



Universidad de Concepción  
Facultad Farmacia

**PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS  
POR MITÓGENOS Y PROTEÍNA QUINASA B EN EL  
AUMENTO DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE  
OATP4A1 EN TROFOBLASTOS HUMANOS DE PRIMER  
TRIMESTRE POR INSULINA**

**POR KATHERINE ISABEL ROBLE RIEDEMANN**

Tesis de Magister presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de  
Concepción para optar al título profesional de Magíster en Bioquímica clínica e  
Inmunología

**Profesor Guía y Patrocinante**

Dr. Enrique Alberto Guzmán Gutiérrez  
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

Junio, 2024  
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

<b>INDICE DE ILUSTRACIONES.....</b>	<b>5</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>2. PLACENTA Y TROFOBLASTOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. HORMONAS TIROIDEAS DURANTE EL EMBARAZO .....</b>	<b>13</b>
<b>4. TRANSPORTE DE HORMONAS TIROIDEAS EN PLACENTA.....</b>	<b>15</b>
<b>5. INSULINA EN EL EMBARAZO .....</b>	<b>20</b>
<b>6. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA.....</b>	<b>23</b>
<b>7. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>26</b>
<b>8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>9. HIPÓTESIS .....</b>	<b>26</b>
<b>10. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>27</b>
<b>11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>27</b>
<b>12. METODOLOGÍA .....</b>	<b>28</b>
<b>12.1 Diseño del estudio.....</b>	<b>28</b>
<b>12.2 Bioseguridad .....</b>	<b>28</b>
<b>12.3 Cultivo celular.....</b>	<b>28</b>
<b>12.4 Condiciones de cultivo .....</b>	<b>29</b>
<b>12.5 Expresión de ARN mensajero de OATP4A1 en la línea celular HTR8/SVNEO</b>	<b>29</b>
<b>12.5.1 Extracción de ARNm mediante Trizol .....</b>	<b>29</b>
<b>12.5.2 Transcripción reversa .....</b>	<b>30</b>
<b>12.5.3 qPCR.....</b>	<b>30</b>
<b>12.6 Expresión de proteínas por Inmunocitoquímica .....</b>	<b>31</b>
<b>12.7 Determinación de actividad de transporte de T4 en células HTR8/Svneo..</b>	<b>31</b>
<b>12.7.1 Ensayo de captación .....</b>	<b>31</b>
<b>12.7.2 Determinación de parámetros cinéticos .....</b>	<b>33</b>
<b>12.8 Análisis estadísticos .....</b>	<b>33</b>
<b>13. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>13.1 Niveles de OATP4A1 por insulina .....</b>	<b>34</b>
<b>13.2 Efecto de insulina en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1.....</b>	<b>37</b>

13.3	Efecto de los inhibidores de la vía MAPK y AKT sobre los niveles de ARNm y proteína de OATP4A1 por insulina.....	41
13.4	Efecto de PD98059 en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1 en presencia de insulina.....	45
13.5	Efecto del inhibidor de AKT IV en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1 en presencia de insulina.....	50
14.	DISCUSIÓN .....	56
14.1	Sobre la expresión de OATP4A1 por insulina .....	56
14.2	Sobre la actividad del transporte de T4 por insulina.....	60
14.3	Sobre el efecto de MAPK y AKT en la expresión y actividad de OATP4A1 por insulina.....	63
15.	DEBILIDADES Y LIMITACIONES .....	69
16.	FORTALEZAS .....	70
17.	CONCLUSION .....	71
18.	PROYECCIONES .....	72
19.	BIBLIOGRAFIA .....	73

## INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Expresión de transportadores de hormonas tiroideas en la línea celular HTR8/SVneo mediante Inmunocitoquímica.....	17
Figura 2. Expresión de OATP4A1 y captación de T4 en presencia de insulina.....	18
Figura 3. Niveles de insulina fisiológico y patológico durante las semanas de gestación.....	22
Figura 4. Vías de señalización de insulina PI3K/AKT y MAPK/ERK.....	25
Figura 5. Niveles de ARNm de OATP4A1 en ausencia y presencia de insulina en células HTR8/SVneo.....	35
Figura 6. Niveles de proteína de OATP4A1 en ausencia y presencia de insulina en células HTR8/SVneo.....	36
Figura 7. Efecto de insulina en la captación total, en la fracción no Inhibible por digoxina (DGX) y en la fracción Inhibible por digoxina de T4 en células HTR8/SVneo.....	39
Figura 8. Niveles de ARNm de OATP4A1 en ausencia y presencia de insulina, inhibidor PD98059 e inhibidor de AKT IV en células HTR8/SVneo.....	43
Figura 9. Niveles de proteínas de OATP4A1 en ausencia y presencia de insulina, inhibidor PD98059 e inhibidor de AKT IV en células HTR8/SVneo.....	44
Figura 10. Efecto de insulina y PD98059 en la captación total de T4, en la fracción no Inhibible por digoxina (DGX) y en la fracción Inhibible por digoxina en células HTR8/SVneo.....	48

Figura 11. Efecto de insulina e inhibidor de AKT IV en la captación total de T4, en la fracción no Inhibible por digoxina (DGX) y en la fracción Inhibible por digoxina en células HTR8/SVneo.....53

Figura 12. Modelo propuesto para la expresión de OATP4A1 dependiente de AKT y MAPK.....68

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de Km y Vmax de los transportadores de hormonas tiroideas según su tejido.....	19
Tabla 2. Parámetros cinéticos del transporte de T4 en ausencia y presencia de insulina y digoxina.....	40
Tabla 3. Parámetros cinéticos del transporte de T4 en ausencia y presencia de insulina, PD98059 y digoxina.....	49
Tabla 4. Parámetros cinéticos del transporte de T4 en ausencia y presencia de insulina, inhibidor de AKT IV y digoxina.....	55

## RESUMEN

Las hormonas tiroideas (HT) garantizan el correcto desarrollo fetal, y la placenta es responsable de regular el transporte de HT mediante transportadores localizados en la membrana de los trofoblastos. Los transportadores de hormonas tiroideas (THT) corresponden a 3 familias de THT expresados en tejido placentario: Monocarboxilatos (MCT), transportadores de Aminoácidos (LAT) y polipéptidos transportadores de Aniones Orgánicos (OATP). Condiciones pre-embarazo como la obesidad, genera una hiperinsulinemia patológica durante el primer trimestre de gestación, donde la insulina aumenta la expresión del transportador OATP4A1 en células de trofoblasto humano, sin embargo, se desconoce si las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y proteína quinasa b (AKT) participan en el aumento de este por insulina. El objetivo general fue determinar la participación de MAPK y AKT en el aumento de la expresión y actividad de OATP4A1 en la línea celular HTR8/SVneo por insulina. En cuanto a la metodología, se usó cultivo celular de trofoblastos (HTR8/Svneo) incubados con insulina (10 nM, 24hrs) e inhibidores de MAPK (10 $\mu$ M) y AKT (10nM) para evaluar la expresión de ARN mensajero (ARNm) y proteína del transportador OATP4A1 mediante la técnica de qPCR e inmunocitoquímica respectivamente. Además, se evaluó la captación de tiroxina (T4) en trofoblastos por el transportador OATP4A1 obteniendo los parámetros cinéticos. En este trabajo encontramos que la insulina aumenta la expresión de OATP4A1 a nivel de ARNm dependiente de AKT y a nivel de proteína dependiente de MAPK. Además, aumenta la captación de T4 dependiente OATP4A1 por ambas

vías de señalización. En conclusión, insulina aumenta la expresión y actividad de OATP4A1 de manera dependiente de AKT y MAPK en células HTR8/Svneo.

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante la gestación, el crecimiento y salud fetal requiere de nutrientes como glucosa, lípidos, proteínas, intercambio gaseoso y hormonas que circulan en la sangre materna (Urquiza *et al.*, 1988). Si bien la fisiología materna y fetal son diferentes, ambos sistemas interactúan a través de la placenta, la cual permite la transferencia de hormonas tiroideas (HT) de la madre al feto entre otros componentes (Abalovich, 2003). En relación con las HT durante la gestación temprana, el feto depende exclusivamente de las hormonas tiroideas maternas, puesto que la tiroides fetal aún no se encuentra desarrollada (Duarte, 1993).

Las HT son fundamentales en la primera mitad de la gestación, puesto que son necesarias para el crecimiento óseo, maduración pulmonar, síntesis de vitaminas y el correcto desarrollo del sistema nervioso fetal (Macchia y Sánchez, 2007). Además, son vitales para el desarrollo placentario (Krassas GE *et al.*, 2010), ya que se ha visto que mujeres con niveles anormales de HT presentan complicaciones del embarazo mediadas por una placentación anormal como ocurre en la preeclampsia, aborto espontáneo y restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) (Korevaar T *et al.*, 2017). Es por esto, que la glándula tiroidea materna necesita incrementar su producción de hormonas tiroideas y adaptarse a un nuevo equilibrio durante el embarazo (Abalovich, 2003).

La placenta, un órgano embrionario altamente complejo y especializado, quien cumple el rol de suplir las necesidades del feto permite el paso de HT. El transporte de HT materna hacia el feto, permite el transporte de Tiroxina (T4) como

Triiodotironina (T3) mediante transportadores de hormonas tiroideas (THT) localizados en el sincitiotrofoblasto (Loubiere *et al.*, 2012). Se han descrito 3 familias de THT, los cuales corresponden a Monocarboxilatos (MCT), polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) y transportadores de aminoácidos de tipo L (LAT) (Krause *et al.*, 2020).

Por otro lado, condiciones previas al embarazo, como la obesidad, genera una hiperinsulinemia patológica durante el primer trimestre de gestación (Rodríguez *et al.*, 2019). El aumento de insulina puede tener consecuencias en el desarrollo del feto generando un crecimiento excesivo (macrosomía), muerte fetal intrauterina, retraso en la maduración pulmonar e hipoglucemia neonatal (Contreras-Zúñiga *et al.*, 2018). Además, se tiene evidencia que la hiperinsulinemia está involucrada en la regulación de transportadores de hormonas tiroideas en la barrera placentaria, aumentando la expresión del transportador OATP4A1 en trofoblastos humanos de la línea celular HTR8/SVneo (Roble *et al.*, 2023). Posiblemente para aumentar el suministro de HT hacia el feto, evitando efectos indeseables en el desarrollo fetal y en el desarrollo de la placenta (Olivieri *et al.*, 2000).

La insulina tiene múltiples vías de señalización que median sus acciones biológicas (Reyes *et al.*, 2008). Las dos vías principales son: la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K/AKT) y la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas), las cuales regulan la mayoría de las acciones de la insulina dependiendo de un gran número de interacciones proteicas (Gutiérrez-Rodelo *et al.*, 2017). Sin embargo, se desconocen las proteínas de las vías de señalización que participan en el aumento de la expresión de OATP4A1 mediante insulina.

## 2. PLACENTA Y TROFOBLASTOS

La placenta humana es un órgano embrionario altamente complejo y especializado, imprescindible para la supervivencia fetal (Lecarpentier *et al.*, 2015). Forma una verdadera interfaz entre la circulación materna y fetal, facilitando el intercambio gaseoso y metabólico (Isla *et al.*, 2008). Durante el curso del embarazo, actúa como los pulmones, el intestino, los riñones e hígado del feto (Burton *et al.*, 2015). Cumple funciones de transporte y metabolismo, así como protectoras y endocrinas, necesarios para que el feto se desarrolle de una manera adecuada (Rodríguez-Cortes *et al.*, 2014). Sintetiza hormonas como la gonadotropina coriónica (hCG) que mantiene el cuerpo lúteo funcional, progesterona que mantiene el endometrio y lactógeno placentario que promueve el desarrollo de la glándula mamaria (Figueru-Ruiz *et al.*, 2006).

En placenta, encontramos distintos tipos celulares como fibroblastos, macrófagos placentarios, células endoteliales y trofoblastos ubicados en la barrera placentaria (Burton GJ *et al.*, 2015). La barrera placentaria limita el contacto entre la sangre materna y fetal, donde se realizan los transportes de nutrientes, agua y hormonas (Palacín *et al.*, 1984). Esta barrera placentaria está formada por vellosidades coriónicas, cuya unidad funcional son los trofoblastos, los cuales se diferencian en citotrofoblasto extraveloso, citotrofoblasto veloso mononuclear y sincitiotrofoblasto multinuclear (Sadler, T. W *et al.*, 2006). El citotrofoblasto extraveloso se encarga de remodelar las arterias espirales maternas para asegurar un buen flujo sanguíneo hacia la placenta, mientras que el citotrofoblasto veloso y el sincitiotrofoblasto

aseguran las funciones endocrinas y los intercambios materno-fetales de la placenta (Purizaca-Benites *et al.*, 2008). Líneas celulares de trofoblastos son utilizadas en diversas investigaciones asociada a enfermedades y alteraciones de la placenta (Oviedo Ramírez, 2017), tales como HTR8/SVneo (Novoa-Herrán *et al.*, 2011), BeWo (Carrillo, 2016), JAR, JEG-3 (Sánchez, 2014), provenientes de trofoblastos humanos de coriocarcinoma que asemejan el ambiente gestacional. En este estudio se utilizó la línea celular HTR8/SVneo, la cual corresponde a trofoblastos de primer trimestre de gestación (Roseweir AK *et al.*, 2012).

Como mencionamos anteriormente, el feto requiere de nutrientes y hormonas para desarrollarse correctamente (Urquiza *et al.*, 1988). Dentro de las hormonas importantes en el primer trimestre de gestación, encontramos a las HT, las cuales deben atravesar las capas celulares de trofoblastos para ingresar a la circulación fetal y cumplir su rol (Brandan *et al.*, 2007).

### **3. HORMONAS TIROIDEAS DURANTE EL EMBARAZO**

La glándula tiroidea es uno de los órganos más grande a nivel endocrino (Córdova *et al.*, 2013), cuya unidad funcional y estructural corresponde al folículo tiroideo (Salgado *et al.*, 2011), en donde se sintetizan las hormonas T4 y T3 para ser liberadas a la circulación (De la Vieja *et al.*, 1997). La T4 es la principal hormona secretada por la tiroides y la que se encuentra en mayor concentración en sangre materna, la cual se considera una pro-hormona, ya que, por la acción de la enzima

deiodinasa 2, se origina la T3, hormona metabólicamente activa; mientras que la deiodinasa 3 la transforma a T3 reversa (T3r), hormona metabólicamente inactiva (Navarro *et al.*, 2005). Las HT están encargadas de regular distintos sistemas, tales como la regulación de la tasa metabólica basal, el desarrollo neurológico, el crecimiento óseo, la ventilación pulmonar, la frecuencia, gasto cardiaco, entre otras (Schroeder, A. C *et al.*, 2014). Estas funciones se llevan a cabo por la unión de las HT a sus receptores nucleares de HT (TR)  $\alpha$  y  $\beta$ , cuya distribución dependerá del tejido, translocándose al núcleo para activar o reprimir la transcripción de genes (Nappi A *et al.*, 2022).

Durante el curso de la gestación, las concentraciones de HT experimentan cambios fisiológicos significativos, que dan como resultado un aumento de los niveles de T4 y una disminución de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Serdán *et al.*, 2023). Estos cambios resultan del aumento de la producción placentaria de hCG, que tiene una homología estructural y actividad similar con la TSH (Patel *et al.*, 2011). El aumento de HT ocurre para suplir las necesidades del feto ya que aún no tiene desarrollada la glándula tiroidea, esta se desarrolla a partir de la semana 17 de gestación, en la cual el feto empieza a sintetizar sus propias HT, sin embargo, las HT maternas serán imprescindibles hasta el final del embarazo (Hidalgo, 2013). Las HT materna juegan un rol fundamental en la progresión del embarazo, crecimiento y en el desarrollo neurocognitivo fetal (de Escobar *et al.*, 2007). Las complicaciones fetales asociadas al hipotiroidismo durante la gestación incluyen bajo peso al nacer, parto pretérmino, síndrome de dificultad respiratoria, muerte perinatal y mal desarrollo neurocognitivo (Bernal *et al.*, 2002). De igual manera, la hipotiroxinemia materna se asocia con un mayor riesgo de parto pretérmino y daño

cerebral que abarca el retraso mental, deterioro neuroconductual y el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (Rodríguez et al., 2008). Además, se ha visto que mujeres con niveles anormales de HT presentan complicaciones del embarazo por una placentación anormal (Korevaar T *et al*, 2017). De acuerdo con esto, el transporte de HT desde la madre hacia el feto, es esencial para un correcto desarrollo fetal y placentario (Krassas GE *et al.*, 2010).

#### **4. TRANSPORTE DE HORMONAS TIROIDEAS EN PLACENTA**

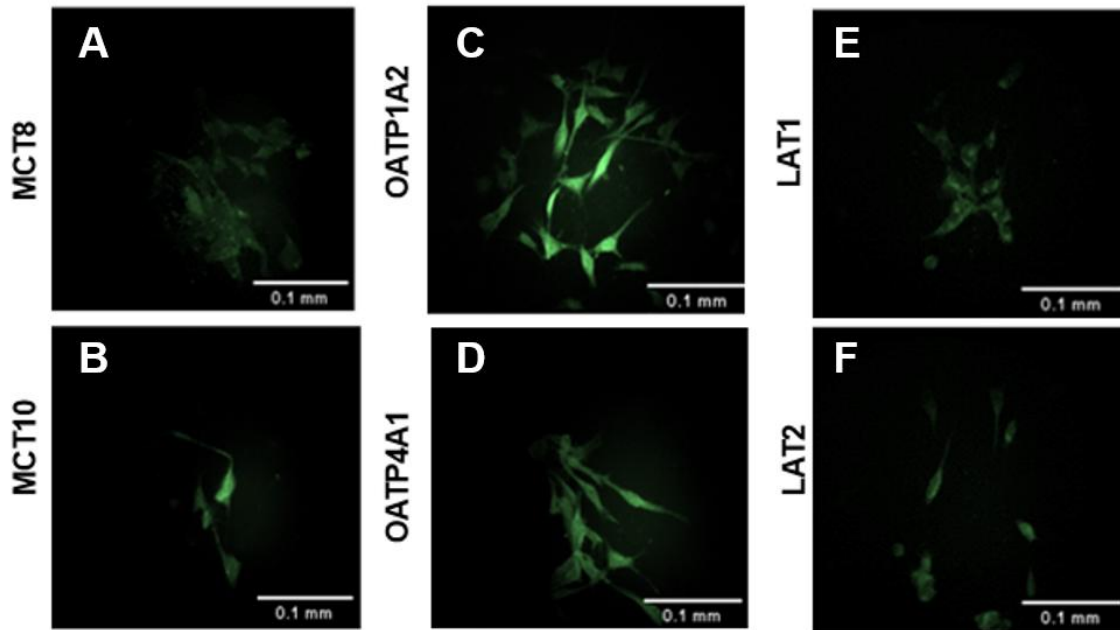
En placenta, se han descrito 3 familias de THT localizados en la membrana plasmática de los trofoblastos, que corresponden a los MCT, la familia del OATP y la familia de transportadores LAT (Krause *et al.*, 2020).

