figura 22. Calfofistina C no induce cambios significativos a nivel de expresión relativa de ARNm y proteica en DIO2 y DIO3 en condiciones de alta glucosa en células endoteliales de microvasculatura humana. A y B) Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de mRNA para DIO2 en células HMEC-1 tras ser incubadas por 24 horas en presencia y ausencia de calfofistina C (250 nM) a concentraciones de D-glucosa 5 mM (control) y 20 mM (alta glucosa).**

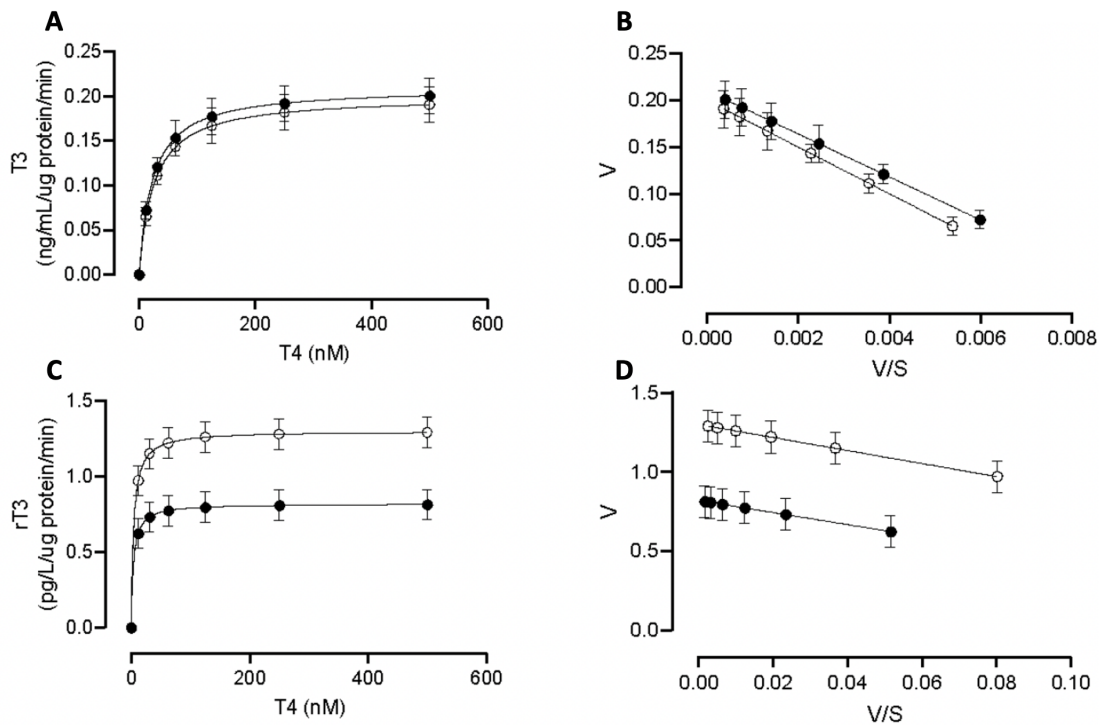
**C y D)** Resultados representativos de un ensayo de western blot para DIO2 y DIO3 respectivamente, se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. **E y F)** Niveles de expresión proteica para DIO3 en células HMEC-1 tras ser incubadas por 24 horas en presencia y ausencia de calfofina C (250 nM) a concentraciones de D-glucosa 5 mM (control) y 20 mM (alta glucosa). Los valores fueron normalizados con respecto a 28s (control interno) en el caso de niveles de expresión de ARNm y  $\alpha$ -tubulina (control de carga) para niveles de expresión proteica. Los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar, \* $p < 0,05$ . N=3.

### **5.7 Análisis de la actividad enzimática de DIO2 y DIO3 en condición de alta glucosa en la línea celular HMEC-1.**

El resultado de la actividad enzimática de las deiodinasas tipo 2 y 3 en condiciones de D-glucosa 5 mM y 25 mM se presenta como ensayos cinéticos enzimáticos (figura 23) y el cálculo de parámetros cinéticos (tabla 4).

En nuestros resultados observamos que la formación de  $T_3$  y  $rT_3$  a partir de  $T_4$  fue saturable, siguiendo un comportamiento cinético del tipo Michaelis-Menten (figura 23 A y C). Cuando los resultados obtenidos son linealizados a través de la representación de Eadie-Hoftee con el fin de determinar las constantes cinéticas ( $V_{max}$  y  $K_m$ ) lo más precisamente posible. Los gráficos de Eadie-Hofstee obtenidos fueron lineales tanto para la actividad 5'- y 5-deiodinasa y en condiciones de D-glucosa 5 mM y 25 mM (figura 23 B y D). La actividad enzimática 5'-deiodinasa no muestra cambios estadísticamente significativos en  $V_{max}$  y  $K_m$  aparente bajo la condición de alta glucosa en comparación a D-glucosa 5 mM (tabla 4). Sin embargo,

la situación no es la misma cuando se evaluó la actividad enzimática 5-deiodinasa, donde apreciamos una disminución significativa a nivel estadístico de la  $V_{max}$  cuando se compara bajo la condición de alta glucosa con respecto al control. Sin embargo, no se registró cambios en la  $K_m$  aparente en condición de D-glucosa 25 mM en comparación con 5 mM (tabla 4).



**Figura 23. Efecto de alta glucosa en la actividad 5'- y 5-deiodinasa en células endoteliales de microvasculatura humana.** La actividad enzimática de DIO2 y DIO3 se midió como formación de T<sub>3</sub> o rT<sub>3</sub> respectivamente a partir de T<sub>4</sub> (0–500 nM, 37 °C, 15 min) en la línea celular HMEC-1 en condiciones de D-glucosa 5 mM (○) y D-glucosa 25 mM (●). En A y C, la formación de T<sub>3</sub> y rT<sub>3</sub> a partir de T<sub>4</sub>, las cuales se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten. En B y D, gráficos de Eadie-

Hofstee a partir de los datos de A y C, respectivamente. Media  $\pm$  desviación estándar. N = 5 por grupo.

