



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO VARIABLE SOBRE EL
EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-TIROIDES EN RESPUESTA
AL FRÍO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

LIC. ANDREA CASTILLO CAMPOS

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. PATRICIA ILEANA JOSEPH BRAVO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DRA. EDITH SÁNCHEZ JARAMILLO
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "JUAN RAMÓN DE LA FUENTE"

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES
A MIS ABUELOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, Departamento de Genética del desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Patricia Joseph Bravo.

Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (becaria 772858), de DGAPA IN204316 y DGAPA IA200417, así como apoyo para congresos del PAEP 2018.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Patricia Joseph Bravo, por permitirme trabajar en el laboratorio, aceptar mis propuestas y tenerme paciencia a lo largo de todo el proyecto de maestría. Por sus regaños, sus consejos y consideración hacia mi persona.

Al Dr. Jean-Louis Charli por sus observaciones durante los seminarios, y por sus preguntas siempre acertadas.

A la Dra. Edith Sánchez Jaramillo y a la Dra. Teresa Morales Guzmán, por ser parte de mi comité tutorial, darme consejos, y estrategias que me permitieran llevar a cabo el proyecto de manera exitosa.

A los técnicos académicos: Q.I. Fidelia Romero Arteaga por su apoyo y consejos para llevar a cabo las técnicas de biología molecular y al Q.F.B. Miguel Cisneros Ramírez por su apoyo para hacer los RIAs.

A la Dra. Mariana Gutiérrez Mariscal por todo su apoyo y enseñanza en el manejo de los animales en el bioterio, por su ayuda durante los largos protocolos de conducta.

A la Dra. Lorraine Jaimes-Hoy por el apoyo otorgado con el donativo DGAPA IA200417, así como por su apoyo en distintos protocolos como las ELISAs y los sacrificios.

A Manuel Villa por su apoyo en los sacrificios de los animales y su ayuda en el bioterio cuando se me hacía imposible llegar antes de las 7 am.

A la M.V.Z Elizabeth Mata, M.V.Z. Graciela Cabeza y Sergio Trujillo, así como a todos los integrantes del bioterio por su apoyo con los animales durante los fines de semana.

A Gloria Villa y a Antonio Bolaños de la unidad de docencia por todo el apoyo otorgado para obtener apoyos para congresos, y para los distintos trámites que son necesarios a lo largo de la maestría.

A todos todos mis compañeros del laboratorio por las risas bajitas y los chistes malos, su apoyo y por hacer que mi estancia en el lab fuera mucho más amena, en verdad no hay uno solo a quien no pueda agradecerle algo.

A Miguel Olvera por su apoyo administrativo.

Agradezco infinitamente a mis padres, Norma y Joaquín, por apoyarme siempre, por estar atrás de mi todo el tiempo y por quererme tanto. A mis hermanos Mariana y Mario, por ser un par de mensos bastante divertidos a los que quiero un montón.

A mis abuelos, porque a pesar que a veces no me entienden, me escuchan y me apoyan incondicionalmente, por amarme tanto. Todavía no sé cómo regresarles todo lo que me han dado. Los amo

A mi familia, aunque me digan rara, perdón por ser la oveja científica de la familia, es que es muy chido estar de este lado.

A mis amigos, por estar ahí siempre, incondicionales.

Y a mi, por saber aguantar, ser persistente y no dejarme caer. Me amo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
LISTA DE ABREVIATURA	3
1.INTRODUCCIÓN	4
1.1 Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA)	5
1.2 Eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT).....	7
1.3 Respuesta neuroendócrina al frío como demanda energética	8
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	9
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPÓTESIS	10
5.OBJETIVOS	11
5.1 Objetivo General	11
5.2 Objetivos Particulares.....	11
6. METODOLOGÍA.....	11
6.1 Animales.....	11
6.2 Protocolo de Estrés Crónico Variable	11
6.3 Pruebas conductuales.....	13
6.3 Extracción de sangre	15
6.4 Exposición al frío.....	16
6.5 Sacrificio	16
6.6 Disección de PVN y BAT	16
6.7 Extracción de TRH de EM	17
6.8 Extracción de RNA	18
6.8.1 Extracción de RNA de PVN	18
6.8.2 Extracción de RNA de BAT	19
6.9 Radioinmunoensayos.....	19
6.9.1 RIA de CORT	20
6.9.2 RIA de TSH	21
6.9.3 RIA de TRH.....	21
6.10 ELISA de hormonas tiroideas.....	22
6.11 Cuantificación relativa de expresión genética por RT-PCR	22
6.10 Análisis estadístico.....	23
7. RESULTADOS	24
7.1 Consumo de alimento y ganancia de peso corporal.....	24
7.2 Análisis conductual	25
7.2.1 Laberinto en Cruz Elevada (EPM).....	25
7.2.2 Prueba de Campo Abierto (OFT)	27
7.3 Niveles de hormonas en suero.....	28
7.3.1 Corticosterona	28
7.3.2 TSH.....	29
7.4 Respuesta al frío	30
7.4.1 Temperatura.....	30
7.4.2 Respuesta del eje HPA.....	31
7.4.3 Respuesta del eje HPT	33

TRH en Eminencia Media (EM).....	34
Hormonas Tiroideas	35
7.4.4 Tejidos periféricos	37
7.4.5 Análisis semi-cuantitativo de los genes en BAT.....	38
8. DISCUSIÓN.....	39
9. CONCLUSIONES.....	42
10. PERSPECTIVAS	43
11. REFERENCIAS	44

RESUMEN

Los ejes Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) e Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT) son fundamentales para la supervivencia de los seres vivos. Estos ejes regulan las concentraciones de hormonas glucocorticoides y tiroideas, las cuales ejercen retroalimentación negativa a sus respectivos ejes regresándolos a la homeostasis. Las hormonas tiroideas son esenciales para la termogénesis; en respuesta a la exposición al frío se incrementan rápidamente los niveles de RNAm de TRH en PVN y TSH en suero, seguidos por incrementos en T3 y T4. T4 es transformada a T3 en el órgano termogénico, el tejido adiposo pardo (BAT). En estudios previos, se ha demostrado que el estrés o una inyección de corticosterona inhibe la activación del eje tiroideo en respuesta al frío. Ciertos tipos de estrés crónico pueden inhibir el eje tiroideo, pero los efectos que tiene sobre el eje en respuesta a estímulos de demanda energética aguda se desconocen. Ya que los animales pueden habituarse cuando se exponen al mismo tipo de estrés crónico, el objetivo de este trabajo fue estudiar cómo un protocolo de estrés crónico variable modifica la respuesta del eje tiroideo en respuesta a un estímulo agudo de frío. Para ello, utilizamos ratas macho adultas de la cepa Wistar, sometidas por 15 días a Estrés Crónico Variable (ECV). Al día 16, los animales fueron expuestos por 1 hr a 4° C o 22° C. Comparados con los animales naïf, los animales estresados disminuyeron su consumo de alimento. Las variaciones en los niveles de hormonas o RNAm se evaluaron por radioinmunoensayos o RT-PCR respectivamente. La concentración de Corticosterona en suero se midió a los días 1, 7 y 15 del ECV, y aumentó hacia el final del experimento, lo cual muestra que los animales no se habituaron al estrés. La exposición al frío aumentó los niveles de RNAm de *Trh*, *Crh* y *Crhr1* en los hipotálamos de los controles experimentales, no así en los animales ECV. Los niveles de T4 en suero no muestran cambio a tiempos tan cortos de exposición, sin embargo, sí se observó una disminución en la concentración de T3 en los animales ECV. A nivel del BAT hubo un aumento en la expresión del RNAm de *Ucp1* en los controles experimentales, no así en los animales ECV, así como una disminución en la expresión de *d2*. Estos resultados corroboran la hiperactividad del eje HPA por ECV y apoyan la hipótesis del efecto inhibitorio del eje HPT en respuesta al estímulo por frío. La disfunción en la respuesta del eje HPT puede contribuir a alteraciones en la homeostasis energética.

LISTA DE ABREVIATURA

ACTH – Corticotropina	HPA – Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal
AMPC - Adenosín monofosfato cíclico	HPT – Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides
BAT – Tejido adiposo pardo (Brown Adipose Tissue)	HSL – Hormona Sensible a Lipasa
CORT – Corticosterona	HT – Hormona Tiroidea
CRH – Hormona Liberadora de Corticotropina	OFT – Prueba de campo abierto (Open Field Test)
D2 – Desyodasa 2	PKA – Fosfocinasa A
ECV – Estrés Crónico Variable	PVN - Núcleo Paraventricular
EPM – Laberinto en cruz elevada (Elevated Plus Maze)	RES – Restricción de movimiento
GC - Glucocorticoides	RNA - Ácido Ribonucléico
SNC – Sistema Nervioso Central	RNAm - RNA mensajero
SNS – Sistema Nervioso Simpático	TRH – Hormona Liberadora de Tirotopina
T3 – Triyodotironina	TSH – Tirotopina (Hormona Estimulante de Tiroides)
T4 – Tiroxina	UCP1 – Proteína desacopladora 1
TRb – Receptor de Hormona tiroidea	WAT – Tejido adiposo blanco (White Adipose Tissue)

1.INTRODUCCIÓN

El estrés se define como el estado en el que la homeostasis se ve amenazada (Pervanidou & Chrousos, 2011). Existen dos tipos de estímulos estresantes que se pueden definir por el tipo de vías que activan, así como por las consecuencias en el organismo que las sufre: físicos y psicológicos (Girotti et al., 2006). Los estresores físicos como el ayuno, la exposición al frío o calor e infecciones, etc., pueden poner en riesgo la supervivencia inmediata del individuo; estos activan rutas somáticas y viscerales que activan núcleos del tallo cerebral, los cuales inervan el hipotálamo. (Lupien et al, 2009). Los estímulos estresantes del tipo psicológico generan una respuesta anticipada en el organismo que depende de la experiencia previa del individuo. El sistema límbico, constituido por amígdala, hipocampo y corteza frontal, procesa la información sensorial y emocional, envía señales al hipotálamo e inicia la respuesta al estrés. (Girotti et al., 2006). Algunos modelos animales de estrés psicológico son: restricción de movimiento, inmovilización, derrota social, ruido, etc. (Ramos A et al., 1998). Dentro del estrés crónico, se encuentra

En respuesta a cualquier tipo de estresor agudo, se estimulan simultáneamente el Sistema Nervioso Simpático (SNS), y el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA). Las respuestas concertadas de estos sistemas restauran la homeostasis que consiste en mantener en un estrecho rango los parámetros fisiológicos vitales para la supervivencia (Charmandari et al., 2005). El hipotálamo es el principal integrador neuroendócrino, y el responsable de mantener la homeostasis. Está compuesto de varios núcleos neuronales de los cuales el Núcleo Paraventricular (PVN) es fundamental en la respuesta endócrina al estrés controlando la actividad del eje HPA (McEwen, 2001).