Específicamente, en trofoblastos de primer trimestre de gestación, se han identificado seis transportadores pertenecientes a estas familias, en donde encontramos a MCT8, MCT10, OATP1A2, OATP4A1, LAT1 y LAT2 presentes desde la sexta semana de gestación hasta el término del embarazo (Loubiere *et al.*, 2012). De igual manera se estudió la presencia de estos 6 transportadores en la línea celular HTR8/SVneo mediante Inmunocitoquímica, donde se pudo observar la expresión de cada uno de ellos (figura 1) (Roble et al., 2023).

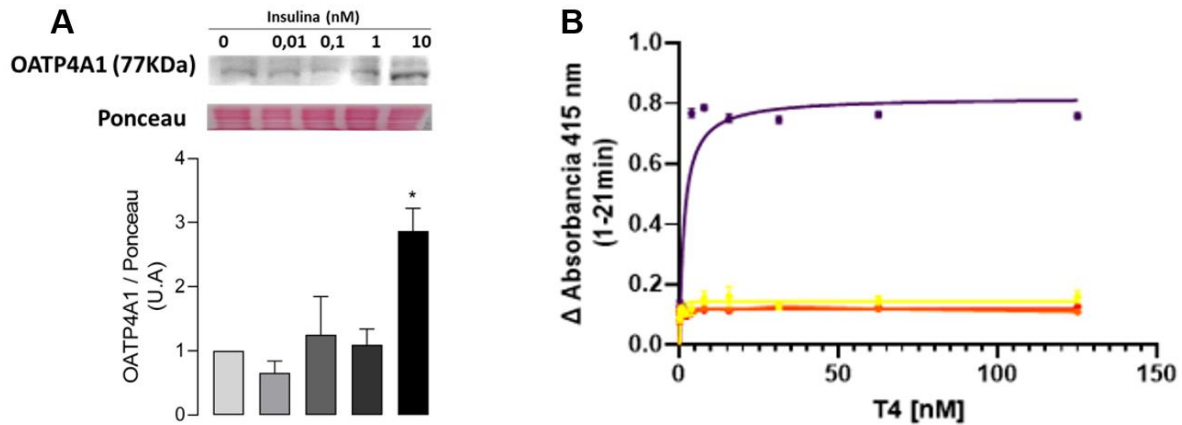
La expresión, reciclaje e internalización de estos transportadores son regulados por distintos metabolitos (de Calvo et al., 2020). Si bien, no hay suficiente literatura respecto a los transportadores, hemos observado que insulina aumenta la expresión de proteína para OATP4A1 y la actividad del transporte de T4 con una Km de

0,42nM en trofoblastos de primer trimestre de gestación (Roble *et al*, 2023) (figura 2).

En literatura no se ha descrito el transporte de T4 por estos transportadores en placenta, sin embargo, se han reportado valores de Km aparente para el transporte de T3 y T4 en otros tejidos, como se observa en la tabla 1.



**Fig.1. Expresión de transportadores de hormonas tiroideas en la línea celular HTR8/SVneo mediante Inmunocitoquímica.** A) expresión de MCT8. B) Expresión de MCT10. C) Expresión de OATP1A2. D) Expresión de OATP4A1. E) Expresión de LAT1. F) Expresión de LAT2. Obtenido desde tesis de pregrado (K. Roble 2023).



**Fig.2. Expresión de OATP4A1 y captación de T4 en presencia de insulina.** A) Expresión de proteína OATP4A1 mediante western blot en condiciones 0, 0.01, 0.1, 1 y 10 nM de insulina. B) Cinética de Michaelis-Menten de captación de T4 en HTR8/SVneo donde morado corresponde a 10 nM de insulina. \*P<0,05 estadísticamente significativo. Obtenido desde tesis de pregrado (K. Roble 2023).

**Tabla1.** Valores de Km y Vmax de los transportadores de hormonas tiroideas según su tejido.

Transportador	Km	Vmax	Tejido	Referencia
LAT1	2µM (T3)	-	Astrocitos	Blondeau, J. P et al., 1993
LAT1	0,8µM (T3)	-	JAR	Prasad, P. D et al., 1994
LAT1	1,8µM (T3) 6,3µM (T4)	-	Ovocitos Xenopus	Ritchie, J. W. A et al., 1999
MCT8	4,7µM (T4)	-	Ovocitos Xenopus	Friesema EC et al., 2003
MCT10	23µM (T4)	-	JEG-3	Bourgeois NM et al., 2016
LAT2	16,24µM (3,3'-T2)	-	Ovocitos Xenopus	Kinne A et al., 2015
OATP4A1	0,9 µM (T3)	-	Ovocitos Xenopus	Fijiwara et al., 2001
OATP1A2	8,0µM (T4)	-	Ovocitos Xenopus	Kullak-Ublick et al., 2001
OATP1B1	3,0 µM (T4)	-	Ovocitos Xenopus	Abe et al., 1999
OATP1C1	90,4nM (T4)	-	CHO	Pizzagalli et al., 2002
OATP1C1	13 nM (T4)	1,7 pmol/min/mg	HEK293	Baldeshwiler, G, 2011

T4: tiroxina, T3: triiodotironina, Vmax: velocidad máxima, Km: constante de Michaelis-Menten, LAT1: transportador de aminoácidos L tipo 1, LAT2: transportador de aminoácidos L tipo 2, MCT8: monocarboxilato 8, MCT10: monocarboxilato 10, OATP4A1: polipéptido transportador de aniones orgánicos 4A1, OATP1A2: polipéptido transportador de aniones orgánicos 1A2, OATP1B1: polipéptido transportador de aniones orgánicos 1B1, OATP1C1: polipéptido transportador de aniones orgánicos 1C1, CHO: células de ovario de hamster.

Con el fin de estudiar la función del transporte de HT en trofoblastos, se han utilizado diversos inhibidores que actúan a nivel de los THT (Mikkaichi T *et al.*, 2004), como por ejemplo silicristina que inhibe los MCT (Jörg Johannes *et al.*, 2016) o JPH203 para los LAT (Bo T *et al.*, 2021). Se ha utilizado digoxina para inhibir al transportador OATP4A1, donde a altas concentraciones (100 nM) es capaz de inhibir el transporte de T4 por OATP4A1 (Taub M *et al.*, 2011), de esta forma obtendremos el transporte total de T4 que involucra a los 6 THT descritos, el transporte no inhibible por digoxina que corresponde a los sistemas de transporte MCT y LAT, y el transporte Inhibible por digoxina que se obtiene de la resta del transporte total y la fracción no inhibible por digoxina que corresponde al transporte por OATP4A1. De acuerdo con los antecedentes, sabemos que la insulina es capaz de aumentar la expresión de OATP4A1, sin embargo, desconocemos las vías de señalización involucradas en este proceso.

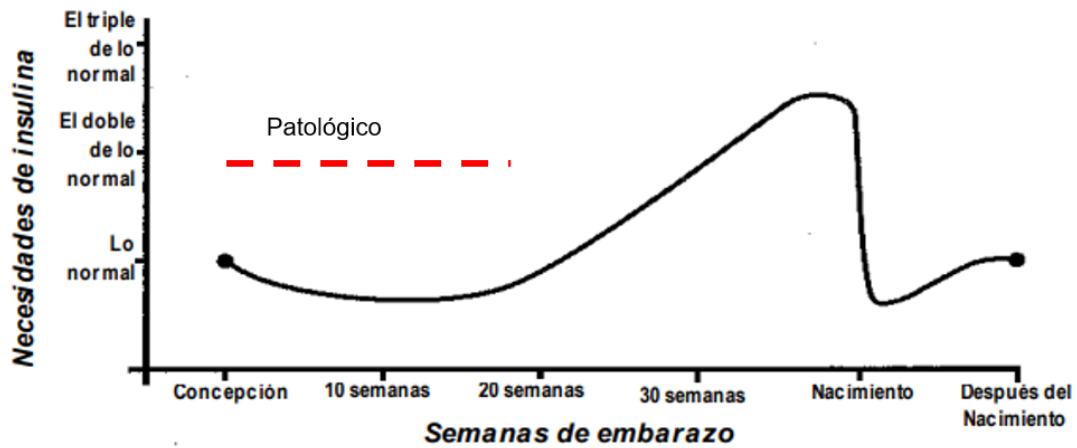
## **5. INSULINA EN EL EMBARAZO**

La insulina es una hormona anabólica secretada por las células beta del páncreas, cuya principal función es mantener la homeostasis glicémica (Carrasco *et al.*, 2013). Durante la gestación, ocurren cambios fisiológicos para para satisfacer las necesidades nutricionales de la madre y el feto (Fabiana *et al.*, 2006). Uno de estos cambios es el aumento de glucosa en ayunas y por ende un aumento de la insulina,

producido principalmente por el lactógeno placentario de manera fisiológica (Conget *et al.*, 2002), como se observa en la línea negra de la figura 3.

Por otra parte, si al comienzo del embarazo se tienen patologías como obesidad o resistencia a la insulina, generarán un estado de hiperinsulinemia patológico durante el primer trimestre de gestación (Jara *et al.*, 2016), como se observa en la línea roja punteada de la figura 3.

La hiperinsulinemia resultante es capaz de modificar la expresión del transportador OATP4A1 aumentando el nivel de proteína (Roble *et al.*, 2023) como mecanismo compensatorio frente a las condiciones patológicas, evitando así alteraciones en el desarrollo fetal. Con el objetivo de estudiar los efectos de insulina en condiciones patológicas sobre la línea celular HTR8/SVneo, se ha observado que a una concentración de 10 nM (suprafisiológico) imita un ambiente de hiperinsulinemia (Aghanoori *et al.*, 2017) generando cambios significativos en la expresión de proteínas de OATP4A1 (Roble *et al.*, 2023).



**Fig. 3. Niveles de insulina fisiológico y patológico durante las semanas de gestación.** Adaptado de Reader D *et al.*, 2012. Línea negra: nivel de insulina fisiológico; Línea roja punteada: nivel de insulina patológico

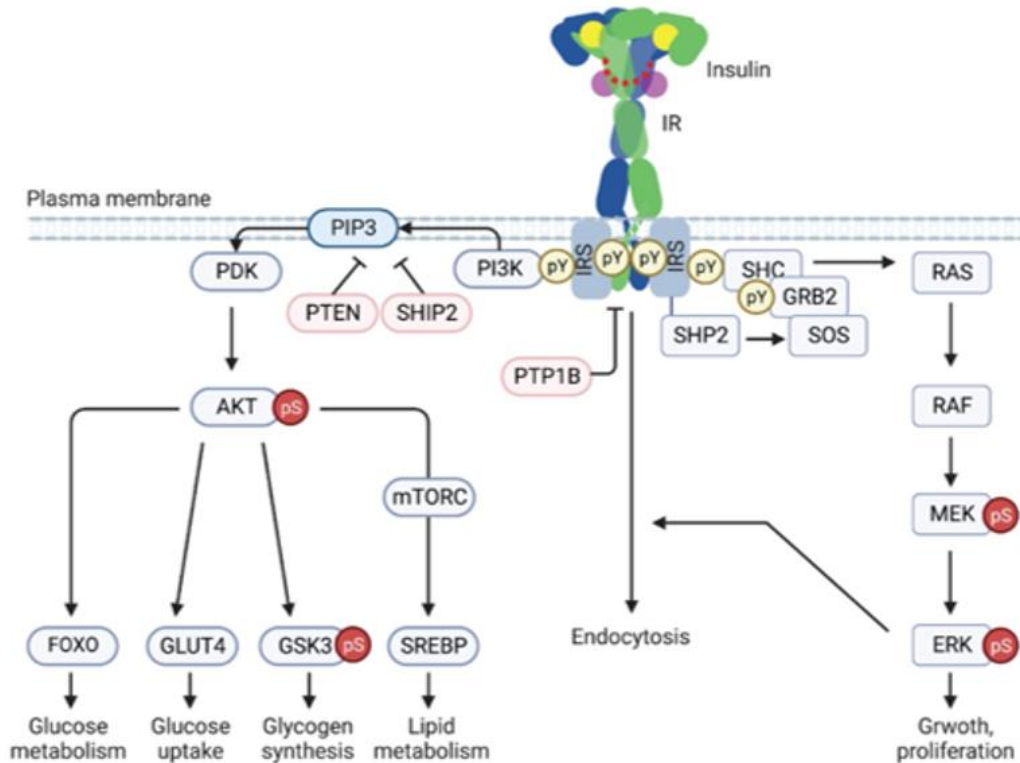
## 6. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA

La acción de la insulina sobre los THT se da mediante la unión al receptor de insulina (IR) de membrana, donde ocurre una autofosforilación activando dos vías de señalización principales que corresponden a la vía de PI3K-AKT y la vía de MAPK como se observa en la figura 4 (Lee *et al*, 1994). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos (Bastarrachea *et al.*, 2005).

En literatura, se describen 2 isoformas del receptor de insulina, IR-A e IR-B, los cuales se diferencian por la falta del exón 11 en IR-A (Mosthaf., *et al* 1990). La isoforma A se expresa predominantemente en la vida prenatal y se sobreexpresa en neoplasias malignas, mientras que la isoforma B se expresa en los tejidos con efectos metabólicos (Frasca., *et al* 1999). Si bien ambas isoformas se activan por insulina, IR-A también se puede activar por el factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1) y proinsulina (Belfiore A., *et al* 2017). Cada isoforma activa una vía de señalización según el rol que ejercen en la célula, por ejemplo, para el caso de IR-B se sabe que está involucrado en la regulación metabólica, lo cual se asocia a la vía PI3K/AKT, mientras que IR-A favorece el crecimiento celular por lo que estaría asociada a la vía de MAPK (Malaguarnera., *et al* 2022). En condiciones suprafisiológicas de insulina (10 nM), ambas isoformas pueden ser activadas, sin embargo, también pueden activar al receptor de IGF-1 (IGF-IR 1) y receptores híbridos de insulina/IGF-1 (Li., *et al* 2005). Estas isoformas poseen distintas constantes de afinidad por insulina, en donde para IR-A es de 0.88nM, para IR-B

0,83nM y para los receptores híbridos IGFR1-IRA 25,4nM e IGFR1-IRB 59,6 nM (Westermeier, F *et al.*, 2016). Adicionalmente, los trofoblastos al ser tejido embrionario y estar relacionado con el desarrollo fetal, expresarían en mayor cantidad la isoforma A por sobre IR-B ( Belfiore., et al 2009). Esto podría sugerir que la vía MAPK estaría activada durante la gestación, la cual está asociada a proliferación y crecimiento celular (Malaguarnera., *et al* 2022).

Para el estudio de las funciones de las vías de señalización de insulina, se han utilizado diferentes inhibidores específicos, como PD98059 (2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona) que inhibe de manera reversible a la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) (Dudley, D. T *et al.*, 1995; Genovese, T *et al.*, 2008) y el inhibidor de AKT IV que actúa inhibiendo específicamente la actividad de la proteína quinasa AKT mediante la unión competitiva al sitio de unión al ATP de AKT, impidiendo su fosforilación y posterior activación (Dunn EF *et al.*, 2009). La activación de estas vías involucra la participación de numerosas proteínas donde desconocemos cuál de ellas está involucrada en la regulación de OATP4A1 mediante insulina, sin embargo, de acuerdo con lo indicado en literatura posiblemente IR-A a través de MAPK aumentaría la expresión y actividad de OATP4A1.



**Fig. 4. Vías de señalización de insulina PI3K/AKT y MAPK/ERK.** Adaptado de Chang, L *et al.*, 2001. PIP3: Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato, PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa, PDK: Quinasa de proteínas 1 dependiente de fosfoinosítidos-3, PTEN: Fosfatasa homóloga a tensina, SHIP2: Fosfatasa de inositol 5 que contiene un dominio SH2, AKT: proteína quinasa B, FOXO, GLUT4, GSK3, SREBP: factores de transcripción, SHC: Proteína transformante que contiene un dominio homólogo a Src tipo 2, SHP2: Fosfatasa 2 que contiene dominios SH2, GRB2: Proteína 2 unida al receptor de factor de crecimiento, SOS: proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina, RAS: proteína de tipo GTPasa, RAF: quinasa serina/treonina activada por la proteína Ras, MEK: Quinasa de quinasa activada por mitógenos, ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares.

## **7. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

Condiciones supra fisiológicas de insulina aumenta la expresión y actividad del transportador de hormonas tiroideas OATP4A1 en células de trofoblasto humano HTR8/SVneo, sin embargo, se desconoce cuál sería la participación de MAPK y AKT en este efecto.

## **8. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la participación de MAPK y AKT en el aumento de la expresión y actividad de OATP4A1 en trofoblasto humanos de primer trimestre (HTR8/Svneo) por insulina?

## **9. HIPÓTESIS**

MAPK, no así AKT, participa en el aumento de la expresión y actividad del transportador de hormonas tiroideas OATP4A1 en células de trofoblasto humano HTR8/SVneo por insulina.

## **10. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación de MAPK y AKT en el aumento de la expresión y actividad de OATP4A1 en la línea celular HTR8/SVneo por insulina.