Parámetro cinético	D-Glucosa 5 mM (control)	D-Glucosa 25 mM
<b>Actividad DIO2 5'-deiodinasa (T4 <math>\rightarrow</math> T3)</b>		
<b>Vmax</b> (ng/L/ $\mu$ g de proteína/min)	0,201 $\pm$ 0,2	0,211 $\pm$ 0,5
<b>Km</b> (nM)	25,1 $\pm$ 2,8	23,3 $\pm$ 2,2
<b>Vmax/Km</b> (ng/ $\mu$ g de proteína/min/nM)	0,008 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001
<b>Actividad DIO3 5-deiodinasa (T4 <math>\rightarrow</math> rT3)</b>		
<b>Vmax</b> (pg/L/ $\mu$ g de proteína/min)	1.302 $\pm$ 0,1	0,821 $\pm$ 0,01 *
<b>Km</b> (nM)	4,1 $\pm$ 0,05	3,8 $\pm$ 0,04
<b>Vmax/Km</b> (pg/ $\mu$ g de proteína/min/nM)	0,31 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,02*

**Tabla 4. Parámetros cinéticos de la actividad 5'- y 5-deiodinasa.**  $V_{max}$ : velocidad máxima; Km: constante de Michaelis-Menten;  $V_{max}/Km$ : eficiencia catalítica.

\*  $P < 0.05$  con respecto a 25 mM. N = 5 por grupo.

## 6. DISCUSIÓN

La hiperglicemia aparece cuando los niveles de D-glucosa están elevados en sangre y es causada por una descontrolada regularización a nivel metabólico de D-glucosa. Breves episodios de hiperglicemia son capaces de causar daños a nivel tisular por mecanismos que involucran repetidos cambios agudos en el metabolismo celular. Sin embargo, la exposición a niveles elevados de D-glucosa y sostenido en el tiempo, también es capaz de provocar cambios que son acumulativos a nivel celular, que persisten a pesar del restablecimiento de la euglicemia. De esta manera, la hiperglicemia es el principal factor de riesgo responsable del desarrollo y progresión de las complicaciones vasculares en enfermedades como la diabetes.

En esta investigación se buscó evaluar el efecto de alta D-glucosa sobre la expresión de deiodinasas tipo 2 y 3 en un modelo celular endotelial de microvasculatura humana además de establecer si es un mecanismo regulado por PKC. En este contexto hemos observado en este estudio que los niveles de expresión a nivel de mRNA y proteico de deiodinasa tipo 2 (aumento en la expresión) y en deiodinasa tipo 3 (disminución) en la línea celular HMEC-1 se ven alterados significativamente cuando son expuesto a condiciones de alta glucosa (sobre o igual a concentraciones 20 mM con respecto a la condición control D-glucosa 5 mM) por un tiempo de 24 horas. Por otra parte, al desafiar cultivos celulares HMEC-1 con calfofostina C (inhibidor de PKC) y en condiciones de alta D-glucosa no se observaron cambios significativos a nivel de expresión de mRNA y proteico tanto como para DIO2 como para DIO3 cuando células HMEC-1 en condiciones control y de alta D-glucosa. A raíz de este resultado establecemos que

Proteína Kinasa C (PKC) no participa directamente en la vía de señalización involucrada en los cambios de expresión de deiodinasas cuando células de microvasculatura endotelial humana son expuestas a condiciones de alta glucosa.

### **6.1 Sobre el uso de la línea celular HMEC-1 como modelo de estudio.**

Nuestro grupo de investigación liderado por el *Ph.D.* Enrique Guzmán-Gutiérrez (Universidad de Concepción, Chile) ha enfocado sus investigaciones en patologías del embarazo, últimamente en la alteración del perfil tiroideo y sus mecanismos subyacentes en recién nacido y embarazadas que cursan con diabetes gestacional.

En el 2020, nuestro grupo investigativo publicó importantes datos, reportando que a nivel de tejido placentario (tanto en explantes placentarios como en células de sincitiotrofoblasto) embarazos con DMG existe una alteración en la expresión de deiodinasas al ser comparada con placentas de embarazos normo-glucoteolerantes. Este estudio constituye un importante enfoque con respecto a la desregulación de los niveles de hormonas tiroideas y las deiodonasas en placenta en condiciones de diabetes gestacional. A la luz de estos datos, nos preguntamos si estos cambios de expresión ocurren también en endotelio microvascular, punto importante en la circulación materno-fetal.

Si bien el modelo idóneo para esta investigación correspondía a utilizar cultivos primarios de células endoteliales microvasculares de placenta humana (hPMEC). Obtener y aislar este tipo celular según metodologías descritas por Lang *et al*; 2003 y Dye *et al*; 2004, involucra elevados costos en presupuestos reservados

principalmente al equipamiento y reactivos destinados a la implementación de la técnica en nuestro laboratorio. Por otra parte, lograr estandarizar la técnica de aislamiento de este tipo de cultivo, requiere de bastante tiempo, ya que corresponde a una técnica compleja y que requiere de expertiz por parte del investigador. A lo anterior, debemos mencionar las restricciones sanitarias instauradas a causa de la pandemia provocada por el nuevo coronavirus, SARS-CoV-2, dificultando la autorización a los correspondientes permisos bioéticos para conseguir y utilizar placentas humanas que cumplieran con las condiciones a estudiar y libres de SARS-CoV-2. A raíz de las dificultades expuestas anteriormente, se buscó un modelo celular endotelial de microvasculatura humana fácil de cultivar y manipular, rápido en proliferar y con requerimientos nutricionales de fácil obtención. Sumado a estos requerimientos se necesitaba de una línea celular que expresara constitutivamente las deiodinasas principalmente las de tipo 2 y 3, ya que como se ha reportado en literatura por diversos autores como por ejemplo Bianco *et al*; 2019; Zúñiga *et al*; 2022; Estas deiodinasas se expresan de manera elevada en placenta, aunque también en otros tejidos y tienen funciones enzimáticas claramente descritas.