La activación del Sistema Nervioso Simpático (SNS) estimula la liberación de epinefrina al torrente sanguíneo al activar la médula adrenal, y de norepinefrina en órganos periféricos; estas catecolaminas estimulan los receptores α y β adrenérgicos en órganos que coordinan respuestas cardiovasculares que redirigen el flujo sanguíneo al cerebro y músculo esquelético, para la respuesta de “pelea o escape” (Rabasa et al., 2015).

1.1 Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA)

La activación del eje HPA inicia con la estimulación de las neuronas parvocelulares del PVN, donde se sintetiza la CRH (Hormona Liberadora de Corticotropina) y la vasopresina, esenciales para coordinar la respuesta de la pituitaria, que sintetiza y libera la hormona adrenocorticotropina (ACTH). La ACTH controla la liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) de la corteza adrenal (Fig. 1). Los glucocorticoides (GC) actúan sobre varios órganos blanco a través de receptores MR y GR intracelulares y membranales, regulando múltiples actividades celulares, además de ser los efectores finales del eje, ya que un incremento en los niveles séricos de GC ejercen una acción de retroalimentación negativa, mediante los receptores GR inhiben la síntesis y liberación de CRH en el PVN y ACTH en la pituitaria, normalizando la actividad (Tsigos & Chrousos, 2002). Además, aferencias del núcleo supraquiasmático sobre neuronas CRHérgicas regulan la actividad circádica del eje HPA (Perreau-Lenz et al., 2004)

En rata, los niveles de GC aumentan en respuesta a un estresor desde los 5 minutos, alcanzando picos máximos a los 15-30 minutos, normalizándose a 1 o 2 hr dependiendo del estímulo y, en el caso del estrés psicológico, de la experiencia previa del individuo. (Tsigos & Chrousos, 2002). Entre las funciones de los GC se encuentra la redistribución de energía, aumentando la concentración de glucosa accesible a órganos periféricos para llevar a cabo cualquier actividad, por ejemplo, la contracción muscular (Myers & Herman, 2014).

Eje HPA

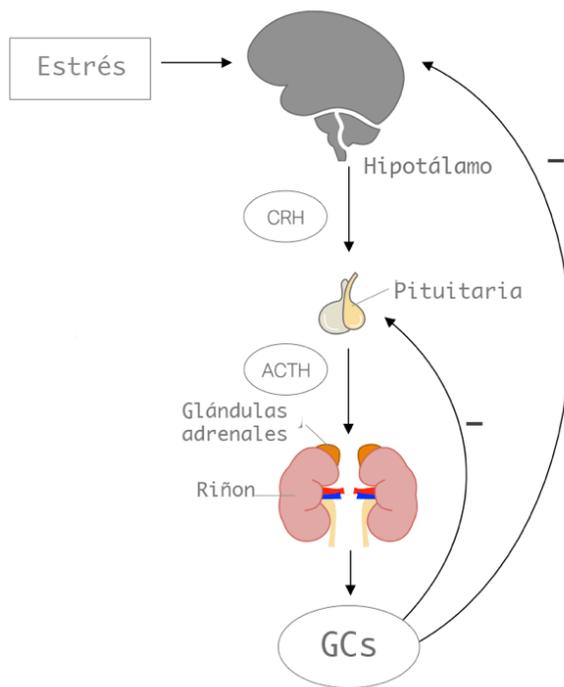


Fig. 1 Diagrama de la retroalimentación negativa del eje HPA

El estrés crónico produce cambios a largo plazo en la concentración de GCs circulantes que pueden causar desórdenes metabólicos, psicológicos, cognitivos y de ansiedad. El individuo se habitúa a un estrés crónico cuando éste es del mismo tipo (homotípico), pero no cuando es heterotípico como es el caso del estrés crónico variable (ECV). En ambos casos, el HPA responde ante un nuevo estresor (Koolhaas et al., 2011)

Ciertos tipos de estrés psicológico involucran la activación de regiones como la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal, que conforman el sistema límbico. Estas regiones se relacionan con el estado de ansiedad del individuo. Es una respuesta adaptativa que permite establecer un estado de alerta y en ciertos contextos promueve el aprendizaje (Flak & Herman, 2012)

1.2 Eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT)

La actividad del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT) está regulada por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Fig. 2), que es un tripéptido (pGLu-His-Pro-NH₂) sintetizado en las neuronas parvocelulares del PVN (Joseph-Bravo et al., 2015). Al igual que el eje HPA, la respuesta del eje HPT inicia con la activación de las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del PVN que liberan el péptido a la eminencia media (EM). La cantidad de TRH que llega a la pituitaria está regulada por la ectoenzima piroglutamil peptidasa II (PPII), presente en tanicitos cercanos a las terminales nerviosas y a los vasos portales; ésta degrada a la TRH en el espacio extracelular de la EM controlando que solo cierta cantidad de TRH viaje a la pituitaria anterior por la circulación porta-hipofisiaria. La TRH controla la síntesis y liberación de tirotrópina (TSH) en el tirotrópo, la cual se transporta por circulación sistémica hasta la glándula tiroides, estimulando la síntesis y liberación de las Hormonas Tiroideas (HT) T₄ y T₃. T₄ se libera en mayor proporción, y la conversión a T₃ ocurre por desyodación en varios órganos; la T₃ es la hormona activa a nivel transcripcional. El eje HPT está regulado por retroalimentación negativa, cuando las HT aumentan, actúan sobre sus receptores (TR_b), inhibiendo la síntesis de TSH en pituitaria anterior y TRH en PVN (Lechan & Fekete, 2004).

Entre las funciones principales de las hormonas tiroideas está regular la tasa metabólica basal y la termogénesis. El eje HPT mantiene la homeostasis energética al influenciar la ingesta de alimento y el gasto energético en tejidos metabólicamente activos, como el tejido adiposo pardo (BAT), el tejido adiposo blanco (WAT), hígado, páncreas y músculo esquelético.

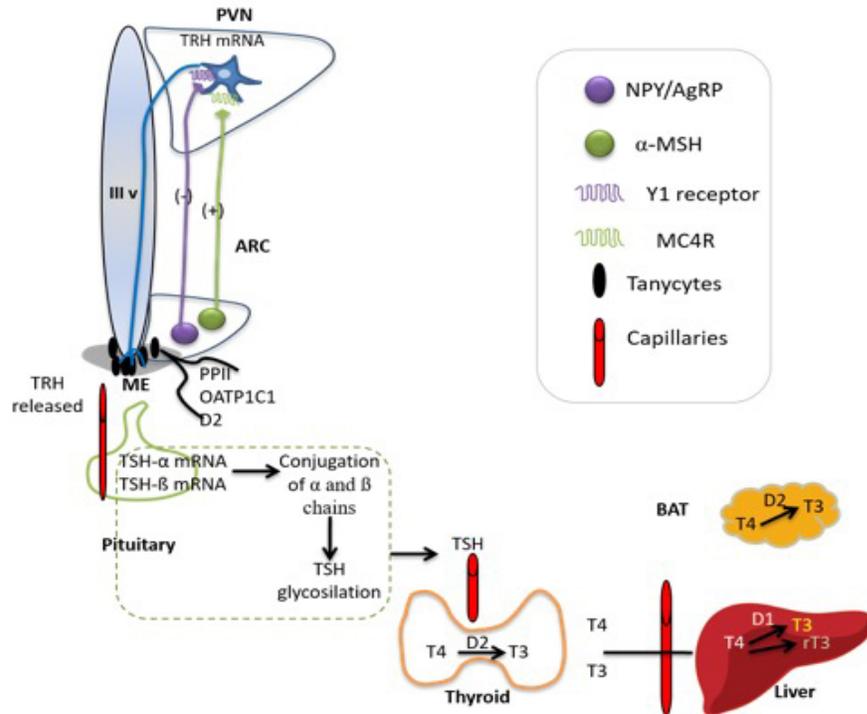
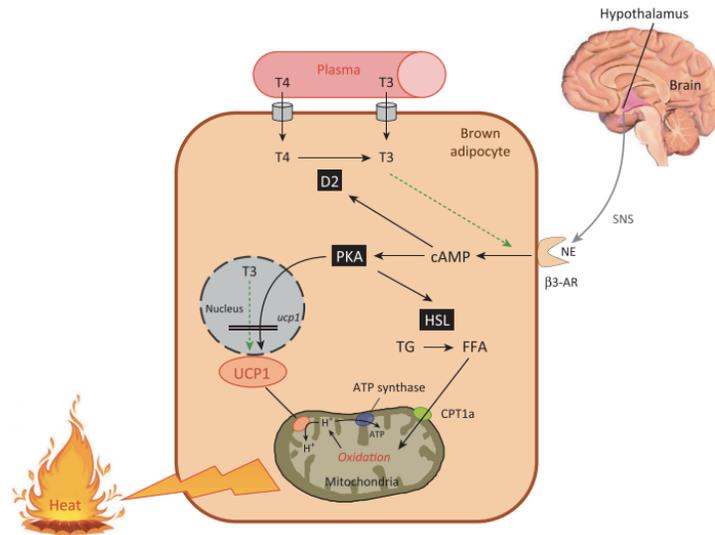


Fig.2 Modificado de (Patricia Joseph-Bravo et al., 2015). Diagrama del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT).