## **11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar los niveles de mRNA y proteína para OATP4A1 en la línea de trofoblastos HTR8/SVneo estimulado con insulina.
- Determinar la actividad de transporte de T4 por OATP4A1 en la línea de trofoblastos HTR8/SVneo estimulado con insulina.
- Determinar si la expresión (ARNm y proteína) y actividad de OATP4A1, depende de la participación de AKT y MAPK en la línea de trofoblastos HTR8/SVneo estimulado con insulina.

## **12. METODOLOGÍA**

### **12.1 Diseño del estudio**

Se realizó un estudio de tipo observacional descriptivo.

### **12.2 Bioseguridad**

Debido al uso de muestras biológicas para esta investigación, se tomaron las medidas de bioseguridad necesarias para evitar cualquier accidente y contaminación, siguiendo el protocolo que entrega MATPEL para el manejo de accidentes con material de riesgo biológico de la Universidad de Concepción. Los procedimientos realizados en el laboratorio se llevaron a cabo con elementos de protección personal (delantal y guantes). Los materiales ocupados fueron inactivados con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y desechados en los contenedores correspondientes, bajo las normas que estipula el Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Universidad de Concepción.

### **12.3 Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular de trofoblastos de primer trimestre HTR8/SVneo (pasaje 15), la cual fue donada por el profesor Jaime Gutiérrez de la Universidad San Sebastián, Santiago. Se incubaron a 37°C en medio de cultivo RPMI 1640 (US Biological, Life Sciences), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (HyClone™ Laboratories, GE Healthcare Life Sciences) y antibióticos penicilina/estreptomicina (1% v/v), hasta alcanzar una confluencia del 80% en placas de cultivo (SPL Life Sciences Co, Ltd, 90x20mm).

## **12.4 Condiciones de cultivo**

Una vez alcanzada la confluencia del 80% en la línea celular HTR8/SVneo, se realizó una deprivación de suero durante 6 horas. Posteriormente, se incubaron las células con 6 condiciones: control (sin estímulo), insulina 10 nM (Basaglar ®, KwikPen 100U/mL), insulina más PD98059 (inhibidor de la vía de MAPK, 10uM), insulina más inhibidor AKT IV (inhibidor de la vía de AKT, 10nM), solo PD98059 y solo inhibidor de AKT IV. Para ello, los inhibidores se incubaron por 1 hora en medio RPMI1640 suplementado con 10% SFB, y posteriormente se condicionó con insulina 10 nM durante 24 horas.

## **12.5 Expresión de ARN mensajero de OATP4A1 en la línea celular HTR8/SVNEO**

### **12.5.1 Extracción de ARNm mediante Trizol**

La extracción de RNA se realizó por el método de Trizol ® (Reagent Ambion by Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, el homogenizado de células con Trizol, se les añadió Cloroformo, para luego centrifugar y obtener la fase acuosa. El RNA fue precipitado con Isopropanol, y lavado con etanol al 75% y agua libre de nucleasas. Las muestras obtenidas se guardaron a -80°C. Luego, la cuantificación se realizó en el lector de placa (Synergy 2 BioTek Plate Reader) a 260/280.

### 12.5.2 Transcripción reversa

La transcripción reversa se realizó utilizando el kit Promega Go Script™ Reverse transcription system (Madison WI USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada reacción se utilizó 500 ng de RNA. Los cDNAs fueron almacenados a -20°C.

### 12.5.3 qPCR

El qPCR fue realizado con el reactivo Evagreen Master Mix (HOTFIRE EvaGreen qPCR 5X, Solis BioDyne). Como gen de referencia se utilizaron partidores para 28S ribosomal (AS 5'-ACATTGTTCCAACATGCCA-3' ; S 5'-TTGAAAATCCGGGGGAGAG-3'); y como gen objetivo OATP4A1 (S 5'-CTGGAGCTGGCTATCTGTGG-3', AS 5'-GTACAAGGTGCTGGGCGT-3'). Posteriormente, las muestras fueron amplificadas en el equipo ABI7500 fast qPCR. El control negativo de PCR se realizó con agua libre de nucleasas en reemplazo de la muestra.

La eficiencia del qPCR se determinó mediante la curva estándar de diluciones seriadas (1:10-1:1000) de las muestras, en donde se graficó el Cq en función del logaritmo de la concentración del ADN. El cálculo se obtuvo a partir de la pendiente, obteniendo una eficiencia un 96% para el gen de referencia 28S ribosomal y 93% para el gen objetivo OATP4A1. Las veces de cambios en la expresión relativa, fueron obtenidos utilizando la fórmula de Livak ( $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ).

## **12.6 Expresión de proteínas por Inmunocitoquímica**

Se incubaron 100.000 células de trofoblastos HTR8/SVneo por pocillos en una placa de 24 pocillos con cubreobjetos redondos (12mm) durante 24 horas. Posteriormente se incubaron con las respectivas condiciones. Brevemente, las células fueron fijadas con Paraformaldehído 4% fresco en PBS1X, y bloqueadas con albumina de bovino (BSA) al 2% (Prometheus™, Protein Biology Products) durante 2 horas. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-OATP4A1 (SLCO4A1 Polyclonal Antibody, Invitrogen) en una dilución 1:100 en cámara húmeda 4°C. Luego, se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific) en una dilución 1:100 en cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron montadas en medio de montaje (ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen). Las muestras fueron visualizadas mediante microscopía confocal espectral (LSM 780 NILO, Zeiss) en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) de la Universidad de Concepción y analizadas posteriormente en el programa ImageJ obteniendo la intensidad de fluorescencia media (MFI).

## **12.7 Determinación de actividad de transporte de T4 en células HTR8/Svneo**

### **12.7.1 Ensayo de captación**

Se incubaron 20.000 células de trofoblasto HTR8/SVneo por pocillo en una placa de 48 pocillos durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se incubaron con las

respectivas condiciones. El ensayo de captación se realizó en presencia de L-tiroxina (T4, 0-1000 nM, 37°C, 15 min) (MP Biomedicals, LLC), y en ausencia y presencia de digoxina (100nM). Luego, la captación fue detenida usando PBS 1X frío, y las placas fueron almacenadas a -20°C.

La determinación de la concentración de T4 captada por los trofoblastos se realizó de manera indirecta mediante la reacción de Sandell-Kolthoff (Bílek et al., 2005). La liberación de yoduro se inició con una digestión oxidativa de persulfato de amonio (0.68M) por pocillo incubado a 90°C por 1 hora. Para la detección, se utilizó 50 µL de muestra, luego se añadió 50 µL de solución cérica ((NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub> 25 mM y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M) y 50 µL de solución arseniosa (25 mM NaAsO, 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,2 M NaCl) por pocillo. Inmediatamente, se cuantificó la absorbancia en el lector de microplacas Sinergy 2 de Biotek a 415 nm (25°C).

La cuantificación relativa fue calculada mediante la diferencia de las absorbancias en el punto inicial y después de 5 minutos. Adicionalmente, se realizó una curva de calibrado con concentraciones crecientes de T4 (0-1000nM, 37°C, 15 minutos) graficadas en relación con la absorbancia obtenida, permitiéndonos expresar los datos de captación como la presencia de T4 nmol/L/15minutos intracelular captado a través del ensayo.

La captación de T4 en ausencia de digoxina corresponde a la captación total de T4, mientras que la captación en presencia de digoxina corresponde a la fracción no inhibible. De la diferencia de la captación total con la fracción no inhibible, se obtiene la fracción inhibible por digoxina, la cual nosotros asociamos al transporte de T4 por OATP4A1.

### **12.7.2 Determinación de parámetros cinéticos**

Los datos obtenidos de la captación de T4 fueron ajustados a la curva de Michaelis-Menten y posteriormente transformados por la transformación de Eadie-hofstee, obteniendo así los parámetros de  $K_m$  y  $V_{max}$  utilizando el Software GraphPad Prism 9. La capacidad o eficiencia de transporte de T4 se expresó mediante  $V_{max} / K_m$ . (Braun *et al.*, 2012).

### **12.8 Análisis estadísticos**

Los resultados experimentales fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. La distribución normal de los datos fue evaluada con el Test de Shapiro-Wilk. La comparación de promedios fue realizada con el test de comparación no pareado según corresponda (Test T, o Test de Mann-Whitney). En comparaciones de grupos se utilizó ANOVA o Test de Kruskal-Wallis, según corresponda. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo, utilizando el software GraphPad Prism 9.

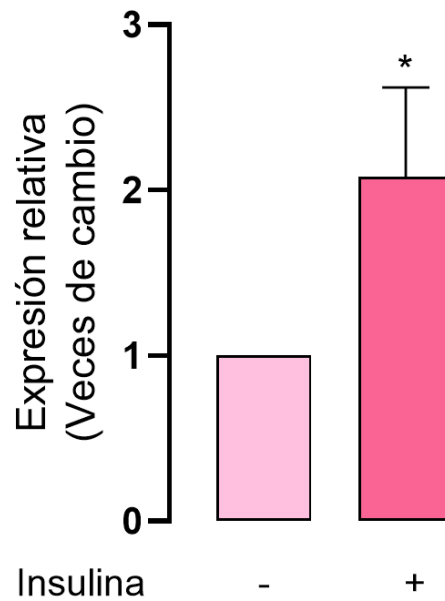
## 13.RESULTADOS

### 13.1 Niveles de OATP4A1 por insulina

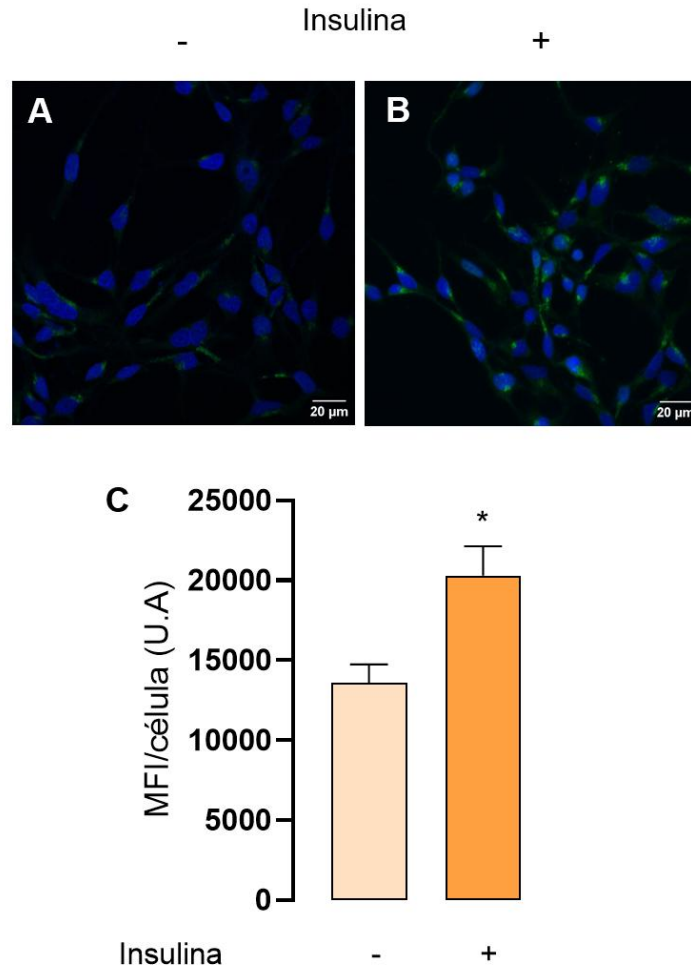
La expresión del transportador de HT OATP4A1 por insulina 10 nM se realizó mediante técnicas de RT-qPCR e Inmunocitoquímica en células de trofoblasto HTR8/SVneo como se observa en la figura 5 y 6 respectivamente.

En la figura 5, se observa un aumento (~2 veces,  $p < 0,05$ ) de la expresión de ARNm de OATP4A1 en condiciones de insulina 10 nM.

En la figura 6A y 6B se observan las inmunocitoquímicas en las condiciones de control e insulina respectivamente con aumento 40x. En la figura 6C se observa la intensidad de fluorescencia media, la cual muestra un aumento (~1,5 veces,  $p < 0,05$ ) de la expresión de proteína de OATP4A1 en condiciones de insulina 10nM.



**Fig.5. Niveles de ARNm de OATP4A1 en ausencia y presencia de insulina en células HTR8/SVneo.** RT-qPCR para el gen objetivo OATP4A1 y gen de referencia 28S en condiciones de control e insulina (10nM, 24hrs). La cuantificación se realizó mediante la fórmula de Livak  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  expresado en veces de cambio (OATP4A1/28S). \* $p < 0,05$  estadísticamente significativo,  $n=6$ .



**Fig. 6. Niveles de proteína de OATP4A1 en ausencia y presencia de insulina en células HTR8/SVneo.** Se realizó inmunocitoquímica para OATP4A1 en condiciones de control e insulina observadas en microscopio confocal LSM780 en un aumento 40x. A) Inmunocitoquímica de OATP4A1 en ausencia de insulina. B) Inmunocitoquímica de OATP4A1 en presencia de insulina (10nM, 24hrs). C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (MFI/célula) en condiciones de control e insulina (10nM, 24hrs). \* $p < 0,05$  estadísticamente significativo,  $n=3$ .

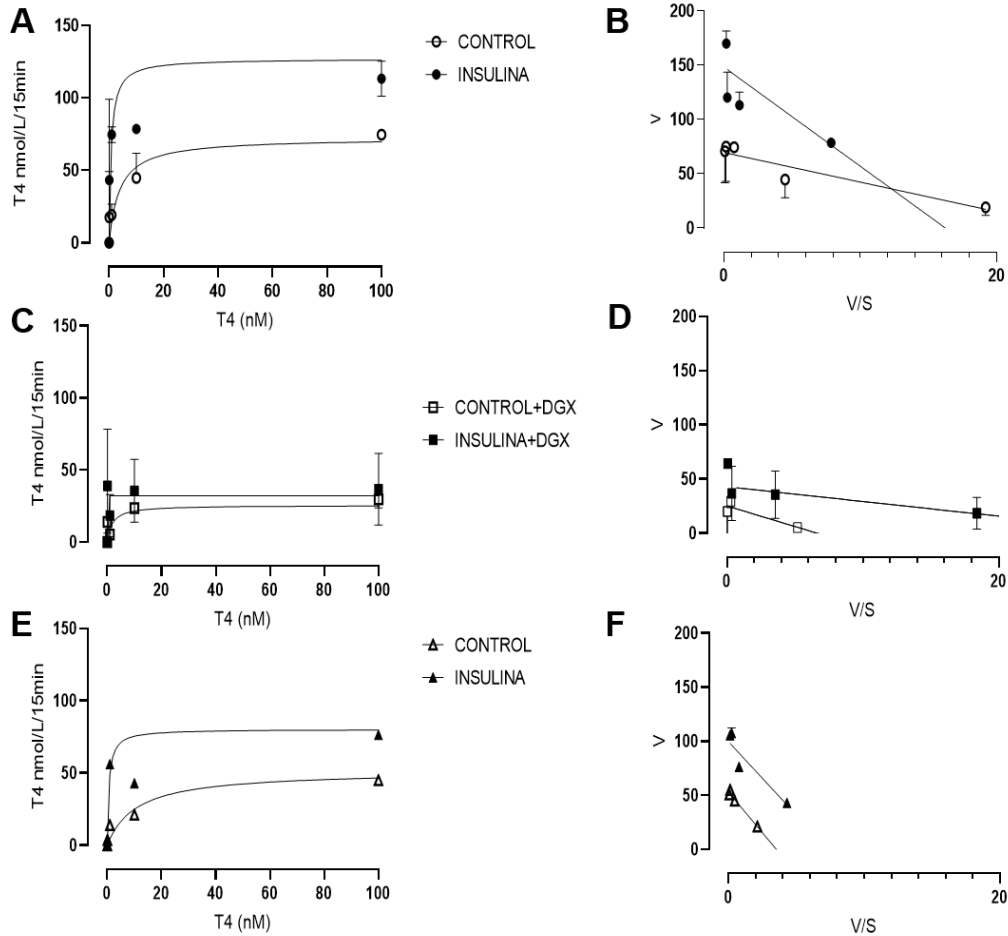
### 13.2 Efecto de insulina en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1

El efecto de insulina (10nM, 24hrs) en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1 en células HTR8/SVneo se realizó mediante la técnica de captación de T4 (0-1000nM, 37°C, 15 minutos) en ausencia y presencia de Digoxina (100nM) como inhibidor de OATP4A1. Se cuantificó el yoduro de T4 captado por los trofoblastos mediante la técnica de oxidación-reducción de Sandell-Kolthoff, ajustando la curva a la cinética de Michaelis-Menten, a las cuales se le aplicó la transformación de Eadie-Hofstee obteniendo así los parámetros de  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}/K_m$ . (Fig. 7 y tabla 2).

En la figura 7A y 7B, se observa la captación total de T4 en condiciones de control e insulina. La  $V_{max}$  y  $K_m$  aumentan (~2 y ~3,5 veces,  $p < 0,05$ , respectivamente) con insulina respecto a su control, mientras que la  $V_{max}/K_m$  disminuye (~40%,  $p < 0,05$ ), como se observa en la tabla 2.

En la figura 7C y 7D, se observa la captación de T4 no Inhibible por digoxina en condiciones de control e insulina. La  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  aumentan (~1,5 y ~6,5 veces,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a su control, mientras que la  $K_m$  disminuye (~60%,  $p < 0,05$ ). Si comparamos los parámetros de la fracción no Inhibible por digoxina con la captación total de T4 podemos observar que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyen (~60% y ~80%,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a la captación total, mientras que la  $K_m$  aumenta (~1,4 veces,  $p < 0,05$ ). Por otra parte, la fracción no Inhibible por digoxina en presencia de insulina mostró que su  $V_{max}$  y  $K_m$  disminuyen (~70% y ~80%,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a la insulina en la captación total, mientras que  $V_{max}/K_m$  aumenta (~2 veces,  $p < 0,05$ ), como se observa en la tabla 2.