El modelo escogido para este estudio fue la línea celular HMEC-1 (células endoteliales de microvasculatura humana), línea que fue donada por el investigador *Ph.D.* Rodrigo Moore (Universidad de Talca, Chile). Según lo reportado por Sabatino *et al*; 2014, este modelo celular inmortal de cultivo endotelial microvascular humano demuestra por primera vez a través de RT-qPCR y western blot la expresión constitutiva de los tres tipos de enzimas deiodinasas y receptores para hormonas tiroideas. Esto tiene una implicación fisiológica directa sobre el endotelio como diana específica para HTs. Este punto es de gran relevancia, dado el papel del sistema

endotelial como primera barrera para que las hormonas tiroideas circulantes atraviesen y salgan hacia el torrente sanguíneo. Ante estos datos, la línea celular HMEC-1 se considera un modelo válido y confiable en investigaciones sobre el sistema endotelial humano (Sabatino *et al*; 2014).

## **6.2 Efecto de alta glucosa sobre la viabilidad celular en la línea celular HMEC-1.**

Se decidió trabajar con un amplio rango de concentración de D-glucosa, desde una concentración fisiológica (5 mM, utilizado como control) hasta concentraciones patológicas (25 mM). Para este trabajo, primero se buscó evaluar la viabilidad celular de la línea celular HMEC-1 al ser cultivadas a las diferentes concentraciones de D-glucosa. Estudios previos (Kamal *et al*; 1998), han demostrado supresión proliferativa y en la viabilidad celular en células HMEC-1 luego del tratamiento con alta glucosa (20 y 40 mM) por 14 días. Si bien en este trabajo los tratamientos de HMEC-1 con D-glucosa fueron por un periodo breve de tan solo 24 horas, de igual manera se buscó evaluar que altas concentraciones no provocarían glucotoxicidad que pudiesen afectar la viabilidad celular mediante el uso de yoduro de propidio, el cual es un contratinción nuclear que se une al ADN mediante la intercalación entre bases nitrogenadas con baja preferencia de secuencia. Los resultados demostraron que al cabo de 24 horas de incubación de cultivos HMEC-1 a diferentes concentraciones de D-glucosa, no se evidenció algún cambio significativo en la viabilidad celular.



### **6.3 Alta glucosa altera los niveles de expresión de deiodinasa tipo 2 y 3 en células endoteliales de microvasculatura humana.**

Las hormonas tiroideas influyen en diferentes procesos fisiológicos en el ser humano como procesos de diferenciación, crecimiento celular y metabolismo energético de casi todas las células humanas y tejidos. Sin embargo, cobran vital importancia en el desarrollo placentario y fetal (Falla-Zuñiga *et al*; 2022). La homeostasis plasmática de hormonas tiroideas se logra mediante sistemas capaces de controlar su síntesis, secreción y metabolismo. De esta forma, se consigue regular la concentración circulante y permiten la modulación de la disponibilidad de las hormonas tiroideas en las células dianas (Luongo *et al*; 2019).

Uno de estos sistemas funciona a nivel intracelular. Al interior de las células, las moléculas de HT pueden ser activadas o inactivadas a través de la remoción de átomos de yodo. Este proceso es catalizado por un grupo de enzimas denominadas deiodinasas (DIO 1, DIO2 Y DIO3). De esta manera, las deiodinasas cumplen un papel regulador de la concentración de hormonas tiroideas según sean las necesidades del ambiente celular.

Hasta ahora, existen muy pocas investigaciones científicas con evidencia clara que demuestren el efecto de D-glucosa en la expresión de deiodinasas. Estudios recientes realizados por nuestro grupo (Gutiérrez-Vega *et al*; 2020) reportó que la expresión de DIO2 disminuye y DIO3 aumenta en placentas de término provenientes de embarazos que cursaron con diabetes mellitus gestacional. Por otro lado, en 2021, nuestro grupo determinó nuevamente cambios en el nivel de expresión a nivel de mRNA de DIO 3 (disminución) pero esta vez en un modelo de explante placentario expuesto a altas concentraciones de D-glucosa. Basados en

esta importante evidencia, se buscó determinar los efectos de alta D-glucosa en la expresión, tanto proteica como a nivel de mRNA, de deiodinasas en células endoteliales de microvasculatura humana. Se observaron importantes cambios significativos en la expresión de deiodinasas cuando cultivos HMEC-1 son expuestas a altas concentraciones de D-glucosa. La expresión de DIO 2 tanto a nivel proteico como a nivel mRNA aumenta en condiciones de alta glucosa, mientras que el efecto contrario se evidenció en la expresión de DIO 3, disminuyendo sus niveles de expresión. De esta manera, se comprobó que altas concentraciones de D-glucosa (>20 mM) alteran significativamente la expresión de estas enzimas en la línea celular HMEC-1. Estos resultados no se corresponden con los datos obtenidos por Gutiérrez-Vega *et al*; 2020. Si bien los autores también demuestran cambios de expresión en DIO 2 y DIO3, estos cambios son diferentes, ya que la expresión para deiodinasa tipo 2 disminuye, mientras que la expresión para deiodinasa tipo 3 aumenta. Estas diferencias en el perfil de expresión se pueden atribuir a la condición de estudio. En el estudio de Gutiérrez-Vega se utiliza como modelo placentas humanas que cursaron embarazos con diabetes mellitus gestacional. La fisiopatología de esta patología del embarazo es carácter multifactorial, donde encontramos alteraciones a nivel metabólico de D-glucosa (hiperglicemia), una condición de resistencia a la insulina (componente hormonal) entre otros, afectando seriamente la placenta. En cambio, nuestro estudio buscó investigar solamente el componente de alta D-glucosa, buscando simular una condición básica de hiperglicemia por un periodo corto de tiempo.