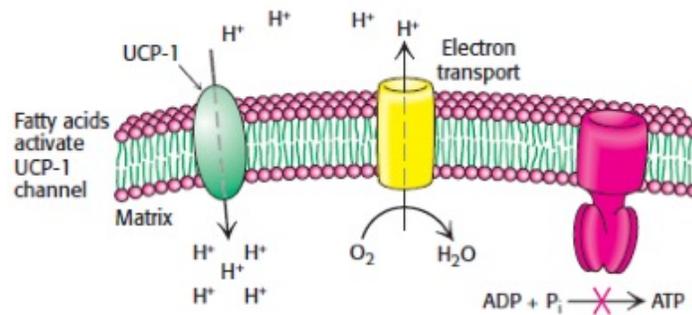
1.3 Respuesta neuroendócrina al frío como demanda energética

La exposición al frío activa la termogénesis (generación de calor). Esto ocurre al activar neuronas sensoriales en la piel que envían señales nerviosas al hipotálamo a través de la espina dorsal (Tupone & Morrison, 2014), estimulando núcleos en el tallo cerebral que proyectan al núcleo Paraventricular (PVN), el área preóptica (POA) y el hipotálamo dorsomedial (DMH). El POA y el DMH proyectan al tallo cerebral y activan al Sistema Nervioso Simpático (SNS) que inerva al tejido adiposo pardo (BAT). En el PVN se activan las neuronas hipofisiotrópicas incrementando la síntesis y liberación de TRH (Sánchez & Uribe, 2001) activando al eje HPT. El SNS estimula al BAT, y aumenta los niveles de AMPc los cuales activan a la proteína cinasa A (PKA) que estimula a la desyodasa tipo 2 (Dio2) y a la lipasa sensible a hormona (HSL) que media la lipólisis. La Dio2 procesa T4 a T3, la cual tiene efectos transcripcionales sobre la misma D2 y sobre la proteína desacopladora 1 (UCP-1) de la cadena respiratoria mitocondrial. Las proteínas desacopladoras forman un canal de protones dentro del lumen mitocondrial, impidiendo que se lleve a cabo la

formación de ATP y liberando energía en forma de calor (Figura 3). La T3 contribuye además regulando la síntesis del receptor adrenérgico, y activa la lipólisis, que junto con la glucólisis, proveen la energía necesaria para que el proceso dure tiempos largos (López et al., 2013).



Lopez et al., 2013



Molecular Biology of the cell, 5ª ed.

Fig.3 Activación de la termogénesis en los adipocitos del tejido adiposo pardo (arriba) y la función de la proteína desacopladora 1 (UCP-1) en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria (abajo).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

La actividad del eje HPT se inhibe en por estrés agudo o crónico (Patricia Joseph-Bravo et al., 2015) .

Situaciones de estrés agudo reprimen el efecto estimulador de la exposición por una hora

al frío sobre la biosíntesis de TRH y niveles circulantes de TSH (Uribe et al., 2001);

La. Inyección de corticosterona previa a exposición al frío atenúa la respuesta del eje HPT y la respuesta del tejido adiposo pardo sobre la expresión de D2 en BAT y su actividad enzimática (I. Sotelo-Rivera et al., 2014).

El mecanismo involucrado en la interferencia de corticosterona a la señal neuronal involucra la interacción de GR activado con la PKA catalítica que impide el incremento de CREB-fosforilado en las neuronas de TRH del PVN y su unión al promotor del gen de Trh (Sotelo-Rivera et al., 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

La sociedad moderna está expuesta a distintos tipos de estrés, lo cual representa un reto constante a la vida diaria del individuo y contribuye al desarrollo de múltiples padecimientos. Se ha postulado que el estrés crónico es en parte responsable de la incidencia de obesidad y síndrome metabólico. La falta de una respuesta eficaz del eje HPT a consecuencia del estrés pudiera ser uno de los mecanismos que contribuye a los problemas metabólicos. Debido al efecto inhibitorio del estrés agudo en la respuesta al eje HPT y que la respuesta a un estresor depende de la historia previa del individuo, proponemos como modelo estudiar el estrés crónico variable en la respuesta del eje tiroideo a demandas energéticas, como lo es la exposición al frío.

4. HIPÓTESIS

El estrés crónico variable causará hiperreactividad del eje HPA que afectará el eje HPT en condiciones basales y su respuesta ante demandas energéticas, como la exposición al frío.

5.OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estudiar el efecto del estrés crónico variable en la respuesta del eje tiroideo a exposición al frío en ratas macho adultas.

5.2 Objetivos Particulares

- Estandarizar un protocolo de estrés crónico variable ya que los protocolos ya reportados tienen componentes que estimulan o inhiben al eje HPT, como ayuno, frío, o actividad física
- Comparar las respuestas conductuales de los animales estresados a lo largo del protocolo.
- Evaluar los parámetros bioquímicos (CRH, ACTH y Corticosterona) en respuesta al estrés, y los cambios en aquéllos que reflejan la actividad del eje HPT (TRH, TSH y HT)

6. METODOLOGÍA

6.1 Animales

Utilizamos ratas macho de la cepa Wistar de 2.5 meses de edad, mantenidas de 2-3 ratas por caja en un cuarto con temperatura y humedad controlada, y periodo de luz/obscuridad de 12 horas (7:00 am – 7:00 pm) con agua y comida *ad libitum*.

6.2 Protocolo de Estrés Crónico Variable

Se armaron tres grupos de animales: un grupo naif (N) de 6 animales que no fue manipulado y con acceso *ad libitum* a agua y comida; un grupo estresado (ECV) de 12 animales que fue sometido a las distintas formas de estrés dos veces al día. Se le deja una cantidad conocida y suficiente de alimento que fue cuantificada cada dos días; esta cantidad fue suministrada al siguiente día a un grupo pareado (P) de 12 animales, que fue el control experimental.

Todos los protocolos que se llevaron a cabo fueron aprobados por el comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se llevaron a cabo una serie de retos que cambiaban diariamente, utilizando modelos de estrés psicológico, de manera que el estado metabólico basal del animal no se viera afectado. Los tratamientos utilizados fueron: *Estrés por ruido blanco a 97db*. Esta prueba se llevó a cabo basándonos en el protocolo de Eraslan et al., 2015. En una sala aislada, utilizando una bocina y un sonómetro para medir los decibeles, se reprodujo un archivo.mp3 a 700hz en loop, teniendo una duración de 1hr. *Transporte en carrito*. Se colocaron las cajas de animales en un carrito de bioterio, y se hizo un recorrido por los pasillos del bioterio durante 15 minutos. Posteriormente los animales fueron devueltos a su sala respectiva. *Movimiento de cajas en anaqueles*. Las cajas de los animales del grupo ECV fueron llevadas a un anaquel externo, para no generar ruido a los demás animales en su sala. El objetivo de esta prueba es hacer una rotación de las cajas de animales en el anaquel, de modo que cada caja sea movida en promedio 6 veces de lugar. *Plataforma elevada*. (Fig 6b). Se mandaron a hacer plataformas circulares de 20cm de diámetro unidas con tubos metálicos de 1m de altura a una base inferior cuadrada de 45x45cm. Las plataformas se armaron en una sala experimental y se colocaron separadas una de otra, de modo que las ratas no tuvieran contacto entre sí. Los animales se colocaron en la parte superior durante 15 min. *Cambio en los periodos de luz/obscuridad*. Durante el periodo de luz (7:00-19:00 hrs.) los animales fueron llevados a una sala experimental, en donde se programó un temporizador para apagar o encender las luces cada cierto tiempo, con lapsos máximos de 1 hora. Aproximadamente 30 min antes de terminar el periodo de luz, los animales fueron devueltos a su sala, manteniendo el periodo de oscuridad de manera normal. *Restricción de movimiento (RES)* (Fig 6c). Los animales fueron llevados a una sala experimental, se colocaron dentro de tubos de acrílico transparente, con ranuras ajustables al tamaño del animal, y con orificios que permiten que el animal pueda respirar adecuadamente, la cola del animal queda por fuera, lo que permite enfriamiento. Este modelo es utilizado como estresor psicológico, ya que no produce daño físico al animal (Uribe et al., 2016). *Suspensión de la cola*. Basándonos en el protocolo de Can et al., 2011, los animales fueron llevados a un cuarto experimental, en donde se colocaron suspendidos de la cola unidos con cinta a

un cincho de plástico por 6 minutos. *Inclinación de cajas.* (Fig.6a) Las ratas fueron llevadas a una sala experimental, y mantenidas en sus cajas, fueron puestas en inclinación usando otra caja como base, de modo que el ángulo de inclinación fuera aproximado a 45°. Esta prueba tiene una duración de 1 hora. *Aislamiento durante la etapa de oscuridad (ISO ON).* Los animales del grupo experimental fueron llevados a una sala experimental y puestos en cajas individuales con agua y alimento, y se quedan aislados durante todo el periodo de oscuridad (17:00-7:00 hr.).

6.3 Pruebas conductuales

Se hicieron además, a los días 1, 2, 14 y 15 pruebas conductuales que permitieron evaluar el estado de ansiedad de los animales. Estas pruebas están reportadas como las mejores herramientas de medición de ansiedad en roedores, ya que miden la conducta innata de los animales, puesto que en la naturaleza, éstos tienen aversión por los espacios abiertos. Se utilizaron para ello los siguientes protocolos:

- Laberinto en cruz elevada (EPM) (Wilcox & Hirshkowitz, 2015). Se llevó a cabo los días 1 y 14 en una sala experimental adyacente a las salas de habitación con una cámara adaptada al techo y conectada a una PC con el programa Smart. El laberinto se encuentra a 70cm del piso e incluye dos brazos cerrados (BC) con paredes oscuras de 50x10x40 cm y dos brazos abiertos (BA) de 50x10 (San Diego Instruments, Co.). Los brazos están conectados por un área central de 10x10 cm.