En la figura 7E y 7F, se observa la captación de T4 para la fracción Inhibible por digoxina en condiciones de control e insulina. La  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  aumentan ( $\sim 2$  veces para ambos,  $p < 0,05$ ) respecto a su control, mientras que la  $K_m$  no mostró cambios significativos. Si comparamos los parámetros de la fracción Inhibible por digoxina con la captación total de T4 podemos observar que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyen ( $\sim 20\%$  y  $\sim 80\%$ ,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a la captación total, mientras que la  $K_m$  aumenta ( $\sim 5,5$  veces,  $p < 0,05$ ). Por otra parte, la fracción Inhibible por digoxina en presencia de insulina mostró que su  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyen ( $\sim 30\%$  y  $\sim 50\%$ ,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a la insulina de la captación total, mientras que la  $K_m$  aumenta ( $\sim 1,5$  veces,  $p < 0,05$ ), como se observa en la tabla 2.



**Fig. 7. Efecto de insulina en la captación total, en la fracción no Inhibible por digoxina y en la fracción Inhibible por digoxina de T4 en células HTR8/SVneo.**

El efecto de insulina en la actividad de transporte de T4 en células HTR8/SVneo se realizó mediante la técnica de captación (0-1000nM, 37°C, 15minutos) en ausencia y presencia de Digoxina (DGX, 100nM) como inhibidor de OATP4A1, obteniendo las gráficas de cinética de Michaelis-Menten (A,C,E) y la transformación de Eadie-Hofstee (B,D,F). A y B Muestran la Captación total de T4 en condiciones de control e insulina (10nM, 24hrs). C y D Muestran la captación de T4 de la fracción no Inhibible por digoxina. E y F Muestran la captación de T4 de la fracción Inhibible por digoxina.

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos del transporte de T4 en ausencia y presencia de insulina y digoxina.

<b>Captación total T4</b>	<b><math>V_{max}</math> (T4nmol/L/min)</b>	<b><math>K_m</math> (nM)</b>	<b><math>V_{max}/K_m</math> (T4nmol/L/min/nM)</b>
Control	69,60± 4,42	2,73± 0,42	25,5± 5,5
Insulina	148,30± 6,25*	9,13± 1,37*	16,2± 3,1*
<b>No Inhibible por DGX</b>	<b><math>V_{max}</math> T4nmol/L/min</b>	<b><math>K_m</math> nM</b>	<b><math>V_{max}/K_m</math></b>
Control	25,27± 5,45 <sup>α</sup>	3,8± 1,81 <sup>α</sup>	4,9± 7,1 <sup>α</sup>
Insulina	42,91± 6,18 <sup>*β</sup>	1,36± 0,56 <sup>*β</sup>	31,6± 17,5 <sup>*β</sup>
<b>Inhibible por DGX</b>	<b><math>V_{max}</math> T4nmol/L/min</b>	<b><math>K_m</math> nM</b>	<b><math>V_{max}/K_m</math></b>
Control	52,83± 0,41 <sup>α</sup>	14,98± 0,33 <sup>α</sup>	3,5± 0,1 <sup>α</sup>
Insulina	99,52± 2,02 <sup>*β</sup>	13,52± 0,79 <sup>β</sup>	7,4± 0,6 <sup>*β</sup>

T4: tiroxina,  $V_{max}$ : velocidad máxima,  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten,  $V_{max}/K_m$ : capacidad de transporte, DGX: digoxina. \*  $p < 0,05$  respecto a su control,  $\alpha$   $p < 0,05$  respecto al control de captación total de T4,  $\beta$   $p < 0,05$  respecto a insulina de captación total de T4.

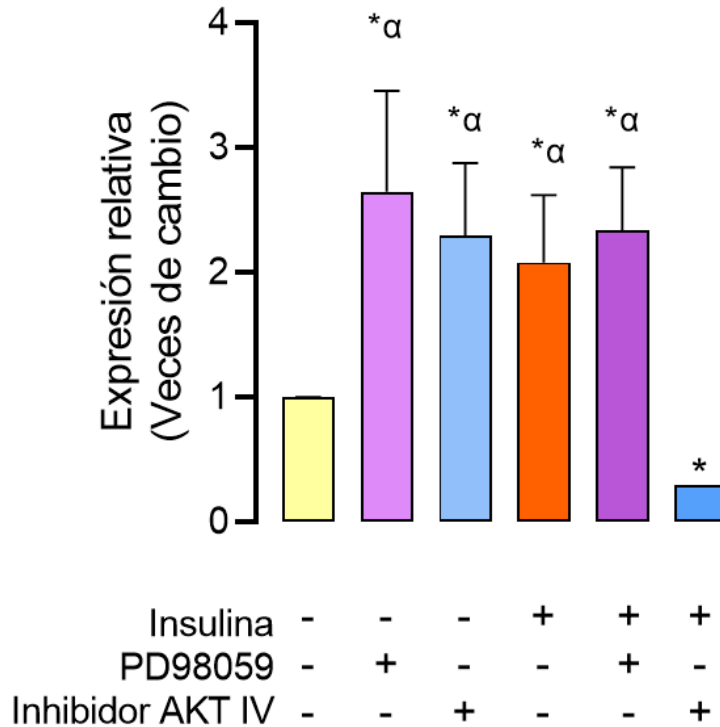
### **13.3 Efecto de los inhibidores de la vía MAPK y AKT sobre los niveles de ARNm y proteína de OATP4A1 por insulina**

Los niveles del THT OATP4A1 por insulina (10 nM, 24hrs), PD98059 (10  $\mu$ M, 1hr) e inhibidor de AKT IV (10 nM, 1hr) se realizó mediante las técnicas de RT-qPCR e Inmunocitoquímica respectivamente, en células de trofoblasto HTR8/SVneo como se observa en la figura 8 y 9, respectivamente.

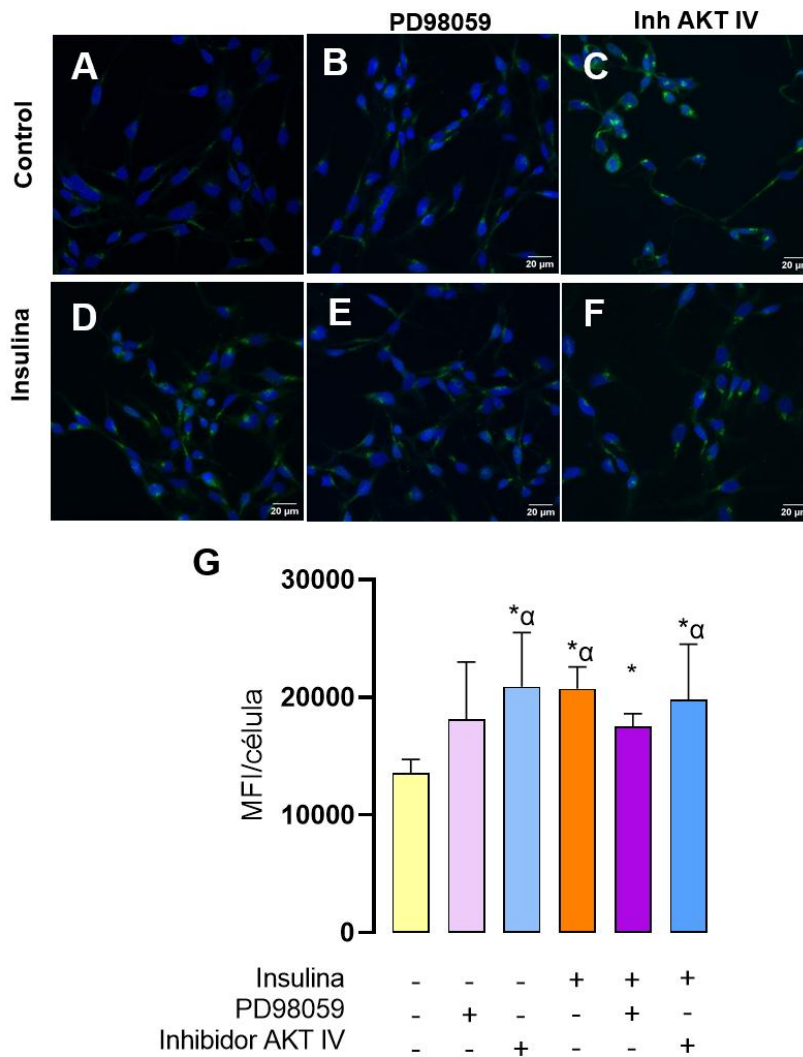
En la figura 8, las células al incubarse con PD98059 e inhibidor de AKT IV se observa un aumento ( $\sim 2,7$  y  $\sim 2,3$  veces,  $p < 0,05$  respectivamente) de la expresión de ARNm de OATP4A1. Las células al incubarse con insulina en ausencia y presencia de PD98059 mostró un aumento de los niveles de ARNm ( $\sim 2,1$  y  $\sim 2,3$  veces,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto al control. Sin embargo, al incubar con insulina en presencia del inhibidor de AKT IV se observó una disminución del 70% respecto al control y un 86% con respecto a insulina.

En la figura 9 se observan las inmunocitoquímicas en condiciones de control (A-C) e insulina (10nM, 24hrs) (D-F) en ausencia (A y D) y presencia de PD98059 (10  $\mu$ M) (B y E) e inhibidor AKT IV (10nM) (C y F) con aumento 40x. En la figura 9G se observa la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media, la cual muestra que al incubarse con PD98059 e inhibidor de AKT aumenta ( $\sim 1,3$  y  $\sim 1,6$  veces,  $p < 0,05$  respectivamente) la expresión de proteína de OATP4A1. Las células al incubarse con insulina en ausencia y presencia de inhibidor de AKT IV mostró un aumento de los niveles de proteína ( $\sim 1,5$  y  $\sim 1,4$  veces,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto al control. Sin embargo, al incubar con insulina en presencia de PD98059

se observó un aumento de 1,3 veces respecto al control, pero una disminución del 20 % con respecto a insulina.



**Fig. 8. Niveles de ARNm de OATP4A1 en ausencia y presencia de insulina, PD98059 e inhibidor de AKT IV en células HTR8/SVneo.** RT-qPCR para el gen objetivo de OATP4A1 y el gen referencia 28S en condiciones de control e insulina (10 nM) en ausencia y presencia de PD98059 (10μM) e inhibidor AKT IV (10nM). La cuantificación se realizó mediante la fórmula de Livak  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  expresado en veces de cambio (OATP4A1/28S) \*p<0,05 respecto al control, α p<0,05 respecto a insulina en presencia del inhibidor de AKT IV , n=6.



**Fig. 9. Niveles de proteínas de OATP4A1 en ausencia y presencia de insulina, PD98059 e inhibidor de AKT IV en células HTR8/SVneo.** Se realizó inmunocitoquímica para OATP4A1 en condiciones de control (A-C) e insulina (D-F) en ausencia (A y D) y presencia de PD98059 (10 $\mu$ M) (B y E) e inhibidor AKT IV (10nM) (C y F) observadas en microscopio confocal LSM780 en aumento 40x. G) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (MFI/célula) en las condiciones mencionadas. \* $p < 0,05$  respecto a control,  $\alpha p < 0,05$  respecto a insulina en presencia de PD98059,  $n=3$ .

### **13.4 Efecto de PD98059 en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1 en presencia de insulina**

El efecto de insulina (10nM, 24hrs) y PD98059 (10 $\mu$ M, 1hr) en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1 en células HTR8/SVneo se realizó mediante la técnica de captación (0-1000nM, 37°C, 15minutos) en ausencia y presencia de Digoxina (100nM) como inhibidor de OATP4A1. Luego, se cuantificó como se mencionó anteriormente, ajustando la curva a la cinética de Michaelis-Menten, a las cuales se le aplicó la transformación de Eadie-Hofstee obteniendo así los parámetros de  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}/K_m$  (Fig. 10 y tabla 3).

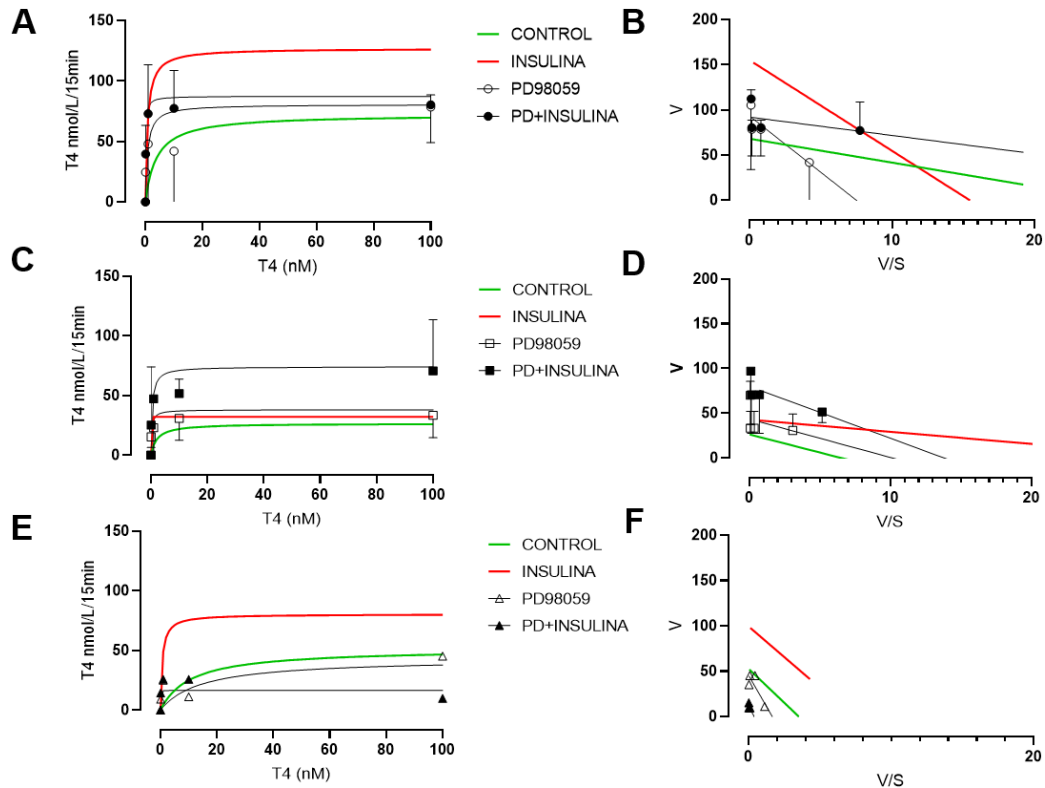
En la figura 10A y 10B, se observa la captación total de T4 en condiciones de control e insulina en ausencia y presencia de PD98059. Las células al incubarlas con PD98059 se observó que la  $V_{max}$  y  $K_m$  aumentaron (~1,3 y ~5 veces,  $p<0,05$  respectivamente) respecto a la captación total de T4, mientras que la  $V_{max}/K_m$  disminuyó (~70%,  $p<0,05$ ). Luego, las células incubadas con insulina en presencia de PD98059 se observó que la  $V_{max}$  y  $K_m$  disminuyeron (~40% y ~70%,  $p<0,05$  respectivamente) respecto a la insulina de la captación total, mientras que la  $V_{max}/K_m$  aumentó (~3 veces,  $p<0,05$ ), como se observa en la tabla 3.

En la figura 10C y 10D, se observa la captación de T4 en condiciones de control e insulina en ausencia y presencia de PD98059 por la fracción no Inhibible por digoxina. Las células al incubarlas con PD98059 se observó que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  aumentan (~1,7 y ~2 veces,  $p<0,05$  respectivamente) respecto a su control, mientras que la  $K_m$  no mostró cambios significativos. Luego, al incubar las células con insulina en presencia de PD98059 se observó que la  $V_{max}$  y  $K_m$  aumentaron

(~1,9 y ~4,3 veces,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a insulina, mientras que  $V_{max}/K_m$  disminuyó (~50%,  $p < 0,05$ ). Por otra parte, si comparamos los parámetros de la fracción no Inhibible por digoxina respecto a la captación total de T4, las células con PD98059 mostraron que la  $V_{max}$  y  $K_m$  disminuyeron (~50% y ~60%,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a PD98059 de la captación total de T4, mientras que la  $V_{max}/K_m$  no cambió significativamente. Luego, las células incubadas con insulina en presencia de PD98059, se observó que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyeron (~10% y ~70%,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a la misma condición, mientras que la  $K_m$  aumentó (~3 veces,  $p < 0,05$ ), como se observa en la tabla 3.

En la figura 10E y 10F, se observa la captación de T4 en condiciones de control e insulina en ausencia y presencia de PD98059 por la fracción Inhibible por digoxina (OATP4A1). Las células al incubarlas con PD98059 se observó que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyeron (~10% y ~50%,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a su control, mientras que la  $K_m$  aumentó (~1,9 veces,  $p < 0,05$ ). Luego, al incubar las células con insulina en presencia de PD98059 se observó que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyeron (~80% y ~90%,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a insulina, mientras que la  $K_m$  también aumentó (~2,5 veces,  $p < 0,05$ ). Finalmente, si comparamos los parámetros de la fracción Inhibible por digoxina respecto a la captación total de T4, las células con PD98059 mostraron que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyeron (~50% y ~80%,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a PD98059 de la captación total de T4, mientras que la  $K_m$  aumentó (~2,2 veces,  $p < 0,05$ ). Luego, las células incubadas con insulina en presencia de PD98059 se observó que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyeron

(~80% y ~99%,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a la misma condición, mientras que la  $K_m$  aumentó (~17 veces,  $p < 0,05$ ), como se observa en la tabla 3.



**Fig. 10. Efecto de insulina y PD98059 en la captación total de T4, en la fracción no Inhibible por digoxina y en la fracción Inhibible por digoxina en células HTR8/SVneo.** El efecto de insulina y PD98059 en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1 en células HTR8/SVneo se realizó mediante la técnica de captación (0-1000nM, 37°C, 15minutos) en ausencia y presencia de Digoxina (DGX, 100nM) como inhibidor de OATP4A1, obteniendo las gráficas de cinética de Michaelis-Menten (A,C,E) y la transformación de Eadie-Hofstee (B,D,F). A y B Muestran la captación total de T4 en condiciones de control e insulina (10nM, 24hrs) en ausencia y presencia de PD98059 (10µM). C y D Muestran la captación de T4 de la fracción no Inhibible por digoxina en ausencia y presencia de PD98059. E y F Muestra la captación de T4 de la fracción Inhibible por digoxina en ausencia y presencia de PD98059.