Un estudio aún más reciente, entregado en 2021 (Chávez, tesis de magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología, Universidad de Concepción, Chile.)

documentó en su trabajo el efecto de D-glucosa e insulina en la expresión de deiodinasas en un modelo de explantes placentarios del tercer trimestre. Uno de los puntos más destacables de su trabajo es que demuestra que altos niveles de D-glucosa disminuyen la expresión de mRNA DIO3, resultado similar por los obtenidos en esta investigación. A partir de lo anterior, podemos decir por sí sola, altas concentraciones de D-glucosa pueden alterar los niveles expresión de deiodinasa, aunque también existen otras condiciones o combinación de condiciones capaces de influir en los niveles de expresión de deiodinasas, aunque no ocurrirían en la misma relación.

Los resultados obtenidos con respecto a los cambios de niveles de expresión de deiodinasas en condiciones de alta D-glucosa, nos sugiere que, altos niveles de expresión de DIO 2 conllevan a un aumento en la concentración de T<sub>3</sub>. Esto podría ser explicado como un mecanismo compensatorio alterado para prevenir una deficiencia de T<sub>3</sub>, principal hormona tiroidea biológicamente activa. Estos hallazgos pueden ser de gran relevancia clínica en condiciones fisiológicas como también patológicas dado el importante papel regulador del endotelio como primera barrera a la circulación sanguínea.

#### **6.4 Sobre la participación de PKC en el efecto de D-glucosa sobre la expresión de mRNA de deiodinasas en células endoteliales de microvasculatura humana.**

Los cambios evidenciados en la expresión de deiodinasas al ser expuesta a alta D-glucosa, nos llevó a preguntarnos cuál es la vía de señalización involucrada. Se postuló la activación de la proteína kinasa C (PKC), debido a su directa relación con la hiperglicemia, factor que induce la activación de esta proteína y sus isoformas (Brownlee; 2004).

En primera instancia, se buscó un inhibidor capaz de bloquear la actividad enzimática de PKC. El utilizado en esta investigación fue calfofostina C, un compuesto químico natural y con una potente acción inhibitoria en PKC (Montecinos *et al*; 2000). A través de la técnica RT-qPCR se comprobó y validó que calfofostina C (250 nM), era capaz de modular efectos farmacológicos en células endoteliales de microvasculatura humana, utilizando el gen eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial) como un control referencial para ver los efectos de calfofostina C. La enzima se expresa ampliamente en diferentes tejidos y tipos celulares, puede regular diversos procesos fisiológicos asociados a la síntesis de óxido nítrico como vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria y la adhesión endotelial. Diversos autores han descrito la estrecha relación entre PKC y eNOS. Cuando PKC se encuentra activada intracelularmente tiene efectos directos en la expresión de eNOS, decreciendo su expresión, disminuyendo su efecto vasodilatador (Brownlee; 2004). Estos mismos efectos reportados fueron observados cuando cultivos de la línea celular HMEC-1 fueron tratadas con calfofostina C (250 nM) en condiciones de D-glucosa 5 mM. La expresión de mRNA de eNOS disminuyó significativamente con

respecto al control (D-glucosa) al ser tratadas las células con calfofostina C. Por otra parte, al agregar en conjunto calfofostina C y forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), un activador de PKC ampliamente utilizado en investigaciones biomédicas. La situación de expresión de mRNA de eNOS se revierte, aumentando su expresión, revirtiendo parcialmente la acción de calfofostina C. Los cambios que genera calfofostina C en la expresión de mRNA de eNOS en HMEC-1, replica a lo documentado en literatura; por lo tanto, se valida el efecto farmacológico de calfofostina C (250 nM).

Cuando PKC es activada por efecto de la hiperglicemia intracelular, tiene una variedad de efectos sobre la expresión génica, afectando el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular, aumento de citoquinas pro-inflamatorias, cambios en la matriz extracelular, cambio en la actividad enzimática como, por ejemplo, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa, PI3 Kinasa, MAP kinasa (Evcimen N.D & King G; 2007).

No existe evidencia científica documentada que demuestre relación entre alteración en el patrón de expresión de deiodinasas y una vía de señalización celular involucrada en estos cambios, siendo este un trabajo pionero en el área. Para evaluar si los efectos en los cambios de expresión de deiodinasas tipo 2 y 3 en células HMEC-1 son debidos a la activación de una vía de señalización donde participe la proteína PKC, se utilizó el inhibidor calfofostina C (250 nM), en presencia y ausencia de una condición de alta glucosa (20 mM), concentración en la que se registraron cambios significativos en la expresión relativa de mRNA y de proteínas para DIO2 y DIO3. Los datos obtenidos tras los análisis no demostraron cambios en la expresión relativa de mRNA ni tampoco se evidenciaron cambios en los niveles de expresión proteica para DIO2 o DIO3 cuando células HMEC-1 son cultivadas en

presencia de calfofostina C a una condiciones de D-glucosa 20 mM al ser comparados con la condición control (D-glucosa 5 mM); De esta manera demostramos que al no observarse cambios en la expresión de mRNA y proteica tanto para DIO 2 como también para DIO3 en las condiciones descritas, es que determinamos que la proteína PKC no estaría involucrada directamente en la vía de señalización activada por una condición de alta glucosa capaz de producir cambios de expresión en las enzimas deiodinasa.