Fig. 4 Estructura de acrílico para EPM

- Prueba de campo abierto (OFT) (Walsh & Cummins, 1976) Esta prueba se realizó los días 2 y 15 en una sala experimental adyacente a las salas de habitación y el laboratorio de sacrificio; cuenta con una cámara colocada en la parte superior del cuarto de modo que pueda grabar la locomoción del individuo durante la prueba. Los animales se colocan en una caja de acrílico negro de 100x100cm, con paredes de 70cm de alto (San Diego Instruments, Co.), y el movimiento es monitoreado por el programa Smart que analiza el recorrido del individuo durante un lapso de 5 min, en donde puede diferenciar las distintas áreas (centro o periferia) a las que entra el animal durante el tiempo que se mantiene en la caja.



Fig 5. (Izq) Trayectoria del individuo grabada por el programa Smart. (Der) Caja de acrílico para prueba de campo abierto (OFT)

La batería de pruebas fue definida de manera aleatoria durante 16 días, excepto EPM y OFT, que fueron las pruebas utilizadas al principio y al final del protocolo, para verificar el estado de ansiedad de los animales a lo largo del experimento.

Cada prueba se llevó a cabo de manera individual dos veces al día a distintas horas para evitar la habituación; así mismo, se midió el peso de los animales una vez a la semana.

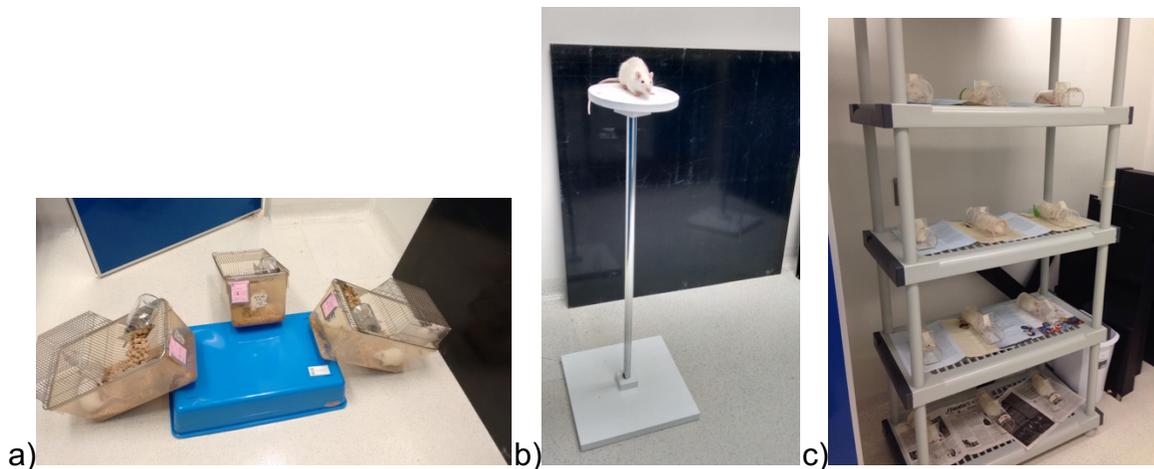


Fig.6 Fotografías de algunas de las pruebas de estrés utilizados en este experimento. Se muestran en a) inclinación de la caja, b) plataforma elevada y c) restricción de movimiento.

6.3 Extracción de sangre

Los días 1, 7 y 14 del experimento, se le extrajo sangre de la cola a los animales de los tres grupos, teniendo en el grupo ECV una muestra de antes y otra después de ser sometidos al tipo de estrés correspondiente a ese día. Para obtener la sangre, se realizó un corte en la punta de la cola, y se “ordeñó” en un microtubo de 1.5 ml. Las muestras se dejaron aproximadamente 20 min a temperatura ambiente y después se colocaron en hielo. Para obtener el suero, se centrifugaron las muestras a 3000 RPM por 25min y se guardaron a -20°C para su posterior análisis.



Fig. 7 Imagen del protocolo de extracción de sangre.

6.4 Exposición al frío

Veinticuatro horas después del último día en que se les sometió a algún tipo de estrés, las ratas fueron expuestas a frío. Un grupo de ratas de cada tratamiento (pareadas o ECV) fue mantenido a temperatura ambiente (TA), mientras el otro se mantuvo en cajas individuales sin alimento a 4°C durante 1h

6.5 Sacrificio

Al término de la exposición al frío, los animales fueron decapitados con una guillotina especial para ratas en el periodo de luz (10:00 am), alternando con los animales expuestos al frío y los que permanecieron a temperatura ambiente. La decapitación fue realizada por un técnico experimentado, limpiando el área entre cada individuo para no exponer a los animales a la sangre del animal sacrificado previamente.

Se obtuvo la sangre troncal, y se cortó el cráneo de la parte superior de la cabeza levantando cuidadosamente el cerebro y cortando el nervio óptico antes de extraerlo. Al cerebro en fresco se cortó la parte del hipotálamo mediobasal que contiene la eminencia media y se introdujo en un microtubo de 1.5µl en hielo seco. Los cerebros se colocaron sobre la corteza en hielo seco y una vez congelados fueron envueltos en parafilm y papel aluminio para ser almacenados a -70°C. Al cuerpo se le realizó una insición abdominal y se disecaron y pesaron tejido adiposo pardo (BAT), el tejido adiposo blanco (WAT) epididimal, retroperitoneal e interescapular, y las glándulas adrenales. El tejido adiposo pardo y una parte del tejido adiposo blanco epididimal se mantuvieron en hielo seco y guardaron a -70°C. La sangre troncal se centrifugó a 3000 RPM durante 25 min para obtener suero, se guardaron tres alícuotas de 500µl de suero por cada animal para su posterior análisis por inmunoensayos (ELISA, RIA)

6.6 Disección de PVN y BAT

Las rebanadas de cerebros congelados fueron hechas manualmente con base en el atlas de Paxinos & Watson y se extrajo el PVN localizado en -1.2 a -2.04mm del Bregma con

un sacabocados de 1mm de diámetro, manteniendo todo el material en hielo seco todo el tiempo.

De igual manera, el tejido congelado de BAT se colocó en una caja Petri con hielo seco triturado para obtener una porción que se extrajo con un sacabocados de 1mm de diámetro con peso aproximado de 0.250g. El tejido se colocó en microtubos de 1.5 µl y se procedió a la extracción de RNA o se guardó a -70°C hasta su uso.

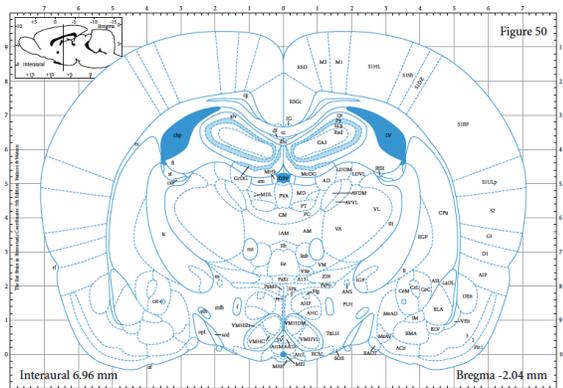
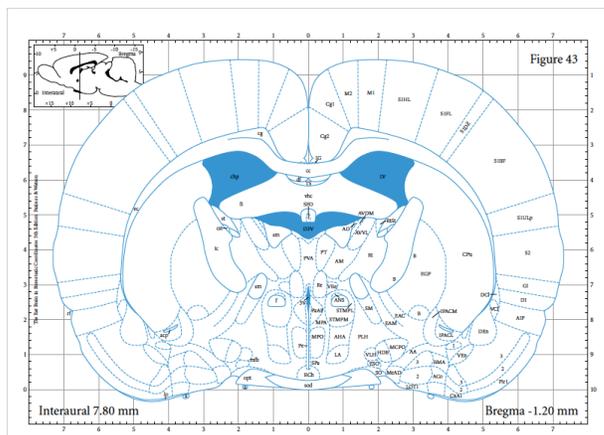


Fig.8 Coordenadas del atlas de Watson y Paxinos donde se encuentra el PVN.

6.7 Extracción de TRH de EM

Se siguió el protocolo modificado de Mendez et al., 1987, se sonicaron las muestras en 300µl de Buffer C ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2M + Na_2HPO_4 0.2M; pH=7.5), manteniéndolas todo el tiempo en hielo y haciendo seis ciclos de encendido/apagado en el sonicador. Se tomaron 100µl del homogenado y se le añadió ácido acético de manera que la concentración quedara al 20% (aproximadamente 24µl de ác. acético) y se mezcló

volteando el tubo. Después se centrifugaron a 10000RPM durante 20 min a 4°. Se obtuvo el sobrenadante y se le añadieron 100µl de metanol absoluto frío, se mezcló y se dejó precipitar toda la noche a 4°. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10000RPM por 20 min a 4°. Se tomaron 2 alícuotas de 500µl y se secaron mediante centrifugación al vacío en un evaporador Savant durante dos horas y media. Las muestras se guardaron a -20° hasta su posterior uso.

6.8 Extracción de RNA

Se extrajo RNA de todos los tejidos congelados. La extracción se llevó a cabo mediante el método de tiocianato de guanidina modificado de (Chomczynski, 1987).

SOLUCIONES	PVN	BAT
SOLUCIÓN D	150µl	500µl
ACETATO DE SODIO 2M PH4	15µl	50µl
FENOL	150µl	500µl
CLOROFORMO:ALCOHOL ISOAMÍLICO	30µl	450µl

Tabla 1. Volumen de soluciones utilizadas para las distintas regiones cuantificadas.

6.8.1 Extracción de RNA de PVN

Las muestras de PVN congelados se sonicaron en solución D (Tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25mM pH 7, sarcosyl 0.5%, 2-mercaptoetanol 0.1M) de acuerdo a los volúmenes de la tabla 1. Una vez homogeneizadas, se mantuvieron en hielo y se les añadió Acetato de Sodio ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$) 2M pH4. Se agitó en vortex unos segundos, posteriormente se le añadió fenol saturado en agua frío, se dejó reposar por un minuto y posteriormente se le añadió cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 49:1 para agitar nuevamente en vortex por 1 minuto. Las muestras se dejaron reposar en hielo por 15 min para después ser centrifugadas a 10,000 RPM (Centrífuga MIKRO 200R) por 22 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se le añadió un volumen de isopropanol; se mantuvieron a -20°C toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 13500 RPM por 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante teniendo cuidado de no tocar el precipitado, y guardando el sobrenadante en un tubo nuevo. La pastilla precipitada se lavó dos veces con etanol al 70% y se centrifugó a 13500RPM por 15 min a 4°C. Se tomo el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua DEPC libre de RNAsas.