**Tabla 3.** Parámetros cinéticos del transporte de T4 en ausencia y presencia de insulina, PD98059 y digoxina.

<b>Captación total T4</b>	<b><math>V_{max}</math> T4 (nmol/L/15min)</b>	<b><math>K_m</math> (nM)</b>	<b><math>V_{max}/K_m</math> (T4nmol/L/min/nM)</b>
Control	69,62± 4,42	2,73± 0,42	25,5± 5,5
Insulina	148,30± 6,25*	9,13± 1,37*	16,2± 3,1*
PD98059	93,24± 18,00*	12,43± 8,68*	7,50± 6,70*
PD+insulina	92,12± 6,41#	2,030± 1,65#	45,40± 40,00#
<b>No Inhibible por DGX</b>	<b><math>V_{max}</math> T4 nmol/L/15min</b>	<b><math>K_m</math> nM</b>	<b><math>V_{max}/K_m</math></b>
Control	25,27± 5,45	3,8± 1,81	4,9± 7,1
Insulina	42,91± 6,18*	1,36± 0,56*	31,6± 17,5*
PD98059	43,55± 7,95* <sup>α</sup>	4,29± 4,14 <sup>α</sup>	10,2± 11,6*
PD+insulina	80,05± 13,76 <sup>#β</sup>	5,80± 6,67 <sup>#β</sup>	13,8± 18,2 <sup>#β</sup>
<b>Inhibible por DGX</b>	<b><math>V_{max}</math> T4 nmol/L/15min</b>	<b><math>K_m</math> nM</b>	<b><math>V_{max}/K_m</math></b>
Control	52,83± 0,41	14,98± 0,33	3,5± 0,1
Insulina	99,52± 2,02*	13,52± 0,79	7,4± 0,6*
PD98059	45,57± 2,11* <sup>α</sup>	27,40± 3,22* <sup>α</sup>	1,7± 0,3* <sup>α</sup>
PD+insulina	12,99± 0,72 <sup>#β</sup>	33,88± 12,06 <sup>#β</sup>	0,4± 0,2 <sup>#β</sup>

T4: tiroxina,  $V_{max}$ : velocidad máxima,  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten,  $V_{max}/K_m$ : capacidad de transporte, DGX: digoxina. \*  $p < 0,05$  respecto a su control. #  $p < 0,05$  respecto a insulina de su grupo. <sup>α</sup>  $p < 0,05$  respecto a PD98059 de la captación total de T4. <sup>β</sup>  $p < 0,05$  respecto a insulina en presencia de PD98059 de la captación total de T4.

### 13.5 Efecto del inhibidor de AKT IV en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1 en presencia de insulina

El efecto de insulina (10nM, 24hrs) e inhibidor de AKT IV (10nM, 1hr) en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1 en células HTR8/SVneo se realizó mediante la técnica de captación (0-1000nM, 37°C, 15minutos) en ausencia y presencia de Digoxina (100nM) como inhibidor de OATP4A1. Luego, se cuantificó como se mencionó anteriormente, ajustando la curva a la cinética de Michaelis-Menten, a las cuales se le aplicó la transformación de Eadie-Hofstee obteniendo así los parámetros de  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}/K_m$  (Fig. 11 y tabla 4).

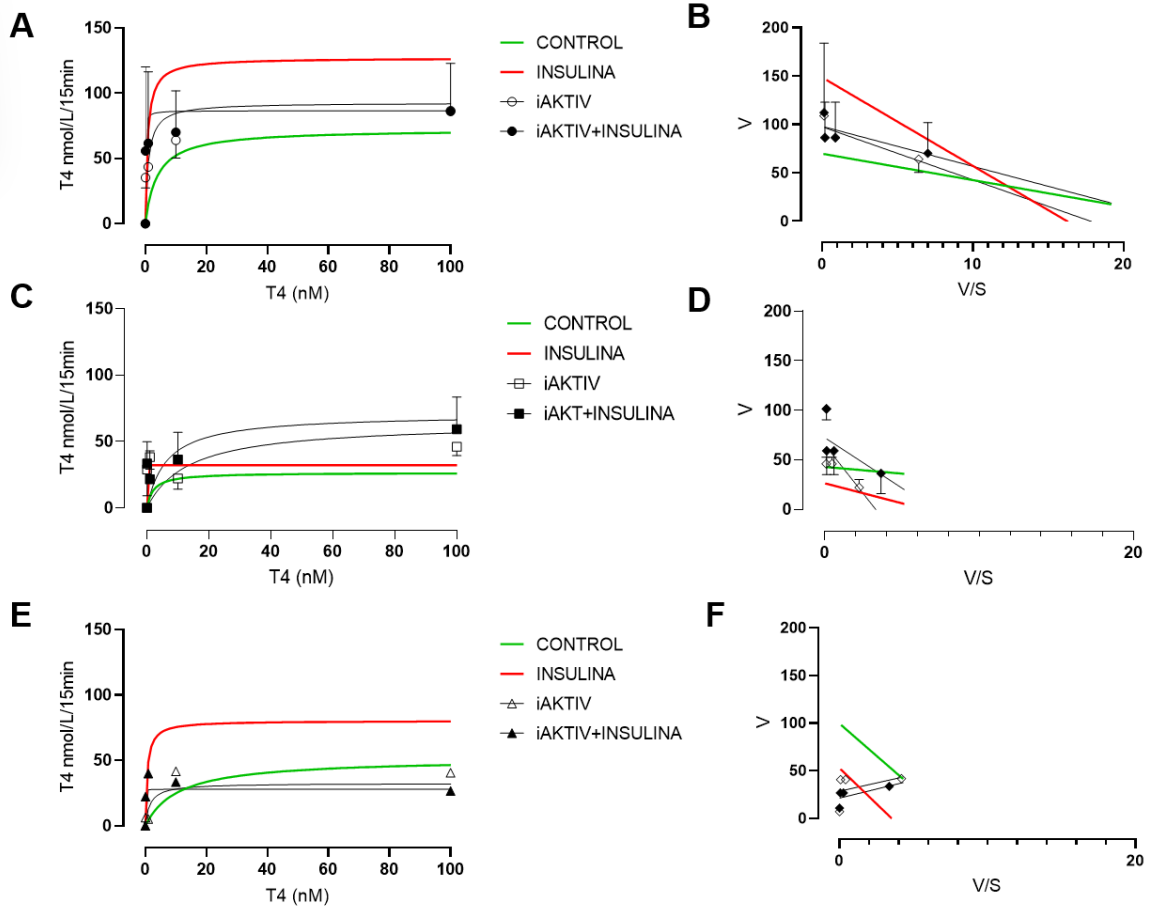
En la figura 11A y 11B, se observa la captación total de T4 en condiciones de control e insulina en ausencia y presencia de inhibidor de AKT IV. Las células al incubarse con inhibidor de AKT IV se observó que la  $V_{max}$  y  $K_m$  aumentaron (~1,4 y ~2 veces,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a la captación total de T4, mientras que la  $V_{max}/K_m$  disminuyó (~30%,  $p < 0,05$ ). Luego, las células incubadas con insulina en presencia de inhibidor de AKT IV se observó que la  $V_{max}$  y  $K_m$  disminuyeron (~40% y ~50%,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a la insulina de la captación total, mientras que la  $V_{max}/K_m$  aumentó (~1,5 veces,  $p < 0,05$ ), como se observa en la tabla 4.

En la figura 11C y 11D, se observa la captación de T4 en condiciones de control e insulina en ausencia y presencia de inhibidor de AKT IV en la fracción no Inhibible por digoxina. Las células al incubarse con inhibidor de AKT IV se observó que la  $V_{max}$  y  $K_m$  aumentan (~2,6 y ~5,2 veces,  $p < 0,05$  respectivamente) respecto a su

control, mientras que la  $V_{max}/K_m$  no mostró cambios. Luego, al incubar las células con insulina en presencia de inhibidor de AKT IV se observó que la  $V_{max}$  y  $K_m$  aumentaron (~1,7 y ~7,5 veces,  $p<0,05$  respectivamente) respecto a insulina, mientras que  $V_{max}/K_m$  disminuyó (~80%,  $p<0,05$ ). Por otra parte, si comparamos los parámetros de la fracción no Inhibible por digoxina respecto a la captación total de T4, las células con inhibidor de AKT IV mostraron que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyeron (~30% y ~80%,  $p<0,05$  respectivamente) respecto a inhibidor de AKT IV de la captación total de T4, mientras que la  $K_m$  aumentó (~3,6 veces,  $p<0,05$ ). Luego, las células incubadas con insulina en presencia de inhibidor de AKT IV se observó que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyeron (~30% y ~70%,  $p<0,05$  respectivamente) respecto a la misma condición, mientras que la  $K_m$  aumentó (~2,5 veces,  $p<0,05$ ), como se observa en la tabla 4.

En la figura 11E y 11F, se observa la captación de T4 en condiciones de control e insulina en ausencia y presencia de inhibidor de AKT IV en la fracción Inhibible por digoxina (OATP4A1). Las células al incubarlas con inhibidor de AKT IV se observó que la  $V_{max}$  y  $K_m$  disminuyeron (~50% y ~80%,  $p<0,05$  respectivamente) respecto a su control, mientras que la  $V_{max}/K_m$  aumentó (~2,4 veces,  $p<0,05$ ). Luego, al incubar las células con insulina en presencia de inhibidor de AKT IV se observó que la  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyeron (~80%, ~70%, y ~20%  $p<0,05$  respectivamente) respecto a insulina. Finalmente, si comparamos los parámetros de la fracción Inhibible por digoxina respecto a la captación total de T4, las células con inhibidor de AKT IV mostraron que la  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyeron (~70%, ~40% y ~50%,  $p<0,05$  respectivamente) respecto a inhibidor de AKT IV de la captación total de T4.

Luego, las células incubadas con insulina en presencia de inhibidor de AKT IV se observó que la  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  disminuyeron (~80% para ambos,  $p < 0,05$ ) respecto a la misma condición, mientras que la  $K_m$  no mostró cambios, como se observa en la tabla 4.



**Fig. 11. Efecto de insulina e inhibidor de AKT IV en la captación total de T4, en la fracción no Inhibible por digoxina y en la fracción Inhibible por digoxina en células HTR8/SVneo.** El efecto de insulina e inhibidor de AKT IV en la actividad de transporte de T4 por OATP4A1 en células HTR8/SVneo se realizó mediante la técnica de captación (0-1000nM, 37°C, 15minutos) en ausencia y presencia de Digoxina (DGX, 100nM) como inhibidor de OATP4A1, obteniendo las gráficas de cinética de Michaelis-Menten (A,C,E) y la transformación de Eadie-Hofstee (B,D,F). A y B Muestran la captación total de T4 en condiciones de control e insulina (10nM, 24hrs) en ausencia y presencia de inhibidor de AKT IV (10nM). C y D Muestran la

captación de T4 de la fracción no Inhibible por digoxina en ausencia y presencia de inhibidor de AKT IV. E y F Muestra la captación de T4 de la fracción Inhibible por digoxina en ausencia y presencia de inhibidor de AKT IV.

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos del transporte de T4 en ausencia y presencia de insulina, inhibidor de AKT IV y digoxina.

<b>Captación total T4</b>	<b><math>V_{max}</math> T4 (nmol/L/15min)</b>	<b><math>K_m</math> (nM)</b>	<b><math>V_{max}/K_m</math> (T4nmol/L/min/nM)</b>
Control	69,62± 4,42	2,73± 0,42	25,5± 5,5
Insulina	148,30± 6,25*	9,13± 1,37*	16,2± 3,1*
Inhibidor AKT IV	97,37± 3,23*	5,47± 1,36*	17,8± 5,0*
Inh AKT IV +insulina	97,87± 13,90#	4,13± 4,06#	23,7± 26,7
<b>No Inhibible por DGX</b>	<b><math>V_{max}</math> T4 nmol/L/15min</b>	<b><math>K_m</math> nM</b>	<b><math>V_{max}/K_m</math></b>
Control	25,27± 5,45	3,8± 1,81	4,9± 7,1
Insulina	42,91± 6,18*	1,36± 0,56*	31,6± 17,5*
Inhibidor AKT IV	65,10± 8,11 <sup>α</sup>	19,76± 5,81 <sup>α</sup>	3,3± 1,4 <sup>α</sup>
Inh AKT IV +insulina	72,36± 7,70 <sup>#β</sup>	10,17± 3,96 <sup>#β</sup>	7,1± 3,5 <sup>#β</sup>
<b>Inhibible por DGX</b>	<b><math>V_{max}</math> T4 nmol/L/15min</b>	<b><math>K_m</math> nM</b>	<b><math>V_{max}/K_m</math></b>
Control	52,83± 0,41	14,98± 0,33	3,50± 0,10
Insulina	99,52± 2,02*	13,52± 0,79	7,40± 0,60*
Inhibidor AKT IV	28,48± 3,15 <sup>α</sup>	3,48± 1,50 <sup>α</sup>	8,20± 4,40 <sup>α</sup>
Inh AKT IV +insulina	21,30± 1,29 <sup>#β</sup>	3,78± 0,75 <sup>#</sup>	5,60± 1,50 <sup>#β</sup>

T4: tiroxina,  $V_{max}$ : velocidad máxima,  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten,  $V_{max}/K_m$ : capacidad de transporte, DGX: digoxina. \*  $p < 0,05$  respecto a su control. #  $p < 0,05$  respecto a insulina de su grupo.  $\alpha$   $p < 0,05$  respecto inhibidor de AKT IV de la captación total de T4.  $\beta$   $p < 0,05$  respecto a insulina en presencia de inhibidor de AKT IV de la captación total de T4.

## 14. DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación muestran que los trofoblastos humanos en presencia de insulina aumentan los niveles de ARNm y proteína, así como también la actividad de transporte por OATP4A1. El efecto de insulina sobre la expresión de ARNm de OATP4A1 depende de la vía de AKT, mientras que la expresión de proteína depende de la vía de MAPK. De manera interesante, la actividad de transporte de OATP4A1 depende parcialmente de AKT y totalmente de MAPK.

### 14.1 Sobre la expresión de OATP4A1 por insulina

El transportador OATP4A1 se expresa en diversos tejidos humanos a nivel de ARNm, tales como corazón, hígado, pulmón, páncreas, riñón y placenta (Fijiwara *et al.*, 2001). A nivel de proteína OATP4A1 se expresa en placenta humana (Sato, K *et al.*, 2003) específicamente en células del sincitiotrofoblasto permitiendo el transporte de HT de T3 y T4 (Loubiere *et al.*, 2012) para suplir las necesidades del feto, ya que cualquier alteración en el traspaso de HT puede tener complicaciones en el desarrollo fetal (Haddow *et al.*, 1999). También, se ha visto que se sobreexpresa en algunos tipos de cáncer como cáncer gástrico (Fang Y *et al.*, 2021), colorrectal (Wang Z *et al.*, 2019) y pulmón (Chen YL *et al.*, 2023). Si bien se ha documentado la expresión de OATP4A1 en múltiples tejidos, la evidencia disponible se basa principalmente en estudios de ARNm, siendo escasos los análisis a nivel proteico.

Por otro lado, el modelo celular empleado en esta tesis HTR8/SVneo, corresponde a trofoblastos humanos de primer trimestre de gestación inmortalizadas, las cuales se caracterizan por tener funciones de migración e invasión (Taga S *et al.*, 2022). En relación con esto, placentas con preeclampsia muestran que la expresión del gen SLCO4A1 (OATP4A1) estaría disminuido, y esto se correlaciona con una disminución en la migración e invasión trofoblástica (Founds, S *et al.*, 2009), lo que nos ayuda a comprender el rol de la presencia de este transportador en trofoblastos humanos. Si bien sabemos que el transportador OATP4A1 se expresa en placenta, no hay trabajos sobre la actividad del transporte de HT en este tejido.

En relación con la regulación por insulina, se sabe que es una hormona capaz de regular el metabolismo glucídico, síntesis de proteínas y lípidos (Dong Q *et al.*, 2020), además de regular positiva o negativamente la expresión génica mediante los factores de transcripción como FOXO, SREBP-1c, IGF1BP1 (Guo S *et al.*, 2014). También se ha visto que regula los transportadores de glucosa como GLUT1 y GLUT4 en cardiomiocitos (Zorzano A *et al.*, 1997) y GLUT4 en músculo esquelético de ratas (Marette, A *et al.*, 1992). Sin embargo, la regulación de los transportadores de hormonas tiroideas por insulina aún no ha sido descrita.

Con respecto a la regulación de los THT, se ha observado que MCT8 y OATP1C1, expresados en neuronas y astrocitos respectivamente, son regulados a la baja en inflamación sistémica por lipopolisacáridos (Wittmann G *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha observado un aumento del transportador OATP4A1 en secciones tumorales de glioblastoma humano, específicamente en regiones perinecroticas, lo cual se correlacionó con marcadores relacionados con la hipoxia (Cooper, E *et al.*, 2022).

Adicionalmente, se evidencia un aumento del gen SLCO4A1 en respuesta a la hipoxia en pacientes con neuroblastoma, cuyos niveles de expresión se correlacionan con un mal pronóstico (Applebaum et al., 2016). Por otra parte, se estudió la inflamación crónica, en un modelo de ratas con artritis, como regulador de la expresión del gen de OATP4A1, resultando en una reducción significativa de la expresión del gen de OATP4A1 en hígado y un aumento del gen en el corazón, en la cual los autores lo atribuyeron a la presencia de algunas citoquinas como IFN- $\gamma$ , IL-1A, IL-10, INOS y a la enzima COX2 (Hanafy et al., 2012). De esta misma forma Wleck y colaboradores, al estudiar los transportadores OATP4A1, OATP3A1 y OATP2A1, encontró que aumentan sus ARNm en la mayoría de los casos de cáncer de hígado humano en comparación con los controles (Wlcek et al., 2011) donde los autores discuten que posiblemente las citoquinas inflamatorias regularían la expresión de estos transportadores. Entonces, encontramos que el transportador OATP4A1 es regulado por condiciones de hipoxia e inflamación, sin embargo, **no existe evidencia previa respecto a la regulación de OATP4A1 por insulina**. No obstante, en un estudio previo de laboratorio, se observó que insulina es capaz de aumentar la expresión de OATP4A1 y la actividad del transporte de T4 en trofoblastos humanos (Roble, K. 2023, Datos no publicados). Esto se condice con los resultados encontrados en esta tesis, donde se observa que en condiciones de hiperinsulinemia la expresión de ARNm y proteína del transportador de OATP4A1 aumentan respecto al control.