### **6.5 Alta glucosa es capaz de alterar la actividad enzimática 5-deiodinasa de DIO3 en células endoteliales de microvasculatura humana.**

El estudio de la cinética enzimática de las deiodinasas en condiciones de alta glucosa, nos puede ayudar a comprender los detalles de su mecanismo catalítico y como se ve afectado en su papel en el metabolismo de las hormonas tiroideas.

La actividad de las deiodinasas se puede clasificar en dos tipos, la primera con actividad 5-desyodasa, que favorece la formación de  $T_3$  a partir de  $T_4$  mediada por DIO1 y DIO3, el segundo tipo posee una actividad 5'-desyodasa, que favorece la formación de  $rT_3$  a partir de  $T_4$ , o  $T_2$  a partir de  $T_3$ , mediada por DIO1 y DIO2. En este trabajo se presentó la actividad deiodinasa como actividad ensayos cinéticos enzimáticos y cálculos de sus respectivos parámetros cinéticos aparentes. Las gráficas obtenidas de la actividad enzimática para ambas enzimas estudiadas, representaciones del tipo hiperbólica, siguieron un comportamiento similar al modelo cinético de Michaelis-Menten. Para caracterizar estos ensayos cinéticos es fundamental determinar los parámetros cinéticos lo más preciso posible. La mejor

forma de obtenerlos es linealizando la representación hiperbólica, el método utilizado en este trabajo fue el de Eadie-Hosftree, con este método obtenemos de manera sencilla los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$ , además este tipo de linealización las variables del eje de las abscisas ( $v$ ) y las ordenadas ( $v/[S]$ ) no son independientes, sino que ambos ejes dependen de la velocidad de reacción de manera que cualquier error experimental se manifiesta en ambos ejes.

Los parámetros cinéticos obtenidos en nuestro estudio tanto para la actividad 5'- y 5-deiodinasa en condiciones de D-glucosa 5 mM son similares a los reportados anteriormente por nuestro equipo de trabajo (Gutiérrez-Vega *et al.*, 2020) en donde se midió la actividad enzimática y parámetros cinéticos para DIO2 y DIO3 en tejido placentario.

Por otra parte, los cambios en la actividad enzimática de DIO3 en condiciones de alta glucosa pueden estar asociada con el estrés oxidativo generado producto de la alta concentración de glucosa en el medio. Nuestros hallazgos hasta ahora han mostrado cambios tanto en la expresión como en la actividad de las deiodinasas en condiciones de alta glucosa en células endoteliales microvasculares nos confirman la idea de que una desregulación tiroidea ocurre y que la disponibilidad de hormonas tiroideas no sería la óptima.

## 7. CONCLUSION

Una adecuada concentración de hormonas tiroideas es esencial para un normal desarrollo en el ser humano, cobrando gran relevancia en la etapa fetal. Las enzimas responsables de regular la concentración de  $T_3$  y  $T_4$  en el ser humano son las deiodinasas, ya sea por conversión de  $T_4$  a  $T_3$  gracias a DIO2, o por la inactivación de  $T_4$  a  $rT_3$  (DIO 3) llevado a cabo por DIO3.

Alteraciones como hiperglicemia o algún tipo de diabetes pueden alterar la expresión y actividad cinética de estas enzimas en tejidos específicos como la placenta. En esta investigación se estudió y analizó el efecto de D-glucosa sobre la expresión y actividad enzimática de DIO2 y DIO3 en células endoteliales de la microvasculatura humana (HMEC-1). Además, se evaluó si corresponde a un mecanismo regulatorio dependiente de PKC.

A partir de los experimentos realizados en este trabajo, concluimos que:

- Altas concentraciones de D- glucosa aumentan tanto los niveles de expresión relativa de mRNA como proteica para deiodinasa tipo 2, mientras que para deiodinasa tipo 3 disminuyen los niveles de expresión.
- Alta glucosa es capaz de afectar la actividad 5-deiodinasa, disminuyendo significativamente su velocidad máxima pero no su Km aparente. En tanto que, la actividad 5'-deiodinasa no se vio afectada.
- PKC no participa en la vía de señalización involucrada en los cambios de expresión de deiodinasas cuando células de microvasculatura endotelial



humana son expuestas a condiciones de alta D-glucosa, debido a que calfostina C (inhibidor de PKC) no induce cambios significativos a nivel de expresión relativa de ARNm y proteica en DIO2 y DIO3 en condiciones de alta glucosa.

Por último, este estudio constituye un importante enfoque con respecto a la desregulación de hormonas tiroideas y deiodinasas en condiciones de alta glucosa en microvasculatura y nuestros hallazgos pueden ser de extrema relevancia clínica en condiciones fisiológicas como también patológicas, dado el importante papel regulador del endotelio como primera barrera al torrente sanguíneo, pero aún quedan muchas interrogantes que dilucidar con respecto a los mecanismos y vías de señalización involucradas para así tener un panorama completo de estas alteraciones. Otro regulador de las hormonas tiroideas y no considerado en este estudio son los transportadores de estas hormonas, por lo tanto, constituye una opción interesante de estudio.

## 8. REFERENCIAS

**Acurio J.** (2015). Regulación de la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular por el A<sub>2A</sub>AR de adenosina (tesis de Magister en Ciencias Biológicas). Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile.

**Ades E.W., Candal F.J., Swerlick R.A., George V.G., Summers S., Bosse D.C., & Lawley T.J.,** (1992). HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal of Investigative Dermatology*, 99(6), 683-690.