6.8.2 Extracción de RNA de BAT

Las muestras congeladas se recolectaron en microtubos de 1.5ml cada una y se homogenizaron en solución D. Se siguieron los mismos pasos para la extracción de RNA de PVN con la diferencia en los volúmenes de las soluciones utilizadas de acuerdo a la tabla 1. Ya que el BAT es un tejido graso, se hicieron dos precipitaciones con solución D, retirando primero el exceso de grasa con una punta y recuperando el sobrenadante en un microtubo nuevo. Después de la última centrifugación, la pastilla se resuspendió en agua tratada con DEPC libre de RNAsas.

El RNA fue cuantificado en NanoDrop2000/2000c (ThermoFisher Scientific) utilizando 1µl de

Para cada tejido se hicieron alícuotas de 1µg de RNA, resuspendido en aproximadamente 12 µl de agua tratada con DEPC, y se hace un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del RNA extraído.

6.9 Radioinmunoensayos

Es un método de cuantificación que consiste en la competencia entre un antígeno marcado radioactivamente (Ag*) y su equivalente sin marca (Ag) que se unen a una cantidad limitada de anticuerpo específico (Ab)(Bailey, 1994). Ya que en principio la cantidad de Ab y Ag* se mantienen constantes, un aumento en la concentración de Ag promueve una competencia entre los sitios de unión del Ab. Debido a la alta sensibilidad de este sistema, se pueden medir concentraciones de pg/ml en tejidos o fluidos biológicos. Las concentraciones son determinadas mediante una curva estándar preparada con concentraciones de Ag* y Ag conocidas preparadas en tubos de ensayo de 12x75mm

(FisherBrand) de la siguiente manera:

- Curva estándar de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 pg de la hormona a medir
- Suero control por triplicado con volúmenes de 20-500 μ l resuspendidos en amortiguador RIA
- Controles por triplicado: tubo de cpm totales, que contiene solo la marca radioactiva (T); unión inespecífica (NSB) que contiene solo amortiguador RIA y la marca radioactiva; y Bo, que contiene amortiguador RIA, la marca radioactiva y el anticuerpo.

A pesar de que el principio es el mismo, el protocolo varía dependiendo de la sustancia que se quiere medir

6.9.1 RIA de CORT

Se hizo una dilución de los sueros 1:500 en amortiguador RIA (10mM de fosfatos pH 7.5, 150mM de NaCl y 0.1% de gelatina grado RIA (Biorad)). Los tubos con las diluciones de suero se pusieron en un baño de agua a 90°C durante 10 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente. Posteriormente se tomaron 500 μ l de cada muestra y se colocaron en tubos de ensayo; a cada una se le adicionaron 100 μ l de Ab contra CORT diluido 1/9000 y 100 μ l de 3 H-Corticosterona (Perkin-Elmer) equivalente a 10000cpm. Para realizar la curva estándar se realizaron triplicados de la siguiente manera: cpm totales (T): a cada tubo se le añadieron 800 μ l de amortiguador RIA + 100 μ l de 3 H-Corticosterona; NSB: 600 μ l de amortiguador + 100 μ l de 3 H-Corticosterona; Bo, Curva estándar y sueros control: 500 μ l de amortiguador + 100 μ l de Ab contra cort. Se incubaron todos los tubos por 24hr a 4°C y posteriormente se le añadieron 200 μ l de carbón-dextrán (SigmaAldrich 4g/250ml de amortiguador), se agitaron y se incubaron a 4^{oa} por 20 min. Posteriormente se centrifugaron a 3000RPM por 15 min a 4° y el sobrenadante se transfirió a viales de centelleo y se añadieron 4ml de líquido de centelleo (Ecolite MP Biomedicals). Se determinaron las cpm de cada vial en contador de emisiones β (Beckman).

6.9.2 RIA de TSH

A la curva estándar de este ensayo se le añadieron 200µl de amortiguador RIA (50mM de fosfatos pH 7.5 + NaCl 150mM + BSA1% + EDTA 50mM) y 100µl de Ab contra TSH. Para las muestras se utilizaron 50µl de suero + 100µl de Ab contra TSH + 150µl de amortiguador RIA. A todos los tubos se les adicionaron 100µl de ¹²⁵I-TSH (NIDDK). Los tubos se incubaron por 24hr a temperatura ambiente para posteriormente añadirles 100µl de Ab contra IgG de conejo diluido al 2.5% en PBS. Posteriormente se le añadieron a los tubos 100µl de suero normal de conejo al 2% en PBS y se incubaron por 2hr a temperatura ambiente; pasado el tiempo de incubación se les añadió Polietilenglicol al 4% y se centrifugaron a 5000RPM por 30 min. Se aspiró el sobrenadante con una bomba de extracción y se determinaron las cuentas por minuto en el contador gamma (γ) (LKB Miligamma counter).

6.9.3 RIA de TRH

Siguiendo el método descrito en (P. Joseph-Bravo et al., 1979), las muestras se resuspendieron en 250µl de amortiguador RIA (amortiguador de fosfatos 50mM pH7.5 + BSA grado RIA al 0.25% + NaCl 150mM + NaN₃ 0.02% en agua desionizada); se agitaron en vórtex y se centrifugaron por 5 min a 12000RPM a temperatura ambiente. De la fase acuosa se tomaron 100µl de las diluciones arriba descritas y 10000 cpm totales (T), NSB, Bo, y los estándares hipotalámicos (5-4000pg). A todos los tubos excepto a los T se les añadió 100µl de Ab y 100 µl del antígeno iodinado (¹²⁵I-TRH), se mezclaron suavemente con la pipeta y se dejaron incubar por 48hr a 4°. El TRH (Sigma) se iodino en el laboratorio de acuerdo a lo establecido en (Bhatnagar & Dallman, 1998). Posteriormente, se le añadieron 100µl de etanol frío y se centrifugaron a 4000RPM por 25 min a 4°. Se aspiró el sobrenadante cuidadosamente con una bomba de extracción y los precipitados se colocaron en el contador de radiaciones gamma (γ) (LKB Miligamma counter). Se colocaron primero 3 viales vacíos para eliminar el ruido de fondo para posteriormente colocar los tubos de cpm totales, NSB, Bo, estándares hipotalámicos y por último las muestras.

6.10 ELISA de hormonas tiroideas

El principio de este ensayo se basa en la detección de un antígeno inmovilizado mediante un anticuerpo acoplado a una enzima capaz de generar un producto detectable (Kiessig & Porstmann, 1992). En este caso, una cantidad de anticuerpo anti T3 o T4 según sea el caso está cubriendo la cavidad de los micropozos, de modo que una cantidad de suero de los individuos y una cantidad constante de T3 o T4 conjugada con la peroxidasa de rábano picante se agrega a los micropozos. Para estos ensayos se utilizaron kits de ELISA (Diagnóstica Internacional). Se preparó el conjugado de trabajo añadiendo 0.1ml del concentrado HT-HRPO a 2ml del diluyente del conjugado y se diluye un volumen de buffer de lavado en 49 volúmenes de agua destilada. En la placa, se colocaron 25 μ l de estándares y controles en la primera fila de la placa y se añadieron 25 μ l de suero problema en cada pozo; posteriormente se añaden 25 μ l del reactivo conjugado de trabajo en cada pozo. Se mezclaron durante 10 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 45 min; terminada la incubación, se removió la mezcla de incubación golpeando el contenido de la placa a un pozo de desechos, se lavó el exceso de la enzima con el buffer de lavado 1x 5 veces. Para quitar la solución de lavado, la placa se volteó en el pozo de desechos y se golpeó contra papel absorbente para quitar las gotas de agua residuales. Posteriormente se depositaron 100 μ l de solución TMB en cada pozo y se mezcló suavemente con la pipeta. LA placa se dejó incubando en obscuridad por 15 min y se detuvo la reacción añadiendo 100 μ l de solución de paro a cada pozo. Una vez puesta la solución de paro, las muestras en la placa obtuvieron un color amarillo que se leyó en un espectrofotómetro a 450nm. La intensidad del color formada es proporcional a la cantidad de enzima presente, y se relaciona inversamente a la cantidad sin etiquetar de HT en la muestra.

6.11 Cuantificación relativa de expresión genética por RT-PCR

Cada muestra de 1 μ g de RNA se incuba a 65°C por 5 minutos en un baño con agua caliente en el Multiblock (ThermoScientific), y después se mantuvo en hielo mientras se prepara la mezcla de reacción. Por cada muestra se añadieron 8.9 μ l de agua tratada con DEPC, 6 μ l de amortiguador RT 5x, 3 μ l de DTT, 1 μ l de oligo dT, 0.6 μ l de dNTPs, y 0.5

μl de enzima RT (M-MLV Invitrogen 200U/μl). Las muestras se incubaron en un baño a 37°C por 2 horas y posteriormente se guardaron a -20°C. Para las reacciones de PCR, se utilizaron 4μl de cDNA y por muestra se utilizaron 35 μl de agua, 5 μl de amortiguador de reacción, 1μl de oligo sentido, 1μl de oligo antisentido, 1μl de dNTPs, 2.5 μl de MgCl₂ y 0.5 μl de polimerasa termoestable (BioTecMol 5U/μl). Para cada par de oligos de cada región se tienen condiciones diferentes, las cuales se especifican en la tabla 1.

Los productos de reacción fueron cargados en geles de agarosa al 2% para electroforesis, usando además el marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (NewEngland BioLabs inc) y posteriormente se tiñó con Bromuro de Etidio, se reveló la imagen utilizando un transiluminador (BioRad Molecular Imager GelDocXR+) y se procedió a hacer la cuantificación por densitometría utilizando el Software Image Lab de BioRad.