Respecto a la distribución celular de OATP4A1 observada por inmunocitoquímica en este estudio, el marcaje no se presentó de manera homogénea, sino que se

evidenció concentrado en una región específica de la célula. Esto concuerda con Sato y colaboradores, los cuales estudiaron la localización de OATP4A1 en placenta, y encontraron que se expresa en la membrana apical de los sincitiotrofbastos (Sato *et al.*, 2023), si bien, la línea celular HTR8/SVneo no es polarizada, esto podría explicar la expresión de OATP4A1 observada en nuestro estudio. Será necesario en futuros trabajos determinar la localización específica de este transportador.

En cuanto a los resultados obtenidos, se observó un aumento del ARNm de aproximadamente 2 veces, en comparación con un incremento de 1,5 veces en el nivel de proteína, lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación a nivel pre y post-transcripcional o traduccional. En relación con esto, los niveles de ARNm dependen de varios factores, por ejemplo, de los factores de transcripción que regulan positiva o negativamente (Jackson, D *et al.*, 2000), del procesamiento post transcripcional (Liu H *et al.*, 2014), de la interacción con microARNs (Chekulaeva, M *et al.*, 2009) que pueden bloquear su traducción o promover su degradación (Peng, S *et al.*, 1998) y de la exportación del ARNm desde el núcleo al citoplasma (Van Hoof, A *et al.*, 2002). En el caso de las proteínas, los niveles dependerán de la transcripción y procesamiento del ARNm (Jackson, D *et al.*, 2000), de la traducción, estabilidad y su degradación (Hargrove JL *et al.*, 1990). En este sentido, se encontró que la hipometilación del ADN de las regiones promotoras del gen OATP4A1, aumenta los niveles de transcripción del ARNm en tejido canceroso colorrectal (Rawłuszko-Wieczorek *et al.*, 2015). En cuanto a OATP4A1 como proteína, no hay evidencia de modificaciones, no obstante, se encontró mediante western blot que el

transportador OATP1A2 expresado en sincitiotrofoblasto en placenta humana puede sufrir glicosilaciones, lo que podría sugerir que exista un proceso similar para OATP4A1 (Loubiere *et al.*, 2012). Además, se observó que el transportador OAT1 perteneciente a la misma familia SCL/OATP, se degrada a través de los proteasomas en células renales (Fan Y *et al.*, 2020). Por lo tanto, según lo reportado en la literatura podemos sugerir que el aumento de OATP4A1 por insulina podría ser regulado por la metilación del promotor, por un aumento o disminución de la actividad del proteasoma, sin embargo, nuevos estudios deberán determinar estas asociaciones.

#### **14.2 Sobre la actividad del transporte de T4 por insulina**

El transporte de HT desde la madre al feto es imprescindible durante el primer trimestre de gestación, por lo tanto, los THT en placenta tienen un rol fundamental en la captación de T3 y T4. Hasta la fecha se han estudiado 6 THT en placenta, los cuales corresponden a MCT8, MCT10, LAT1, LAT2, OATP1A2 y OATP4A1. La actividad de transporte de T4 por estos transportadores en placenta es bastante limitada, no obstante, se ha descrito que en astrocitos de rata el transportador LAT1 presenta una  $K_m$  de  $2\mu\text{M}$  en la captación de T3 (Blondeau, J. P *et al.*, 1993), mientras que en la línea celular de trofoblasto de coriocarcinoma humano JAR fue  $0,8\mu\text{M}$  (Prasad, P. D *et al.*, 1994). Otro estudio reveló que en Ovocitos de *Xenopus*, el transportador LAT1 obtuvo valores de  $K_m$  de 1,8 y  $6,3\mu\text{M}$  para T3 y T4 respectivamente (Ritchie, J. W. A *et al.*, 1999), el transportador MCT8

valores de  $K_m$  de  $4,7\mu\text{M}$  para T4 (Friesema EC *et al.*, 2003) y el transportador LAT2 valores de  $K_m$  de  $16,24\mu\text{M}$  para 3,3' diyodotironina (3,3'-T2) (Kinne A *et al.*, 2015). Este último no transportó T3 ni T4 en ovocitos de *Xenopus*. Por último, para el transportador MCT10, se ha obtenido una  $K_m$  de  $23\mu\text{M}$  para el transporte de T4 en trofoblastos de la línea celular JEG-3 (Bourgeois NM *et al.*, 2016).

En relación con el transporte de T4 por OATP4A1, no se ha registrado valores de  $K_m$  en placenta, no obstante, se encontró que en Ovocitos de *Xenopus* el valor de  $K_m$  aparente para el transporte de T3 por OATP4A1 es de  $0,9\mu\text{M}$  (Fijiwara *et al.*, 2001) con una alta afinidad por las HT, de lo cual se deduce que desempeña un papel importante en el transporte de HT desde la sangre materna hasta el feto. Sumado a esto, se han registrado valores de  $K_m$  aparente para otros transportadores OATP localizados en diferentes tejidos, que también transportan HT, como OATP1B1, OATP1A2 y OATP1C1 (Hagenbuch *et al.*, 2007). En Ovocitos *Xenopus*, OATP1A2 mostró una  $K_m$  de  $8,0\mu\text{M}$  para el transporte de T4 (Kullak-Ublick *et al.*, 2001), mientras que, para OATP1B1 la  $K_m$  fue de  $3,0\mu\text{M}$  (Abe *et al.*, 1999). En células de ovario de hámster chino (CHO), se encontró que la  $K_m$  para el transporte de T4 por OATP1C1 fue de  $0,09\mu\text{M}$  presentando una mayor afinidad en relación con los otros (Pizzagalli *et al.*, 2002). Además, en células HEK293 transfectadas para expresar OATP1C1 se obtuvo una  $K_m$  de  $0,013\mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de  $1,7\text{ pmol/min/mg}$  (Baldeshwiler, G, 2011). A partir de estos datos es posible concluir que los valores de  $K_m$  para OATP varían desde el nivel nanomolar hasta micromolar ( $0,013\text{-}8\mu\text{M}$ ) según su ubicación tisular.

Los estudios de cinética mencionados anteriormente se realizaron a través de técnicas radiactivas, mientras que los datos obtenidos en esta tesis se realizaron de acuerdo con la tasa de producción de una reacción redox cromogénica de yodo con cerio y arseniato. Las ventajas de esta técnica es que no está limitada a la desintegración del yodo radiactivo ni a las condiciones de salud, además se puede realizar en pocas horas (Bílek et al., 2005). Por otro lado, el arsenito de sodio está clasificado como carcinógeno (Carabantes, A. G *et al.*, 2002). Sin embargo, existen trabajos utilizando esta técnicas como en células MDCK que sobreexpresan MCT8 confirmando la captación de T3 dependiente de la concentración y tiempo (Dong, H *et al.*, 2017). Desafortunadamente, no calcularon los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ .

En cuanto a los resultados obtenidos para el transportador OATP4A1, registramos  $K_m$  y  $V_{max}$  de valores en el rango nanomolar, 14,9nM y 52,8nM respectivamente, lo cual está dentro del rango en base a la literatura, sin embargo, los valores no son similares para OATP4A1. Situación que puede deberse a la técnica usada, el tipo celular y las condiciones de trabajo. De la misma manera ocurre para los transportadores LAT y MCT. A pesar de ello, al incubarse con insulina, la capacidad y velocidad de transporte se ven aumentados, con valores de 7,4 y 99,5nM respectivamente, lo que se condice con los resultados obtenidos en experimentos anteriores en nuestro laboratorio (Roble, K 2023), pudiendo concluir que insulina es capaz de regular a OATP4A1 y sistemas de transporte MCT y LAT. En relación con la  $K_m$  de MCT y LAT esta se ve disminuida (Fracción No inhibible por DGX), aumentando su afinidad por T4 en presencia de insulina, mientras que para OATP4A1 no se observan cambios, por lo que se sugiere la presencia del mismo

transportador en condiciones control y con insulina. Si bien, los sistemas de transporte estarían aumentados en presencia de insulina, la captación total se ve disminuida ( $V_{max}/K_m$ ). El parámetro de  $V_{max}/K_m$  nos permite saber la capacidad o eficiencia del transporte, es decir, cuanto transporta en relación con la cantidad de sustrato (Chan, KY *et al.*, 2007), por lo tanto, la captación total de T4 tiene una menor capacidad de transporte frente al sistema de OATP4A1 y MCT-LAT.

### **14.3 Sobre el efecto de MAPK y AKT en la expresión y actividad de OATP4A1 por insulina**

Como ya mencionamos, la insulina está encargada de regular el metabolismo y de promover la división y el crecimiento celular (Dong Q *et al.*, 2020). Estos procesos son llevados a cabo por la activación de diferentes vías de señalización, dentro de los cuales estudiamos la participación de AKT y MAPK. En relación con la vía de MAPK, la insulina se une su receptor de la familia tirosina quinasa, el cual puede ser la isoforma A, isoforma B, receptor de IGF1, o receptores híbridos (Pandini, G *et al.*, 2002). Estos receptores son fosforilados funcionando como sitios de acoplamiento para proteínas con dominios de homología a Src tipo 2 (SH2) como la proteína 2 unida al receptor de crecimiento (Grb2) y la fosfatasa con dominios SH2 (SHP) iniciando una cascada de señalización intracelular. Posteriormente se recluta a la proteína SOS para activar a la proteína GTPasa RAS, que activa a la proteína quinasa de la quinasa activada por mitógenos (MEK) y esta a su vez a la proteína quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), el cual es translocado al

núcleo para fosforilar factores de transcripción (Pearson, G *et al.*, 2001). De esta manera, la vía de MAPK induce la proliferación, diferenciación celular y regulación de la expresión génica (Robinson, M. J *et al.*, 1997). En cuanto a AKT, se autofosforilan los receptores de insulina en residuos de tirosina, se le une fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) el cual convierte a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). En este último se ancla la proteína quinasa B (AKT) y la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 3-quinasa tipo 1 (PDK1) fosforilando a AKT que a su vez puede fosforilar diversas proteínas como factores de crecimiento para regular la proliferación, supervivencia y metabolismo celular (Manning, B. D *et al.*, 2017).

En esta tesis, encontramos que la actividad del transportador OATP4A1 aumenta en presencia de insulina y que esta depende de la vía de MAPK y AKT. Respecto a esto, en literatura no se ha estudiado la regulación de la expresión de los transportadores de hormonas tiroideas por insulina, por lo tanto, no hay evidencia de la regulación de OATP4A1 por las vía MAPK y AKT. Sin embargo, hemos encontrado que en células trofoblásticas humanas primarias (PHT) de placenta a término, hay un aumento significativo de la actividad de transporte de aminoácidos del sistema A en un 37% en presencia de insulina en embarazos con obesidad, y también un aumento de la fosforilación de 3 veces para AKT y ERK (Castillo-Castrejón M *et al.*, 2019). Los autores mencionan que la placenta es sensible a insulina en condiciones como la obesidad, y que promueven funciones placentarias críticas, incluyendo el transporte de aminoácidos (Castillo-Castrejón M *et al.*, 2019). Esto apoya los resultados obtenidos en esta tesis ya que, si la insulina es capaz de

aumentar la actividad del transporte de aminoácidos en placenta, es posible que también aumente el transporte de T4 por los THT dependiente de la activación de AKT y MAPK, teniendo presente que las HT corresponden a un aminoácido de tirosina con 4 residuos de yodo (Shahid, M. A *et al.*, 2018). Además, se encontró que, en placenta de babuinos, específicamente en membranas microvellosas plasmáticas del trofoblasto, una dieta con restricción de nutrientes se asoció con inhibición de las vías de señalización de insulina/IGF-I, tanto ERK1/2 como AKT, disminución de la expresión de transportadores de SNAT, LAT, GLUT-1 y menores niveles fetales de aminoácidos esenciales (Kavitha JV *et al.*, 2014). Siguiendo esta lógica, insulina disminuye el transporte de aminoácidos en fetos con IUGR. Por lo tanto, esto nos sugiere que ambas vías de señalización están implicadas en el transporte de nutrientes hacia el feto y que posiblemente suceda igual para el caso de OATP4A1.

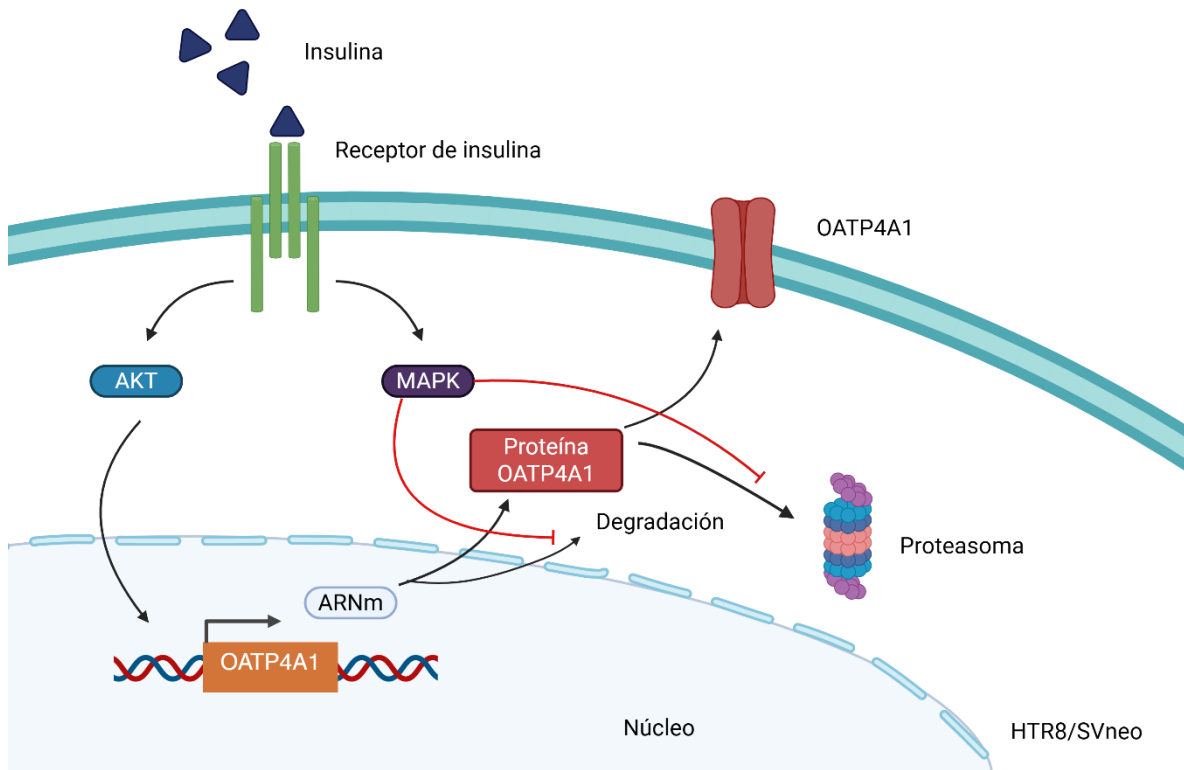
Por otra parte, no hay evidencias de la expresión de proteína de OATP4A1 dependiente de MAPK, sin embargo, encontramos que ERK1/2 puede regular post-transcripcionalmente la estabilidad y traducción de mRNAs de citoquinas mediante proteínas de unión a ARNm como tristetraprolina (TTP), la cual se une a secuencias específicas del ARNm de citoquinas, llamadas elementos ricos en AU en la región 3'-UTR, que reducen la estabilidad del ARNm y su vida media facilitando la degradación del ARNm, explicando una manera indirecta la regulación de los niveles de proteína mediante la vía MAPK (Tiedje C *et al.*, 2014). Si bien, nosotros encontramos que insulina aumenta la proteína de OATP4A1 mediado por MAPK

ERK1/2, el trabajo de Tiedje y colaboradores, nos permite inferir que ERK1/2 es capaz de regular los niveles de proteína sin generar cambios transcripcionales.

En relación con los niveles de ARNm de OATP4A1 mediado por AKT en trofoblastos, tampoco hay evidencias que demuestren esto, sin embargo, se sabe que la vía de AKT está asociada con la regulación de la expresión génica (Manning, B. D *et al.*, 2017). En un estudio en placentas de ratas, se encontró que una sobreexpresión de glucocorticoides generó una disminución de la fosforilación de AKT y de la proteína 1 de unión al factor de iniciación eucariota 4E (4EBP1), afectando la expresión a nivel de ARNm del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor de crecimiento placentario (PIGF) durante el embarazo (Ozmen A *et al.*, 2015). Nosotros encontramos que insulina aumenta los niveles de ARNm de OATP4A1 mediado por AKT, de modo que, el trabajo de Ozmen y colaboradores nos sugiere que AKT es capaz de regular los niveles de ARNm de OATP4A1 transcripcionalmente.