**Ajne M., Ahlborg G., Wolff K., Nissell H.** (2005). Contribution of endogenous endothelin-1 to basal vascular tone during normal pregnancy and preeclampsia. *American journal of obstetrics and gyneology*. 193(1): 234-240. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.11.023>

**American Diabetes Association.** (2018). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*, 41 (Supplement 1), S13-S27. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>

**Bartoli M., Platt D., Lemtalsi T., Gu X., Brooks S.E., Marrero M.B & Caldwell**

**R.B.** (2003). VEGD differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(11), 1562-1564. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1084fje>

**Basri, N. I., Mahdy, Z. A. Ahmad, S., Abdul Karim, A. K., Shan, L. P., Abdul**

**Manaf, M. R., & Ismail, N. A. M.** (2018). The World Health Organization (WHO) versus The International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group (IADPSG) diagnostic criteria of gestational diabetes mellitus (GDM) and their associated maternal and neonatal outcomes. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 0(0). <https://doi.org/10.1515/hmbci-2017-0077>

**Berry M.J. & Larsen P.R.** (1992). The role of selenium in thyroid hormone action.

*Endocr. Rev.*; 13: 207-219. <https://doi.org/10.1210/edrv-13-2-207>

**Bianco A.C., & Kim B.W.** (2006). Deodinases: implications of the local control of

the thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation*, 116(10), 2571-2579. <https://doi.org/10.1172/jci29812>

**Burrow G.N., Fisher D.A., and Larsen P.R.,** (1994). Maternal and fetal thyroid

function. *N. Engl. J. Med.* 331, 1072-1078. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410203311608>

**Calvo R.M., Jauniaux E., Gulbis, Asuncion M., Gervy C., Contempre B., Morreale de Escobar G.,** (2002). Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 87: 1768-1777. <https://doi:10.1210/jcem.87.4.8434>

**Chan S.Y., Franklyn J.A., Pemberton H.N., Bulmer J.N., Visser T.J., McCabe C.J., Kilby M.D.,** (2006). Monocarboxylate transporter 8 expression in the human placenta: the effects of severe intrauterine growth restriction. *J. Endocrinol.* 189, 465-471. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06582>

**Chan S., Kachilele S., Hobbs E., Bulmer J.N., Boelaert K., McCabe C.J., et al.** (2003). Placental iodothyronine deiodinase expression in normal and growth-restricted human pregnancies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4488-4495. <https://doi.org/10.1210/jc2003-030228>

**Chan S.Y., Vasilopoulou E. and Kilby M.D.** (2009). The role of the placenta in thyroid hormone delivery to the fetus. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 5, 45-54. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet1026>

**Chi J. T., Chang H. Y., Haraldsen G., Jahnsen F., Troyanskaya O., Chang D., Wang Z., Rockson S., van de Rijn M., Botstein D., Brown O.** (2003). Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *PNAS.* 100, 10623-10628. <https://doi.org/10.1073/pnas.1434429100>

**Contempré B., Jauniaux E., Calvo R., Jurkovic D., Campbell S., Morreale de Escobar G.** (1993). Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1719-1722

**Cosentino F., Hishikawa K., Katusic Z.S., Lüscher T.F.** (1997). High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 96(1):25-28.  
<https://doi/10.1161/01.cir.96.1.2>

**den Ouden A.L., Kok J.H., Verkerk P.H., Brand R., Verloove-Vanhorick S.P.** (1996) The relation between neonatal thyroxine levels and neurodevelopmental outcome at age 5 and 9 years in a national cohort of very preterm and/or very low birth weight infants. *Pediatric Res.* 39(1): 142-145  
<https://doi.org/10.1203/00006450-199601000-00021>

**Di Fulvio P., Pandolfi A., Formoso G., Di Silvestre S., Di Tomo P., Giardinelli A., De Marco A., Di Pietro N., Taraborrelli M., Sancilio S., Di Pietro R., Piantelli M., Consoli A.** (2014). Features of endothelial dysfunction in umbilical cord vessels of women with gestational diabetes. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases.* 24(12), 1337-1345.  
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.06.005>

**Díaz-Flores M., Baiza-Gutman L.A., Ibáñez-Hernández M.A., Pascoe-Lira D., Guzman-Greenfel A.M., & Kumate-Rodriguez J., (2004).** Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta médica de Mexico*, 140(4), 437-447.

**Dye J., Lawrence L., Linge C., Leach L., Firth J., Clark P. (2004).** Distinct patterns of microvascular endothelial cell morphology are determined by extracellular matrix composition. *Endothelium: journal of endothelial cell research*. 11(3-4): 151-167. <https://doi.org/10.1080/10623320490512093>

**Fantz C.R., Dagogo-Jack S., Ladenson J.H. and Gronowski A.M. (1999)** Thyroid function during pregnancy. *Clin. Chem.* 45, 2250-2258.

**Feoktistov I., Goldstein A.E., Ryzhov S., Zeng D., Belardinelli L., Voyno-Yasenetskaya T., Biaggioni I. (2002).** Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res.* 90(5): 531-538. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000012203.21416.14>

**Garmendia M.L., Mondschein S., Montiel B., & Kusanovic J.P., (2019).** Trends and predictors of gestational diabetes mellitus in Chile. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 148(2): 210-218. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13023>

**Göbel A., Göttlich M., Reinwald J., Rogge B., Uter J.C., Heldmann M., Sartorius**

**A., Brabant G., Münte T.** (2020). The Influence of Thyroid Hormones on Brain Structure and Function in Humans. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. <https://doi.org/10.1055/a-1101-9090>

**Gutierrez- Vega S., Armella A., Mennickent D., Loyola M., Covarrubias A.,**

**Ortega-Contreras B., Escudero C., Gonzalez M., Alcalá M., Ramos M.P., Viana M., Castro E., Leiva A., Guzman-Gutierrez E.** (2020). High levels of maternal total tri-iodothyronine, and low levels of fetal free L-thyroxine, are associated with altered deiodinase expression and activity in placenta with gestational diabetes mellitus. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.024274>

**Guzmán-Gutierrez E., Veas C., Leiva A., Escudero C., & Sobrevia L.** (2014). Is

a low level of free thyroxine in the maternal circulation associated with altered endothelial function in gestational diabetes? *Frontiers in Pharmacology*, 5: 136. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00136>

**Hernández J.C., Emiliano M., Puig L., García P.H., Marcel E., & Quezada M.Y.**

(2011). Aldosa reductasa y proteína quinasa C en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Revista Mexicana de Patología Clínica*; 58: 102-107.