Tejido	Gen	Longitud	Tm °C	Ciclos
PVN	TRH	358pb	64 °C	23
PVN	CRH	325pb	63 °C	28
PVN	CRHR1	250pb	55 °C	32
PVN	GR	639pb	64 °C	26
BAT	D2	250pb	64 °C	27
BAT	UCP1	450pb	64 °C	19
CONTROL	CICLOFILINA	500pb	64 °C	20

Tabla 2. Condiciones utilizadas para PCRs

6.10 Análisis estadístico

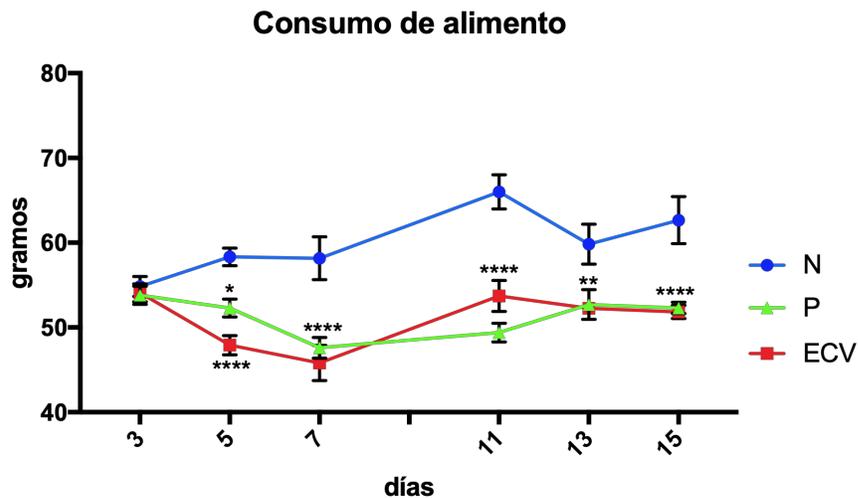
Utilizando el programa Graph Pad PRISM 7, se hizo el análisis estadístico de la mayoría de los datos utilizando ANOVA de una o dos vías dependiendo el caso. Para el análisis de una variable cuantificada en el mismo animal a distintos tiempos se utilizó la prueba de ANOVA de medidas repetidas, siendo el caso de consumo de alimento, ganancia de peso

y concentración de CORT y TSH a lo largo del experimento. Para todos los casos de utilizó la prueba Post-Hoc de Fisher para determinar si los resultados fueron estadísticamente significativos, considerando $p < 0.05$.

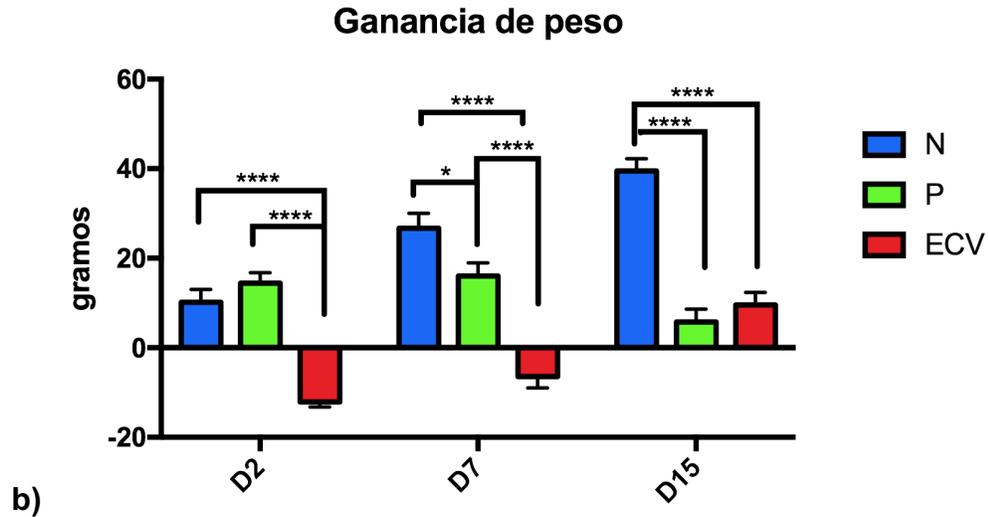
7. RESULTADOS

7.1 Consumo de alimento y ganancia de peso corporal

El consumo de alimento se midió cada dos días. Los animales se pesaron una vez a la semana. Encontramos que el estrés crónico variable disminuyó el consumo de alimento comparando con lo que come el grupo N; la disminución es notable los primeros días y a partir del día 7, el consumo aumentó gradualmente equilibrándose a partir del día 11. En la gráfica 9, el grupo pareado muestra un desfase con respecto a ECV en el consumo de alimento, pues se ofrece la cantidad registrada en el periodo anterior. El grupo pareado terminó con toda la comida que se ofrecía (exceptuando en 2 ocasiones). Comparando al grupo naïve (N), los dos grupos experimentales perdieron peso y tienen un menor consumo de alimento.



a)



Grupos	Peso inicial promedio	Peso final promedio	GdP promedio
N	451 ± 9.6	490 ± 11.2	40 ± 2.7
P	465 ± 19.6	471 ± 18.7	6 ± 2.8*
ECV	464 ± 19.3	474 ± 19.1	10 ± 2.8*

Fig.9 **a)** Consumo de alimento y **b)** ganancia de peso durante los 15 días de exposición a estrés crónico variable (ECV). N: Grupo naïve. P:Control experimental pareado al alimento de ECV. ECV: grupo experimental sometido a Estrés Crónico Variable. ANOVA 2 vías de medidas repetidas $P < 0.05$. Post-hoc: N vs P y ECV * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; **** $P < 0.0001$

7.2 Análisis conductual

7.2.1 Laberinto en Cruz Elevada (EPM)

En esta prueba se miden el tiempo, la distancia y el número de entradas que realiza el animal libremente a los dos brazos abiertos o los dos brazos cerrados. En esta prueba se cuantifica el número de entradas a los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en ellos y se asocian de manera inversa a la ansiedad; es decir, a mayor tiempo y entradas, menor ansiedad, mientras que el número de entradas a ambos brazos y el tiempo de permanencia en ambos brazos se asocia con la locomoción (Rodgers & Dalvi, 1997).

Se hicieron cuatro pruebas conductuales, durante los días 1 y 14 por la mañana (8:00-12:00) y por la tarde (13:00-17:00). En la fig.10 se observa que durante la prueba D14 am

los animales recorren mayor distancia en los brazos cerrados (BC), lo cual refleja que hay un efecto de ansiedad en los animales después de 13 días de ECV, además del estrés ocasionado por la prueba misma. La entrada a los brazos abiertos está inversamente relacionada con un aumento en los niveles séricos de CORT, congelamiento (freezing behavior), y producción de heces. La conducta exploratoria normal favorece la entrada a los brazos abiertos y en caso de ansiedad la permanencia en los brazos cerrados. (Hogg, 1996).

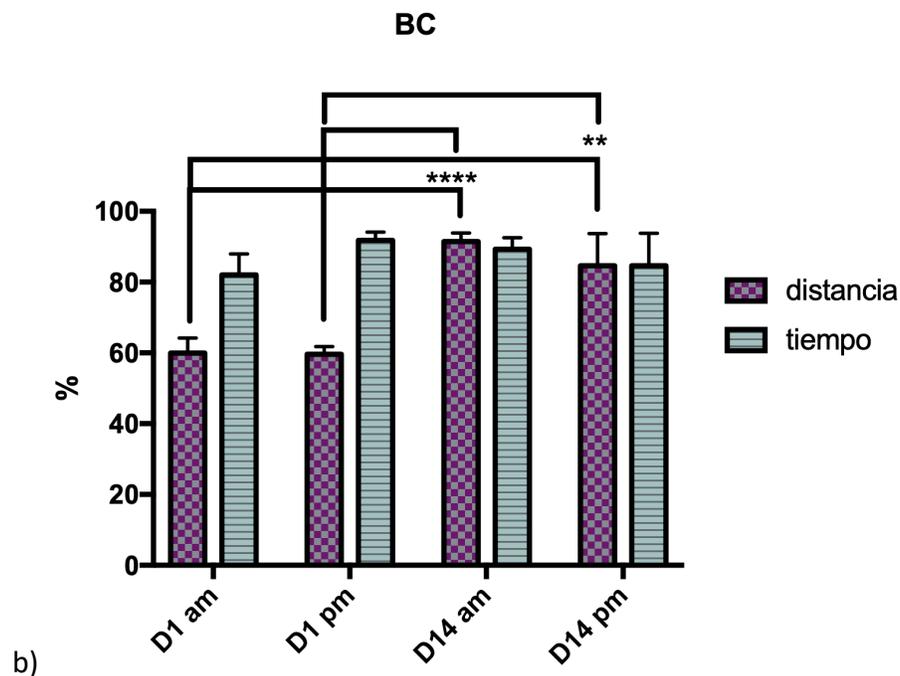
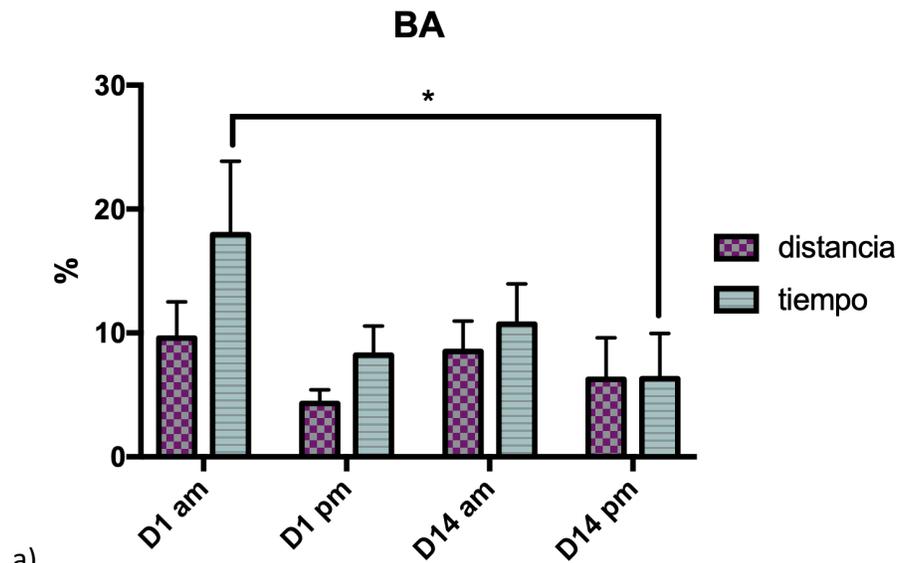
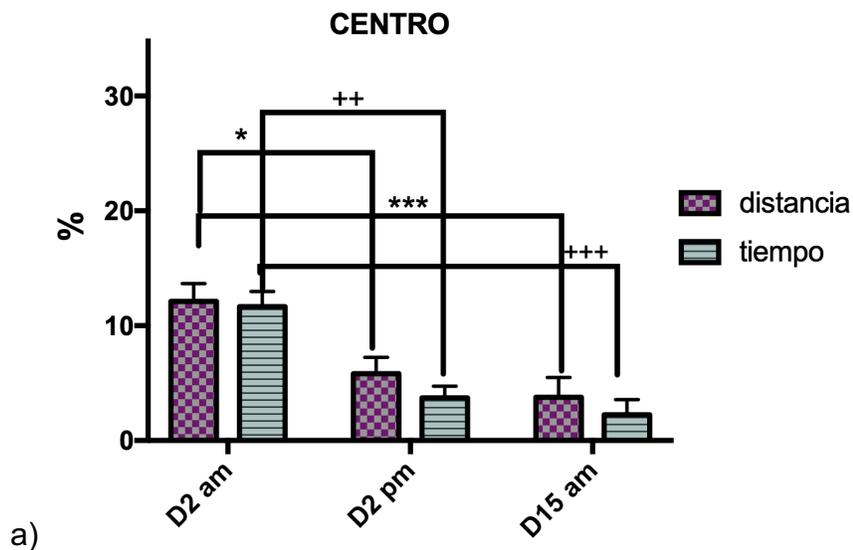