En una revisión, se indicó que la regulación y el ensamblaje de ciclina D1 esta mediada por factores de crecimiento dependiente de Ras y ERK1/2, mientras que la vía de AKT inhibe la degradación postraducciona de esta (Diehl, J. A *et al.*, 2002). La ciclina D1 es una proteína clave en el ciclo celular y su sobreexpresión es una de las modificaciones oncogénicas más comunes en cáncer (Ramos-García P *et al.*, 2018). Los autores mencionan que la regulación de ciclina D1 depende de ambas vías de señalización, tanto de MAPK como de AKT, ya que, si bien MAPK regula la expresión de factores de transcripción, AKT por otro lado inhibe la degradación postraducciona de ciclina D1 de manera indirecta, ya que no afecta la

transcripción, sino que más bien lo hace a través de la fosforilación de la quinasa 3B de la sintasa de glucógeno (GSK3 $\beta$ ). GSK3 $\beta$  normalmente fosforila la ciclina D1, marcándola para su exportación nuclear y favoreciendo su degradación. Al inhibirse GSK3 $\beta$  por AKT, ciclina D1 permanece en el núcleo, evitando su degradación y manteniendo su nivel proteico (Diehl, J. A *et al.*, 2002). Esto podría explicar los resultados de esta tesis, donde encontramos que la expresión de ARNm de OATP4A1 depende de AKT, mientras que la proteína depende de MAPK, observando una dependencia por ambas vías de señalización, en donde OATP4A1 por medio de AKT sería regulado transcripcionalmente, y MAPK lo regularía indirectamente en el proceso de traducción (figura 12).



**Figura 12. Modelo propuesto para la expresión de OATP4A1 dependiente de AKT y MAPK.** Insulina se une a su receptor en membrana activando las vía de AKT y MAPK. AKT regula al promotor de OATP4A1 transcripcionalmente, mientras que MAPK actúa sobre la degradación de proteína de OATP4A1 y el proteasoma .AKT: proteína quinasa B, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, OATP4A1: polipéptido transportador de aniones orgánicos 4A1.

## 15. DEBILIDADES Y LIMITACIONES

Si bien en este trabajo se cumplieron con los objetivos, se deben tener en consideración algunas debilidades o limitaciones en lo que respecta. Partir mencionando que este trabajo fue llevado a cabo en una línea celular de trofoblastos, lo que pudo ser mejorado utilizando un cultivo primario desde placentas para evaluar la expresión y actividad de OATP4A1. Por otra parte, la técnica usada para determinar la actividad de transporte es una técnica indirecta para la captación de T4, por lo general se utilizan marcadores radiactivos para evaluar el transporte, lo que podría generar distintos resultados, los cuales impiden una correcta comparación con la literatura. En relación con la expresión de proteína de OATP4A1, se usó inmunocitoquímica que, si bien es una técnica para evaluar expresión, corresponde a una técnica semicuantitativa, lo cual puede ser complementado con un WesternBlot. Otra debilidad, en relación con la inmunocitoquímica, faltó determinar la localización celular del transportador OATP4A1 con un marcador de membrana plasmática.

## 16.FORTALEZAS

En el desarrollo de este trabajo, encontramos distintos puntos fuertes a considerar. Primero hay que destacar que este es el primer trabajo que posiciona a la insulina como regulador de la expresión y actividad de OATP4A1 en trofoblastos humanos. Además, es el primer estudio en evaluar la participación de vías de señalización como MAPK y AKT en la expresión y actividad de este transportador en placenta. Por otro lado, si bien la técnica usada para determinar la actividad de OATP4A1 no es la convencional, es una técnica fácil de realizar, que no depende de la degradación de los isotopos marcados y que no está asociado a complicaciones en salud. Además, el modelo celular utilizado, es más accesible al momento de realizar experimentos, el cual imita un ambiente similar a lo que sucede en el comienzo del embarazo, ya que corresponde a un modelo de trofoblastos de primer trimestre de gestación.

De manera relevante, esta tesis es uno de los pocos trabajos en dónde se obtienen los parámetros de  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}/K_m$  con respecto a la captación de T4 por OATP4A1.

## 17. CONCLUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis, podemos decir que insulina es capaz de regular la actividad de OATP4A1 la cual depende tanto de MAPK como de AKT, mientras que la expresión de ARNm depende de AKT y la proteína de MAPK.

De manera interesante, insulina disminuye la capacidad de transporte total de T4. En base a esto, podemos mencionar que en embarazadas que cursan con hiperinsulinemia, el suministro de hormonas tiroideas hacia el feto podría estar disminuido, sin embargo, los sistemas como el de OATP4A1 estarían intentando reponer el transporte de T4 hacia el feto.

## **18. PROYECCIONES**

A partir de los resultados encontrados, se proponen las siguientes protecciones para complementar y avanzar esta investigación. Primero, será trabajo futuro evaluar la expresión de OATP4A1 y sus vías de señalización mediante WesternBlot. También, realizar estos experimentos en otro modelo celular como explantes de placenta a término o directamente en las membranas microvellosas del sincitiotrofoblasto. Probar un marcador de membrana plasmática para determinar la localización subcelular del transportador OATP4A1. Finalmente, determinar la actividad y expresión para los otros transportadores de la familia MCT y LAT en trofoblastos en presencia de insulina para determinar su rol en esta condición.

## 19. BIBLIOGRAFIA

1. Abalovich, M. (2003). Fisiología tiroidea y embarazo. Aspectos maternos, placentarios y fetales. *RAEM*, 40(1), 23-30.
2. Almirón, M., Gamarra, S., González, M., & Issler, J. (2005). Diabetes gestacional. *Rev Postgr VIa Cátedr Med*, 152, 23-7.
3. Applebaum MA, Jha AR, Kao C, Hernandez KM, DeWane G, Salwen HR, Chlenski A, Dobratic M, Mariani CJ, Godley LA, Prabhakar N, White K, Stranger BE, Cohn SL. (2016). Integrative genomics reveals hypoxia inducible genes that are associated with a poor prognosis in neuroblastoma patients. *Oncotarget*, 7(47):76816-76826.
4. Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, Lawrence MC, Sciacca L, Frasca F, Morrione A, Vigneri R. (2017). Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr*, 38(5):379-431.
5. Braun D., Schweizer, U. (2018). Thyroid Hormone Transport and Transporters. *Vitamins and Hormones*, 106, 19-44.
6. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(1):a009191.
7. Burton, G., & Jauniaux, E. (2015). What is the placenta? *American journal of obstetrics and gynecology*, 213(4), 6-1.
8. Bustillo, A. L., Melendez, W. R. B., Urbina, L. J. T., Nuñez, J. E. C., Eguigurems, D. M. O., Pineda, C. V. P., & Bustillo, L. L. (2016). Sobrepeso y obesidad en el embarazo: complicaciones y manejo. *Archivos de medicina*, 12(3), 11.
9. Bernal, J. (2002). Hormonas tiroideas y sistema nervioso central. *Anales Españoles de Pediatría*, 56( 4), 38-41
10. Brandan, N., Llanos, I., Miño, C., & Ruiz, D. (2007). Hormonas tiroideas. Actualización Universidad Nacional del Nordeste, 1-7.
11. Chan, S. Y., Vasilopoulou, E., & Kilby, M. D. (2009). The role of the placenta in thyroid hormone delivery to the fetus. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*, 5(1), 45-54.
12. Cooper, E., Woolf, Z., Swanson, M. E., Correia, J., Schweder, P., Mee, E., & Park, T. I. (2022). Single-cell image analysis reveals over-expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in human glioblastoma tissue. *Neuro-Oncology Advances*, 4(1), vdac166.
13. Córdoba Ramírez, N., García Botina, H. D., & Builes Barrera, C. A. (2013). Cambios fisiológicos de la función tiroidea en el embarazo: bases para la interpretación de las pruebas tiroideas. *Iatreia*, 26(2), 185-196.

14. Contreras-Zúñiga, E., Arango, L. G., Zuluaga-Martínez, S. X., & Ocampo, V. (2008). Diabetes y embarazo. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 59(1), 38-45.
15. De Calvo, O., & de Santos, L. (2020). Expertos en fisiología: resumen de lo que debes saber de las hormonas tiroideas. *Revista Médico Científica*, 33(2), 31-45.
16. De La Vieja, A., Llamas, L., & Santisteban, P. (1997). Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (y II). Tiroglobulina, secreción de las hormonas y transporte. *Instituto de investigaciones biomédicas*. 44(5).
17. Conget, I. (2002). Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Revista española de cardiología*, 55(5), 528-535.
18. Duarte, J. (1993). Hormonas Tiroideas y Desarrollo Cerebral. *Med. UIS*, 227-34.
19. Gracia, V., & Olmedo, J. (2017). Diabetes gestacional: conceptos actuales. *Ginecología y obstetricia de México*, 85(6), 380-390.
20. Guzmán-Gutiérrez, 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.
21. Gutiérrez-Vega, S., Armella, A., Mennickent, D., Loyola, M., Covarrubias, A., Ortega-Contreras, B., & Guzmán-Gutiérrez, E. (2020). High levels of maternal total tri-iodothyronine, and low levels of fetal free L-thyroxine and total tri-iodothyronine, are associated with altered deiodinase expression and activity in placenta with gestational diabetes mellitus. *Plos one*, 15(11).
22. Hernández, M., Redón, M., Mesa, M. *Fisiología De Las Glándulas Tiroides Y Paratiroides*. Libr virtual Form en ORL.
23. Herráez Aguilar, E. (2011). Implicación de promotores y transportadores de aniones orgánicos de las familias OATP y ABC en patología, toxicología y terapia antitumoral. Universidad de Salamanca.
24. Hidalgo, S. (2013). Trastornos tiroideos en el embarazo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(5), 761-767.
25. Isla, A., Cruz, J., Velasco, A., Hernández, P., Fajardo, R., & Díaz, A. (2008). Comportamiento de la placenta previa en el Hospital Ginecoobstétrico " América Arias", período 2003-2005. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 24(3).
26. Loubiere, L. S., Vasilopoulou, E., Bulmer, J. N., Taylor, P. M., Stieger, B., Verrey, F., & Chan, S. Y. (2010). Expression of thyroid hormone transporters in the human placenta and changes associated with intrauterine growth restriction. *Placenta*, 31(4), 295-304.
- 27..

28. Marsiglia, I. (2005). Enfermedad tiroidea asociada a otras enfermedades sistémicas. *Gaceta Médica de Caracas*, 113(4), 453-465.
29. Mosso, L., Martínez, A., Rojas, M., Margozzini, P., Solari, S., Lyng, T., &
30. Meo, SA y Hassain, A. (2016). Fisiología metabólica en el embarazo. *J Pak Med Assoc*, 66 (9 suplemento 1), S8-S10.
31. Ortiz, I. E. (2009). Regulación de la degradación intracelular de proteínas por insulina y por aminoácidos en fibroblastos humanos (Doctoral dissertation, Universitat de València).
32. Ortega-Domínguez, B., Herrera-Ramírez, M., & Tecalco-Cruz, A. (2015). Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 18(2), 131-143.
33. Olivieri, A. Valensise, H. Magnani, F. Medda, E. DeAngelis, S. D'Archivio, M. (2000). High frequency of antithyroid autoantibodies in pregnant women at increase drisk of gestational diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol.* 143, 741-747.
34. Ortega, M., Seniscal, D., Díaz, E., & Rodríguez, F. (2019). Síndrome eutiroideo enfermo. *Acta médica Grupo Ángeles*, 17(2), 131-136.
35. Palacín, M., Herrera-Castillón, E., & Lasunción, A. (1984). Transporte de metabolitos a través de la placenta. *Rev esp pediatr*, 40(3), 163-198.
36. Purizaca-Benites, M. (2008). La placenta y la barrera placentaria. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 54(4), 270-278.
37. Patel, J., Landers, K., Li, H., Mortimer, R., & Richard, K. (2011). Delivery of maternal thyroid hormones to the fetus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(5), 164-170.
38. Piedras, A. (2007). Niveles plasmáticos de fenitoína y farmacocinética de Michaelis-Menten, en población pediátrica mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(2), 42-47.
39. Roa, I., Smok, C., Prieto, R. (2012). Placenta; anatomía e histología comparada. *International Journal Morphology*, 30(4), 1490-1496.
40. Reyes, J., & Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de educación bioquímica*, 27(1), 9-18.
41. Rodríguez-Rodríguez, E., Perea, J. M., López-Sobaler, A. M., & Ortega, R. M. (2009). Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipoquinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico. *Nutrición hospitalaria*, 24(4), 415-421.
42. Sánchez-Gómez, M. (2014). Suplemento Entendiendo el papel del sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) en la regulación funcional del trofoblasto humano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 38, 118-28.
43. Soca, P. (2010). Evaluación de la resistencia a la insulina. *Atención Primaria*, 42(9), 489-490.

44. Solís, J., Orozco, A., García, C., Robles-Osorio, L., & Valverde, C. (2011). Bioactividad de las hormonas tiroideas: Importancia clínica de los transportadores de membrana, de las desyodasas y de los receptores nucleares. *Revista de Investigación Clínica*, 63(3), 287-308.
45. Serrano, A. (2021) Resultados perinatales adversos en mujeres con embarazo de segundo y tercer trimestre con dos valores distintos de TSH. Universidad Autónoma del Estado de México.
46. Tsatsaris, V., Malassiné, A., Fournier, T., Handschuh, K., Schaaps, P., Foidart, J., & Evain-Brion, D. (2006). Placenta humana. *EMC-Ginecología-Obstetricia*, 42(2), 1-23.
47. Urquiza, R. M. N. (1988). La placenta de madres desnutridas. *Salud pública de México*, 30(1), 54-67.
48. Bernal, J. (2014). Hormonas tiroideas y desarrollo cerebral Brain development and thyroid hormones. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*, 5(2), 5-8.
49. Purizaca, M. (2010). Modificaciones fisiológicas en el embarazo. *Revista peruana de Ginecología y Obstetricia*, 56(1), 57-69.
50. Elías-López, D., & Ferreira-Hermosillo, A. (2021). Insulina en poblaciones especiales: resistencia a la insulina, obesidad, embarazo, adultos mayores y enfermedad renal crónica. *Revista Mexicana de Endocrinología, Metabolismo y Nutrición*, 8.
51. Contreras-Zúñiga, E., Arango, L. G., Zuluaga-Martínez, S. X., & Ocampo, V. (2008). Diabetes y embarazo. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 59(1), 38-45.
52. Reyes, J. A. O., & Plancarte, A. A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de educación bioquímica*, 27(1), 9-18.
53. Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. A. (2017). Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: una actualización. *Gaceta médica de México*, 153(2), 214-228.
54. Lecarpentier, E., Fournier, T., Guibourdenche, J., Gil, S., & Tsatsaris, V. (2015). La placenta humana. *EMC-Ginecología-Obstetricia*, 51(3), 1-19.
55. Figuero-Ruiz, E., Prieto Prieto, I., & Bascones-Martínez, A. (2006). Cambios hormonales asociados al embarazo: Afectación gingivo-periodontal. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 18(2), 101-113.
56. Oviedo Ramírez, M. I. (2017). Caracterización histológica y expresión inmunohistoquímica de los marcadores p53 y p21 en el trofoblasto placentario en preeclampsia. *Proyecto de investigación*.
57. Bastarrachea, R. A., Laviada-Molina, H., Machado-Domínguez, I., Kent Jr, J., López-Alvarenga, J. C., & Comuzzie, A. G. (2005). El receptor de

- insulina como objetivo farmacogenómico: potenciando su señalización intracelular. *Revista de endocrinología y nutrición*, 13(4), 180-189.
58. Brandan, N., Llanos, I., Miño, C. A., & Ruiz, D. A. (2007). Hormonas tiroideas. *Actualización. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste*, 1-7.
59. Serdán Ruiz, D. L., Vásquez Bone, K. K., & Yupa Pallchisaca, A. E. (2023). Cambios fisiológicos y anatómicos en el cuerpo de la mujer durante el embarazo. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 27(119), 29-40.
60. de Escobar, G. M., & del Rey, F. E. (2008). Metabolismo de las hormonas tiroideas y el yodo en el embarazo. Razones experimentales para mantener una ingesta de yodo adecuada en la gestación. *Endocrinología y Nutrición*, 55, 7-17.
61. Rodríguez, M. S., San Julián, C. A., & De Aguilar, V. A. (2008, November). Influencia de la hipotiroxinemia materna durante la gestación sobre el desarrollo psicomotor. In *Anales de Pediatría* (Vol. 69, No. 5, pp. 420-425). Elsevier Doyma.
62. Schwartz, CE y Stevenson, RE (2007). El transportador de hormona tiroidea MCT8 y el síndrome de Allan-Herndon-Dudley. *Mejores prácticas e investigación Endocrinología clínica y metabolismo*, 21 (2), 307-321.
63. de Calvo, O. L., & de Santos, L. C. (2020). Expertos en fisiología: Resumen de lo que debes saber de las hormonas tiroideas. *Revista Médico Científica*, 33(2), 31-45.
64. Bosch-Barrera, J., Hernández, A., & Abella, L. E. (2009, December). La vía de la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina, una nueva diana terapéutica en oncología. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 32, No. 3, pp. 413-421). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
65. Bílek, R., Bednář, J., & Zamrazil, V. (2005). Spectrophotometric determination of urinary iodine by the Sandell-Kolthoff reaction subsequent to dry alkaline ashing. Results from the Czech Republic in the period 1994–2002. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 43(6), 573-580.
66. Krassas GE, Poppe K, Glinoe D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev.* 2010 Oct;31(5):702-55. doi: 10.1210/er.2009-0041. Epub 2010 Jun 23. PMID: 20573783.
67. Korevaar, T., Medici, M., Visser, T. *et al.* Enfermedad tiroidea en el embarazo: nuevos conocimientos sobre diagnóstico y tratamiento clínico. *Nat Rev Endocrinol* 13, 610–622 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.93>
68. Roseweir AK, Katz AA, Millar RP. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells.