**James S.R., Franklyn J.A., and Kilby M.D.** (2007). Placental transport of thyroid hormone. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21, 253-264.  
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.03.001>

**Kilby M.D., Barber K., Hobbs E. and Franklyn J.A.** (2005). Thyroid hormone action in the placenta. *Placenta* 26, 105-113.  
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.08.004>

**Kim D.K., Kanai Y., Chairoungdua A., Matsuo H., Cha S.H., Endou H.,** (2001). Expression cloning of a Na<sup>+</sup>-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H<sup>+</sup>/monocarboxylate transporters. *J. Biol. Chem.* 276, 17221-17228. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009462200>

**Koopdonk-kool, J. M., de Vijlder J.J., Veenboer G.J., Ris-Stalpers C., Kok J.H., Vulsma T., et al.** (1996). Type II and Type III Deiodinase Activity in Human Placenta as a Function of Gestational Age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 2154–2158.

**Krüger-Genge A., Blocki A., Franke R.P., Jung F.** (2019). Vacular Endothelial Cell Biology: An Upgrade. *Int. J. Mol. Sci.* 20(18): 4411.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20184411>



**Lamirand A., Pallud-Mothré S., Ramaugé M., Pierre M., Courtin F., (2008).**

Oxidative stress regulates type 3 deiodinase and type 2 deiodinase in cultured rat astrocytes. *ENDOCRINOLOGY*, 149(7): 3713-21.  
<https://doi.org/10.1210/en.2007-1462>

**Landers K., & Richard K. (2017).** Traversing barriers - How thyroid hormones pass

placental, blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.041>

**Leiva A., Pardo F., Ramírez M.A., Farías M., Casanello P., Sobrevia L. (2011).**

Fetoplacental vascular endothelial dysfunction as an early phenomenon in the programming of human adult diseases in subjects born from gestational diabetes mellitus or obesity in pregnancy. *Exp Diabetes Res*. 2011:349286  
<https://doi.org/10.1155/2011/349286>

**Lyll F. and Greer I.A. (1996).** The vascular endothelium in normal pregnancy and

pre-eclampsia. *Reviews of Reproduction*. 1(2): 107-116.  
<https://doi.org/10.1530/revrepord/1.2.107>

**Margaill I., Royer J., Lerouet D., Ramaugé M., Le Goascogne C., Li W., et al.**

(2005) Induction of type 2 iodothyronine deiodinase in astrocytes after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 25(4): 468-76.  
<https://doi.org/10.1038/sj-jcbfm.9600041>

**McIntyre H.D., Catalano P., Zhang C., Desoye G., Mathiesen E.R., & Damm P.,**  
(2019) Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>

**Metzger B.E., Gabbe S.G., Persson B., Buchanan T.A., Catalano P.A., Damm P., et al.** (2010). International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care*, 33(3), 676-682.  
<https://doi.org/10.2337/dc09-1848>

**Ministerio de Salud de Chile.** (2015). Programa Nacional Salud de la Mujer. Guía Perinatal.

**Monteiro L.J., Norman J.E., Rice G.E., Illanes S.E.** (2016). Fetal programming and gestational diabetes mellitus. *Placenta*. 12;48 *Suppl. 1*: S54-S60.  
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.11.015>

**Mordwinkin N., Ouzounian J., Yedigarova L., Montoro M., Louie S.G. & Rodgers K.** (2013). Alteration of endothelial function markers in women with gestational diabetes and their fetuses. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*; 26(5): 507-512. <https://doi.org/10.3109/14767058.2012.736564>

**Mortimer R., Galligan J., Cannell G., Addison R., and Roberts M.** (1996).

Maternal to fetal thyroxine transmission in the human term placenta is limited by inner ring deiodination. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 2247-2249.  
<https://doi.org/10.1210/jcem.81.6.8964859>

**Negrato C.A., Montenegro R.M.Jr., Von Kostrisch L.M., Guedes M.F., Mattar R.,**

**and Gomes M.B.** (2012). Insulin analogues in the treatment of diabetes in pregnancy. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 56, 405-414.  
<https://doi.org/10.1590/S0004-27302012000700001>

**Nguyen-Ngo C., Jayabalan N., Salomon C. & Lappas M.** (2019). Molecular

pathways disrupted by gestational diabetes mellitus, *Journal of Molecular Endocrinology*, 63(3), 51-72. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0274>

**Papachristoforou E., Lambadiari V., Maratou E., Makrilakis K.,** (2005).

Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Journal of Diabetes Research. Res.* 28, 421-432. <https://doi.org/10.1155/2020/7489795>

**Park S.Y., Kim J.K., Kim I.J., Choi B.K., Junk K.Y., Lee S., Park K.J.,**

**Chairoungdua A., Kanai Y., Endou H., Kim D.K.** (2005). Reabsorption of neutral amino acids mediated by amino acid transport LAT2 and TAT1 in the basolateral membrane of proximal tubule. *Arch. Pharm. Res.* 28, 421-432.  
<https://doi.org/10.1007/bf02977671>