Fig.10. Distancia y tiempo reportada en porcentaje dentro de **a)** brazos abiertos (BA) y **b)** brazos cerrados (BC) a lo largo de todas las pruebas (D1am,D1pm,D14am,D14pm). 2wayANOVA. a) *Post-Hoc*: tiempo: D1amvsD14pm * $P < 0.05$; b) *Post-Hoc*: dist: D1amvsD14am *** $P < 0.0001$; D1amvsD14pm ** $P < 0.005$.

7.2.2 Prueba de Campo Abierto (OFT)

Desde su introducción, la prueba de campo abierto ha sido uno de los instrumentos más usados en el análisis de conducta de roedores debido a que es una prueba simple (Walsh & Cummins, 1976). Que el animal pase menor tiempo en el centro se considera como conducta ansiosa. También puede cuantificarse la locomoción del animal por la distancia recorrida en la periferia de la arena (Prut et al., 2003). A lo largo del experimento, la distancia y el tiempo en el centro van disminuyendo, como puede apreciarse en la fig.11a, lo que indica menor conducta exploratoria y podría ser debido a los estímulos estresantes previos. En la figura 11b se muestra la distancia recorrida y el tiempo de permanencia en la periferia, las cual aumenta a lo largo del experimento. Un aumento en la permanencia en la periferia y una disminución en la permanencia en el centro podrían ser indicativos de que el animal está ansioso.



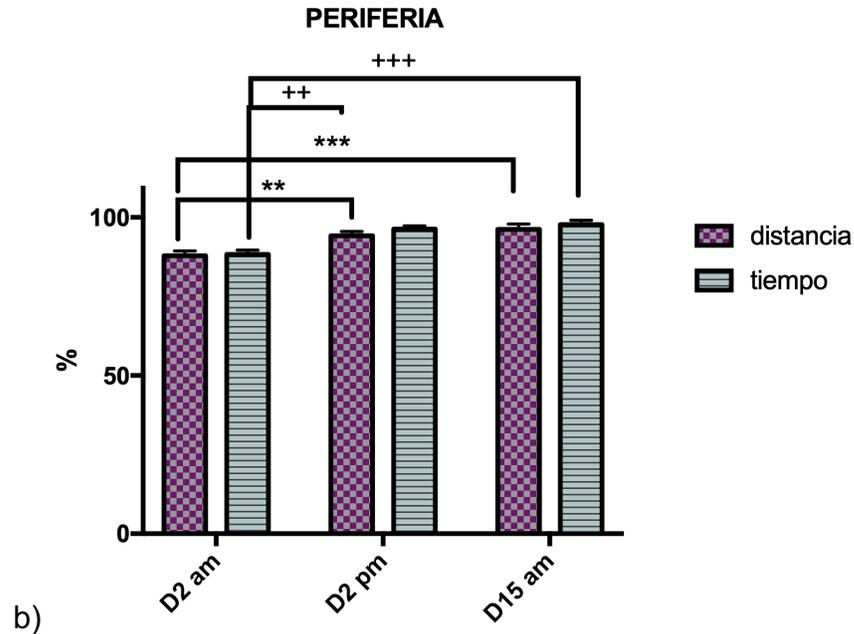


Fig.11 Gráficas de porcentaje de distancia y tiempo en OFT. 2wayANOVA $P < 0.05$ para ambos. a) Centro Post-hoc. dist:D2amvsD1pm $*P < 0.05$; D2amvsD15pm $***P = 0.0006$. tiempo:D2amvsd2pm $**P < 0.005$; D1amvsd15am $***P = 0.0001$. b) Post-hoc dist:D2amvsD2pm $**P = 0.009$; D2amvsD15am $***P = 0.0006$. tiempo:D2amvsD2pm $**P = 0.001$; D2pmvsD15am $***P = 0.0001$.

7.3 Niveles de hormonas en suero.

7.3.1 Corticosterona

Para monitorear la actividad del eje HPA resultante del protocolo de ECV a lo largo del experimento, usamos como parámetro los niveles de corticosterona (CORT) a los días 1, 7 y 15. La fig. 8 muestra las concentraciones de corticosterona a lo largo del experimento de todos los grupos, y en el grupo ECV antes y después del paradigma de estrés. Se observó que en el grupo ECV, la concentración de corticosterona sigue aumentando a lo largo del experimento, después de la exposición al estresor, indicando que el estrés crónico variable no genera habituación en los animales, contrario a lo reportado en el estrés crónico homotípico (Armario et al., 1993). Los resultados también muestran que los animales pareados están sometidos a estrés si se comparan con los niveles del grupo naif, que, aunque no son significativos, sí se ven aumentados y esto podría deberse a la restricción alimentaria a la que están sometidos.

CORTICOSTERONA

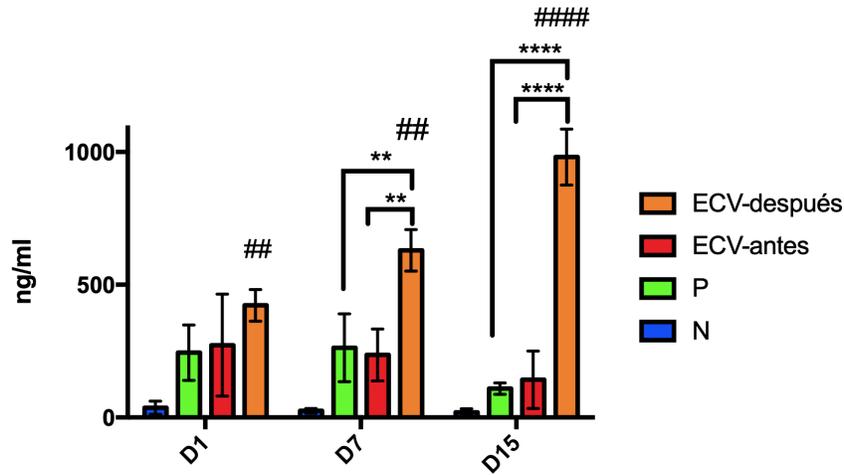


Fig.12 Concentración de corticosterona en suero a lo largo del protocolo de estrés crónico variable. Los niveles de Cort fueron cuantificados por radioinmunoensayos. D1, D7, D15: Días a lo largo del experimento (1,7 y 15 respectivamente) N: Grupo control naive. P: Grupo control experimental (pareado). ECV: Grupo Estrés crónico variable. ECV DESP: Grupo ECV después de ser expuesto a un estresor. 2wayANOVA $P < 0.05$. Post-hoc $**P = 0.002$ $****P < 0.0001$, $\#P < 0.05$, $####P < 0.0001$ (# indica dif vs N)

7.3.2 TSH

De acuerdo a lo reportado en la literatura, el estrés, ya sea agudo o crónico, disminuye la concentración de TSH en suero (Armario et al., 1987). De modo que en las muestras adquiridas para corticosterona, evaluamos también las concentraciones de TSH. En la fig. 13 se observa que a partir del día 7 hay una tendencia a disminuir la concentración en los animales ECV después de ser sometidos al estrés, y disminuye significativamente en el día 15. Esto va de acuerdo a que altos niveles de corticosterona tienen un efecto inhibitor sobre la liberación de TSH (Jobin et al., 1975)

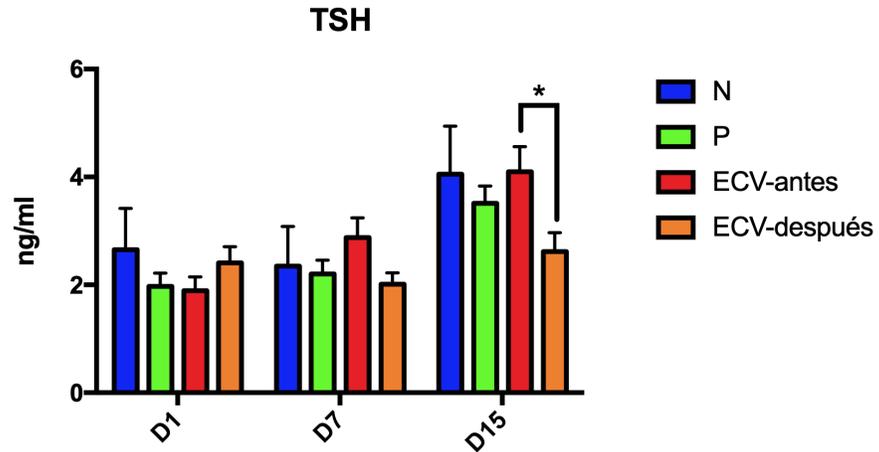


Fig.13 Concentración de TSH a los días 1, 7 y 15 del experimento por grupo, en rojo el grupo ECV antes de ser sometido al estrés y en naranja el grupo ECV después de ser sometido al estrés. N: Grupo Naive; P: control experimental pareado al alimento de ECV; ECV: grupo Estrés Crónico Variable. ANOVA 2 vías $P < 0.05$; Post-hoc $*P < 0.05$.