- Placenta. 2012 May;33(5):408-15. doi: 10.1016/j.placenta.2012.02.001. Epub 2012 Feb 18. PMID: 22349353.
69. Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, Ito S, Abe T. The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004 Jun;19(3):171-9. doi: 10.2133/dmpk.19.171. PMID: 15499184.
70. LAIN, KRISTINE Y. MD \* ; CATALANO, PATRICK M. MD † .Cambios metabólicos en el embarazo. *Obstetricia y Ginecología Clínica* 50(4):p 938-948, diciembre de 2007. | DOI: 10.1097/GRF.0b013e31815a5494
71. Genovese, T., Esposito, E., Mazzon, E., Muia, C., Di Paola, R., Meli, R., ... & Cuzzocrea, S. (2008). Evidence for the role of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the development of spinal cord injury. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(1), 100-114.
72. Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37-40.
73. Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., & Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7686-7689.
74. Liao S, Wang Q, Chen S, Huang Q, Zhou L, Liu H, He S, Zhou Z. Mito-LND and (E)-Akt inhibitor-IV: novel compounds inducing endoplasmic reticulum stress and ROS accumulation against hepatocellular carcinoma. *J Transl Med.* 2024 Aug 28;22(1):792. doi: 10.1186/s12967-024-05545-5. PMID: 39198815; PMCID: PMC11351498.
75. Dunn EF, Fearn R, Connor JH. Akt inhibitor Akt-IV blocks virus replication through an Akt-independent mechanism. *J Virol.* 2009 Nov;83(22):11665-72. doi: 10.1128/JVI.01092-09. Epub 2009 Sep 9. PMID: 19740993; PMCID: PMC2772702.
76. Mikkaichi T, Suzuki T, Tanemoto M, Ito S, Abe T. The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004 Jun;19(3):171-9. doi: 10.2133/dmpk.19.171. PMID: 15499184.
77. Taub ME, Mease K, Sane RS, Watson CA, Chen L, Ellens H, Hirakawa B, Reyner EL, Jani M, Lee CA. Digoxin is not a substrate for organic anion-transporting polypeptide transporters OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, and OATP2B1 but is a substrate for a sodium-dependent transporter expressed in HEK293 cells. *Drug Metab Dispos.* 2011 Nov;39(11):2093-102. doi: 10.1124/dmd.111.040816. Epub 2011 Aug 17. PMID: 21849517.
78. Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, Lawrence MC, Sciacca L, Frasca F, Morrione A, Vigneri R. Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr Rev.* 2017 Oct 1;38(5):379-431. doi: 10.1210/er.2017-00073. PMID: 28973479; PMCID: PMC5629070.

79. Malaguarnera R, Gabriele C, Santamaria G, Giuliano M, Vella V, Massimino M, Vigneri P, Cuda G, Gaspari M, Belfiore A. Comparative proteomic analysis of insulin receptor isoform A and B signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2022 Nov 1;557:111739. doi: 10.1016/j.mce.2022.111739. Epub 2022 Aug 5. PMID: 35940390.
80. Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., ... & Vigneri, R. (1999). Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Molecular and cellular biology*, 19(5), 3278-3288.
81. Mosthaf, L., Grako, K., Dull, T. J., Coussens, L., Ullrich, A., & McClain, D. A. (1990). Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *The EMBO journal*, 9(8), 2409-2413.
82. Li G, Barrett EJ, Wang H, Chai W, Liu Z. Insulin at physiological concentrations selectively activates insulin but not insulin-like growth factor I (IGF-I) or insulin/IGF-I hybrid receptors in endothelial cells. *Endocrinology*. 2005 Nov;146(11):4690-6. doi: 10.1210/en.2005-0505. Epub 2005 Aug 11. PMID: 16099860.
83. Antonino Belfiore, Francesco Frasca, Giuseppe Pandini, Laura Sciacca, Riccardo Vigneri, Isoformas del receptor de insulina e híbridos de receptor de insulina/receptor de factor de crecimiento similar a la insulina en fisiología y enfermedad, *Endocrine Reviews* , Volumen 30, Número 6, 1 de octubre de 2009, páginas 586–623, <https://doi.org/10.1210/er.2008-0047>
84. Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Allan, W. C., Williams, J. R., Knight, G. J., Gagnon, J., ... & Klein, R. Z. (1999). Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *New England Journal of Medicine*, 341(8), 549-555.
85. Fujiwara, K., Adachi, H., Nishio, T., Unno, M., Tokui, T., Okabe, M., ... & Abe, T. (2001). Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology*, 142(5), 2005-2012.
86. Abe, T., Kakyo, M., Tokui, T., Nakagomi, R., Nishio, T., Nakai, D., ... & Yawo, H. (1999). Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 17159-17163.
87. Kullak-Ublick, GA, Ismail, MG, Stieger, B., Landmann, L., Huber, R., Pizzagalli, F., ... y Hagenbuch, B. (2001). Polipéptido transportador de aniones orgánicos B (OATP-B) y su comparación funcional con otros tres OATP del hígado humano. *Gastroenterología* , 120 (2), 525-533.
88. Abe, T., Unno, M., Onogawa, T., Tokui, T., Kondo, T. N., Nakagomi, R., ... & Matsuno, S. (2001). LST-2, a human liver-specific organic anion

- transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*, 120(7), 1689-1699.
89. Pizzagalli, F., Hagenbuch, B., Stieger, B., Klenk, U., Folkers, G. y Meier, P.J. (2002). Identificación de un nuevo polipéptido transportador de aniones orgánicos humanos como transportador de tiroxina de alta afinidad. *Endocrinología molecular*, 16 (10), 2283-2296.
  90. Sato, K., Sugawara, J., Sato, T., Mizutamari, H., Suzuki, T., Ito, A., ... & Okamura, K. (2003). Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta. *Placenta*, 24(2-3), 144-148.
  91. Hagenbuch B. Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jun;21(2):209-21. doi: 10.1016/j.beem.2007.03.004. PMID: 17574004.
  92. Baldeshwiler, G. (2011). A Structure Function Study of Organic Anion Transporting Polypeptide 1c1 (Oatp1c1). University of Minnesota.
  93. Marette, A., Burdett, E., Douen, A., Vranic, M., & Klip, A. (1992). Insulin induces the translocation of GLUT4 from a unique intracellular organelle to transverse tubules in rat skeletal muscle. *Diabetes*, 41(12), 1562-1569.
  94. Zorzano A, Sevilla L, Camps M, Becker C, Meyer J, Kammermeier H, Muñoz P, Gumà A, Testar X, Palacín M, Blasi J, Fischer Y. Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am J Cardiol.* 1997 Aug 4;80(3A):65A-76A. doi: 10.1016/s0002-9149(97)00459-1. PMID: 9293957.
  95. Dong Q, Majumdar G, O'Meally RN, Cole RN, Elam MB, Raghov R. Insulin-induced de novo lipid synthesis occurs mainly via mTOR-dependent regulation of proteostasis of SREBP-1c. *Mol Cell Biochem.* 2020 Jan;463(1-2):13-31. doi: 10.1007/s11010-019-03625-5. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31541353.
  96. Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol.* 2014 Jan 8;220(2):T1-T23. doi: 10.1530/JOE-13-0327. PMID: 24281010; PMCID: PMC4087161.
  97. Wittmann G, Szabon J, Mohácsik P, Nouriel SS, Gereben B, Fekete C, Lechan RM. Parallel regulation of thyroid hormone transporters OATP1c1 and MCT8 during and after endotoxemia at the blood-brain barrier of male rodents. *Endocrinology.* 2015 Apr;156(4):1552-64. doi: 10.1210/en.2014-1830. Epub 2015 Jan 16. PMID: 25594699; PMCID: PMC4399310.
  98. Cooper, E., Woolf, Z., Swanson, M. E., Correia, J., Schweder, P., Mee, E., ... & Park, T. I. (2022). Single-cell image analysis reveals over-expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in human glioblastoma tissue. *Neuro-Oncology Advances*, 4(1), vda166.

99. Peng, S. S. Y., Chen, C. Y. A., Xu, N., & Shyu, A. B. (1998). RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *The EMBO journal*.
100. Van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., & Parker, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science*, 295(5563), 2262-2264.
101. Chekulaeva, M., y Filipowicz, W. (2009). Mecanismos de regulación postranscripcional mediada por miRNA en células animales. *Current Opinion in Cell Biology* , 21 (3), 452-460.
102. Jackson, DA, Pombo, ANA, e Iborra, F. (2000). Balance de la transcripción: un análisis del metabolismo nuclear del ARN en células de mamíferos. *The FASEB Journal* , 14 (2), 242-254.
103. Liu H, Luo M, Wen JK. mRNA stability in the nucleus. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2014 May;15(5):444-54. doi: 10.1631/jzus.B1400088. PMID: 24793762; PMCID: PMC4076601.
104. Hargrove JL, Schmidt FH. The role of mRNA and protein stability in gene expression. *FASEB J*. 1989 Oct;3(12):2360-70. doi: 10.1096/fasebj.3.12.2676679. PMID: 2676679.
105. Li Q, Zhang D, Wang H, Xie J, Peng L, Peng Y, Zheng X, Jiang J. SLCO4A1-AS1 Facilitates the Malignant Phenotype via miR-149-5p/STAT3 Axis in Gastric Cancer Cells. *J Oncol*. 2021 Oct 19;2021:1698771. doi: 10.1155/2021/1698771. PMID: 34712324; PMCID: PMC8548156.
106. Wei Y, Wei L, Li J, Ma Z, Zhang Q, Han Z, Li S. SLCO4A1-AS1 promotes cell growth and induces resistance in lung adenocarcinoma by modulating miR-4701-5p/NFE2L1 axis to activate WNT pathway. *Cancer Med*. 2020 Oct;9(19):7205-7217. doi: 10.1002/cam4.3270. Epub 2020 Aug 6. Retraction in: *Cancer Med*. 2023 May;12(10):12034. doi: 10.1002/cam4.5771. PMID: 32762035; PMCID: PMC7541149.
107. Fan Y, You G. Proteasome Inhibitors Bortezomib and Carfilzomib Stimulate the Transport Activity of Human Organic Anion Transporter 1. *Mol Pharmacol*. 2020 Jun;97(6):384-391. doi: 10.1124/mol.119.118653. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32234809; PMCID: PMC7237869.
108. Rawłuszko-Wieczorek AA, Horst N, Horbacka K, Bandura AS, Świdorska M, Krokowicz P, Jagodziński PP. Effect of DNA methylation profile on OATP3A1 and OATP4A1 transcript levels in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2015 Aug;74:233-42. doi: 10.1016/j.biopha.2015.08.026. Epub 2015 Aug 28. PMID: 26349991.
109. Chen YL, Liu YN, Lin YT, Tsai MF, Wu SG, Chang TH, Hsu CL, Wu HD, Shih JY. El lncRNA SLCO4A1-AS1 suprime la progresión del cáncer de pulmón mediante el secuestro del eje de señalización TOX4-NTSR1.

- J Biomed Sci. 19 de septiembre de 2023;30(1):80. doi: 10.1186/s12929-023-00973-9. PMID: 37726723; PMCID: PMC10507979.
110. Wang Z, Jin J. El lncRNA SLCO4A1-AS1 promueve la proliferación de células de cáncer colorrectal al potenciar la autofagia a través del eje miR-508-3p/PARD3. *Aging (Albany, NY)*. 16 de julio de 2019;11(14):4876-4889. doi: 10.18632/aging.102081. PMID: 31308265; PMCID: PMC6682525.
111. Fang Y, Sun B, Gao J, Huang Y, Wang C. El lncRNA SLCO4A1-AS1 acelera el crecimiento y la metástasis del cáncer gástrico mediante la regulación del eje miR-149/XIAP. *Front Oncol*. 28 de septiembre de 2021;11:683256. doi: 10.3389/fonc.2021.683256. PMID: 34650909; PMCID: PMC8505954.
112. Taga S, Hayashi M, Nunode M, Nakamura N, Ohmichi M. miR-486-5p inhibits invasion and migration of HTR8/SVneo trophoblast cells by down-regulating ARHGAP5. *Placenta*. 2022 Jun 1;123:5-11. doi: 10.1016/j.placenta.2022.04.004. Epub 2022 Apr 22. PMID: 35477045.
113. Sato, K., Sugawara, J., Sato, T., Mizutamari, H., Suzuki, T., Ito, A., ... & Okamura, K. (2003). Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta. *Placenta*, 24(2-3), 144-148.
114. Founds, S. A., Conley, Y. P., Lyons-Weiler, J. F., Jeyabalan, A., Hogge, W. A., & Conrad, K. P. (2009). Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. *Placenta*, 30(1), 15-24.
115. Blondeau, J. P., Beslin, A., Chantoux, F., & Francon, J. (1993). Triiodothyronine is a high-affinity inhibitor of amino acid transport system L1 in cultured astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 60(4), 1407-1413.
116. Prasad, P. D., Leibach, F. H., Mahesh, V. B., & Ganapathy, V. (1994). Relationship between thyroid hormone transport and neutral amino acid transport in JAR human choriocarcinoma cells. *Endocrinology*, 134(2), 574-581.
117. Ritchie, J. W. A., Peter, G. J., Shi, Y. B., & Taylor, P. M. (1999). Thyroid hormone transport by 4F2hc-IU12 heterodimers expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of endocrinology*, 163(2), R5.
118. Dong, H., y Wade, MG (2017). Aplicación de un ensayo no radiactivo para el cribado de alto rendimiento de la inhibición de la captación de la hormona tiroidea a través del transportador transmembrana MCT8. *Toxicology in Vitro* , 40 , 234-242.
119. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10;278(41):40128-35. doi: 10.1074/jbc.M300909200. Epub 2003 Jul 18. PMID: 12871948.

120. Applebaum, M. A., Jha, A. R., Kao, C., Hernandez, K. M., DeWane, G., Salwen, H. R., ... & Cohn, S. L. (2016). Integrative genomics reveals hypoxia inducible genes that are associated with a poor prognosis in neuroblastoma patients. *Oncotarget*, 7(47), 76816.
121. Hanafy, S., El-Kadi, A. O., & Jamali, F. (2012). Effect of inflammation on molecular targets and drug transporters. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(3), 361-375.
122. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015 Mar 5;370(1663):20140066. doi: 10.1098/rstb.2014.0066. PMID: 25602070; PMCID: PMC4305167.
123. Sadler, T. W., & Langman, J. (2006). *Embriología médica: con orientación clínica*. Ed. Médica Panamericana.
124. Schroeder, A. C., & Privalsky, M. L. (2014). Thyroid hormones, t3 and t4, in the brain. *Frontiers in endocrinology*, 5, 40.
125. Nappi A, Murolo M, Cicatiello AG, Sagliocchi S, Di Cicco E, Raia M, Stornaiuolo M, Dentice M, Miro C. Thyroid Hormone Receptor Isoforms Alpha and Beta Play Convergent Roles in Muscle Physiology and Metabolic Regulation. *Metabolites*. 2022 Apr 29;12(5):405. doi: 10.3390/metabo12050405. PMID: 35629909; PMCID: PMC9145723.
126. Westermeier, F., Sáez, T., Arroyo, P., Toledo, F., Gutiérrez, J., Sanhueza, C., ... & Sobrevia, L. (2016). Insulin receptor isoforms: an integrated view focused on gestational diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 32(4), 350-365.
127. Tiedje C, Holtmann H, Gaestel M. The role of mammalian MAPK signaling in regulation of cytokine mRNA stability and translation. *J Interferon Cytokine Res*. 2014 Apr;34(4):220-32. doi: 10.1089/jir.2013.0146. PMID: 24697200.
128. Castillo-Castrejon M, Jansson T, Powell TL. No evidence of attenuation of placental insulin-stimulated Akt phosphorylation and amino acid transport in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019 Dec 1;317(6):E1037-E1049. doi: 10.1152/ajpendo.00196.2019. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31573844; PMCID: PMC6962503.
129. Shahid, M. A., Ashraf, M. A., & Sharma, S. (2018). Physiology, thyroid hormone.
130. Kavitha JV, Rosario FJ, Nijland MJ, McDonald TJ, Wu G, Kanai Y, Powell TL, Nathanielsz PW, Jansson T. Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon. *FASEB J*. 2014

- Mar;28(3):1294-305. doi: 10.1096/fj.13-242271. Epub 2013 Dec 13. PMID: 24334703; PMCID: PMC3929672.}
131. Ozmen A, Unek G, Kipmen-Korgun D, Cetinkaya B, Avcil Z, Korgun ET. Glucocorticoid exposure altered angiogenic factor expression via Akt/mTOR pathway in rat placenta. *Ann Anat.* 2015 Mar;198:34-40. doi: 10.1016/j.aanat.2014.10.007. Epub 2014 Nov 12. PMID: 25479925.
  132. Diehl, J. A. (2002). Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer biology & therapy*, 1(3), 226-231.
  133. Bourgeois NM, Van Herck SL, Vancamp P, Delbaere J, Zevenbergen C, Kersseboom S, Darras VM, Visser TJ. Characterization of Chicken Thyroid Hormone Transporters. *Endocrinology.* 2016 Jun;157(6):2560-74. doi: 10.1210/en.2015-2025. Epub 2016 Apr 12. PMID: 27070099.
  134. Kinne A, Wittner M, Wirth EK, Hinz KM, Schülein R, Köhrle J, Krause G. Involvement of the L-Type Amino Acid Transporter Lat2 in the Transport of 3,3'-Diiodothyronine across the Plasma Membrane. *Eur Thyroid J.* 2015 Sep;4(Suppl 1):42-50. doi: 10.1159/000381542. Epub 2015 May 28. PMID: 26601072; PMCID: PMC4640293.
  135. Carabantes, A. G., & de Fernicola, N. A. (2003). Arsénico en el agua de bebida: un problema de salud pública. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39, 365-372.
  136. Chan, KY, Zhang, L. y Zuo, Z. (2007). Cinética del transporte de eflujo intestinal de catequinas de té verde en el modelo de monocapa Caco-2. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* , 59 (3), 395-400.
  137. Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R. y Belfiore, A. (2002). Los receptores híbridos de insulina/factor de crecimiento similar a la insulina I presentan diferentes características biológicas según la isoforma del receptor de insulina implicada. *Journal of Biological Chemistry* , 277 (42), 39684-39695.
  138. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*, 22(2), 153-183.
  139. Robinson, M. J., & Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current opinion in cell biology*, 9(2), 180-186.
  140. Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell*, 169(3), 381-405.
  141. Ramos-García P, González-Moles MÁ, González-Ruiz L, Ruiz-Ávila I, Ayén Á, Gil-Montoya JA. Prognostic and clinicopathological significance of cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2018 Aug;83:96-106. doi:

10.1016/j.oraloncology.2018.06.007. Epub 2018 Jun 18. PMID:  
30098785.