**Patel P., Weerasekera N., Hitchins M., Boys C.A., Johnston D.G., Williamson C.**

(2003). Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E, and NTCP gene transcripts in 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimester human placenta. *Placenta* 24,39-44.  
<https://doi.org/10.1053/plac.2002.0879>

**Pérez-López F.R.,** (2007). Iodine and thyroid hormones during pregnancy and postpartum. *Gynecol. Endocrinol.* 23, 414-428.  
<https://doi.org/10.1080/09513590701464092>

**Poston L.,** (2010). Developmental programming and diabetes - the human experience and insight from animal models. *Best Pract. Res. clin. Endocrinol. Metab.* 24,541-552. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.05.007>

**Prezioso G., Giannini C. & Chiarelli F.,** (2018) Effect of Thyroid Hormones on Neurons and Neurodevelopment. *Hormone Research in Paediatrics*, 1-9.  
<http://doi.org/10.1159/000492129>

**Richard K., Hume R., Kaptein E., Sanders. J.P., van Toot H., de Herder W.W., den Hollandet J.C., Krenning E.P., Visser T.J.,** (1998). Ontogeny of iodothyronine deiodinases in human liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2868-2874. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.8.5032>

**Ritchie J.W., Taylor P.M.** (2001). Role of the System L permease LAT1 in amino acid and iodothyronine transport in placenta. *Biochem. J.* 356, 719-725. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3560719>

**Rizzoni D., De Ciuceis C., Salvetti M., Painsi A., Rossini C., Agabiti-Rosei C., Miuesan M.L.** (2015). Interactions Between Macro- and Micro-Circulation: Are They Relevant?. *High Blood Press Cardiovasc Prev*; 22, 119-128. <https://doi.org/10.1007/s40292-015-0086-3>

**Romero J.C.,** (1998). Recientes avances en la neuropatía autonómica cardiovascular de la diabetes mellitus. *Rev. Cubana Endocrinología*; 9(2), 149-163.

**Sabatino L., Lubrano V., Balzan S., Kusmic C., Del Turco S. & Iervasi G.** (2014). Thyroid hormone deiodinases D1, D2, and D3 are expressed in human endothelial dermal microvascular line: effects of thyroid hormones. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 399 (1-2), 87-89. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2235-8>

**Sato K., Sugawata J., Sato T., Mizutamari H., Suzuki T., Ito A., Mikkaichi T., Onagawa T., Tanemoto M., Unno M., Abe T., Okamura K.,** (2003). Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta. *Placenta.* 24, 144-148. <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0907>

**Schweizer U., Kohrle J.** (2003). function of thyroid hormone transport in the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(7), 3965-3973. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.07.015>

**Segura S.** (2014). Thyroid function in the fetus, newborn and preterm infant iodine recommendations during the neonatal period. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*; 5 Suppl(2):13-22.<http://doi.org/10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2014.Nov>

**Shanmugam, S., Dhiman, P., Rajendiran, S., & Maurya, D. K.** (2018). Gestational impaired glucose tolerance ( GIGT ) - induced suppression of fetal thyroid secretion : effect on fetal outcome. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 0(0), 1–5. <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1422716>

**Schussler G.C.** (2000). The thyroxine-binding proteins. *Thyroid*. 10: 141-149. <https://doi.org/10.1089/thy.2000.10.141>

**Sobrevia L., Abarzúa F., Nien J.K., Salomón C., Westermeier F., Puebla C., Cifuentes F., Guzmán-Gutierrez E., Leiva A., Casanello P.,** (2011). Differential placental macrovascular and microvascular endothelial dysfunction in gestional diabetes. *Placenta*. 32 suppl 2: 159-164. <https://doi.org/10.1089/thy.2000.10.141>

**Sobrevia L. & González M.** (2009). A role for insuline on L-arginine transport in fetal endothelial dysfunction in hyperglycaemia. *Current vascular pharmacology*, 7(4), 467-474. <https://doi.org/10.2174/157016109789043919>

**Spitzweg C., Heufelder A.E., Morris J.C.,** (2000). thyroid iodine transport. *Thyroid*; 10(4); 321-330. <https://doi.org/10.1089/thy.2000.10.321>

**Stulp M.R., de Vijlder J.J., and Ris-Stalpers C.,** (1998). Placental iodothyronine deiodinase III and II ratios, mRNA expression compared to enzyme activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 142,67-73.

**Su P.Y., Huang K., Hao J.H., Xu Y.Q., Yan S.Q., Li T., Xu Y.H., and Tao F.B.** (2011) Maternal Thyroid Function in the First Twenty Weeks of Pregnancy and Subsequent Fetal and Infant Development: A Prospective Population-Based Cohort Study in China. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(10), 3234-3241. <https://doi:10.1210/jc.2011-027>

**Walters W.A. and Boura A.L.** (1991). Regulation of fetal vascular tone in the human placenta. *Reproduction, fertility and development* 3: 475-481. <https://doi.org/10.1071/RD9910475>

**Westermeier F., Puebla C., Vega J., Farias M., Escudero C., Casanello P. &**

**Sobrevia L.** (2009). Equilibrative Nucleoside Transporters in Fetal Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus and Hyperglycaemia. *Current Vascular Pharmacology*, 7(4), 435-449. <https://doi.org/10.2174/157016109789043900>

**Williams F.L.R., Mires G.J., Barnett C.A., Ogston S.A., van Toor H., Visser T.J.,**

**Hume R.** (2005). Transient hypothyroxinaemia in preterm infants; the role of cord sera thyroid hormone levels adjusted for prenatal and intrapartum factors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90:4599-4606. <https://doi:10.1210/jc.2005-0214>