7.4 Respuesta al frío

7.4.1 Temperatura

Veinticuatro horas después del último estrés y 2 horas después del cambio de luz, los grupos de animales P y ECV fueron divididos en 2 y un subgrupo de cada uno fue expuesto por 1 hora a 4°C. La temperatura corporal se midió con un termómetro rectal al momento del sacrificio. La fig. 14 muestra la temperatura corporal promedio, sin mostrar cambios en los animales que fueron expuestos a frío durante 1hr, sugiriendo termogénesis adecuada.

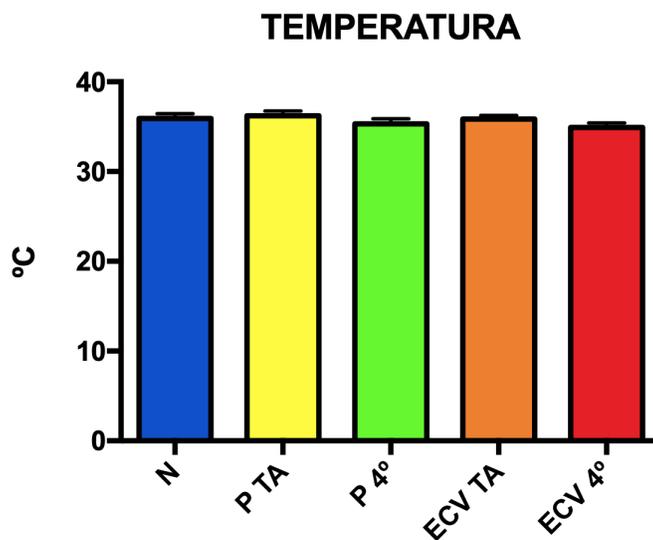
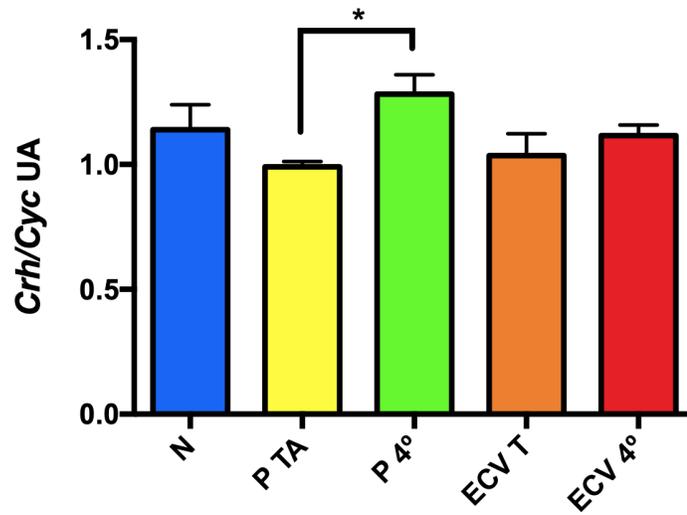


Fig.14 Temperatura corporal promedio por grupo. TA: Temperatura Ambiente N:Naïve, P: Control Experimental. ECV: Grupo Estrés Crónico Variable.

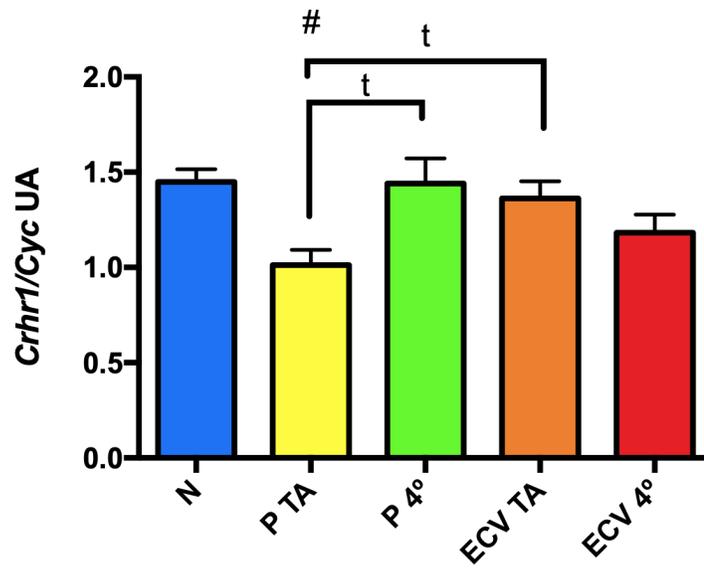
7.4.2 Respuesta del eje HPA

Para evaluar la actividad del eje HPA, se consideró analizar el nivel de expresión del RNAm de *Crh*, *Crhr1* y *Gr* en PVN y se midieron por RT-PCR semicuantitativa, usando ciclofilina como control interno.

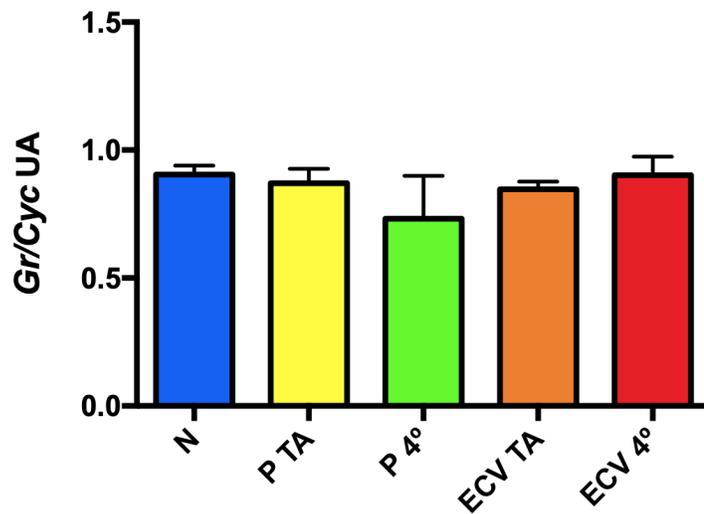
Los niveles de RNAm de *Crh* en PVN se mantienen sin cambio en los animales que fueron estresados, tanto a temperatura ambiente, como los expuestos a frío. En los animales del grupo pareado, se observa un aumento en los que fueron expuestos a frío. En el RNAm de *Crhr1* de nuevo se observa una diferencia entre los animales P TA y P 4° y en los animales ECV 4° hay una tendencia a disminuir ($P=0.055$) comparado con los del grupo mantenido a temperatura ambiente. En los niveles de RNAm del receptor de glucocorticoides *Gr*, no se vio ninguna diferencia entre ninguno de los grupos.



a)



b)



c)

Fig.15 **a)** Expresión relativa de *Chr* en PVN. ANOVA $P < 0.05$ SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA PTA vs P4º * $P < 0.05$ Indicando que responden al frío como estresor agudo. **b)** Expresión relativa de *Crhr1*, significancia estadística por prueba de t en los grupos PTA vs P4º $^{\dagger}p < 0.05$, y en PTA vs ECV TA $^{\ddagger}P < 0.05$; # indica diferencia contra N $^{\#}P < 0.05$. El panel **c)** expresión relativa de *Gr*. No observamos cambios entre los grupos. Datos expresados en unidades arbitrarias (UA)

La concentración de corticosterona al momento del sacrificio aumenta en los animales expuestos a frío, así como los animales ECV 4º también respondieron al frío como un estresor agudo.

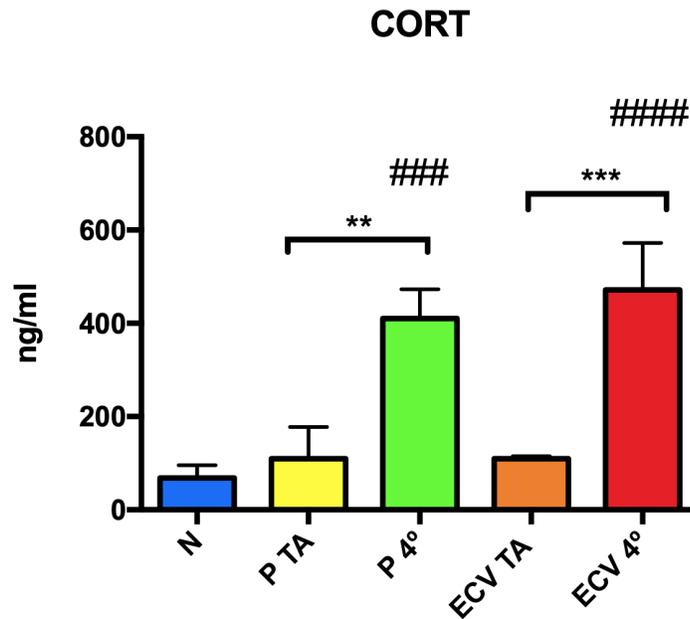


Fig.16 Concentración de corticosterona en suero. ANOVA $P < 0.05$. Post-hoc PTA vs P4º $^{**}P = 0.0017$. ECVTA vs ECV4º $^{***}P = 0.002$. ### significancia estadística N vs P4º y ECV4º $P < 0.0001$. N: grupo naive; PTA: grupo control experimental a temperatura ambiente. ECVTA: grupo Estrés Crónico Variable a temperatura ambiente.

7.4.3 Respuesta del eje HPT

Para evaluar la respuesta del eje HPT, se cuantificó la expresión de RNAm *Trh* en PVN, usando ciclofilina como control interno. En el grupo pareado a 4º hubo un aumento significativo con respecto al grupo pareado a TA, y esto no se observa en los grupos de animales ECV.

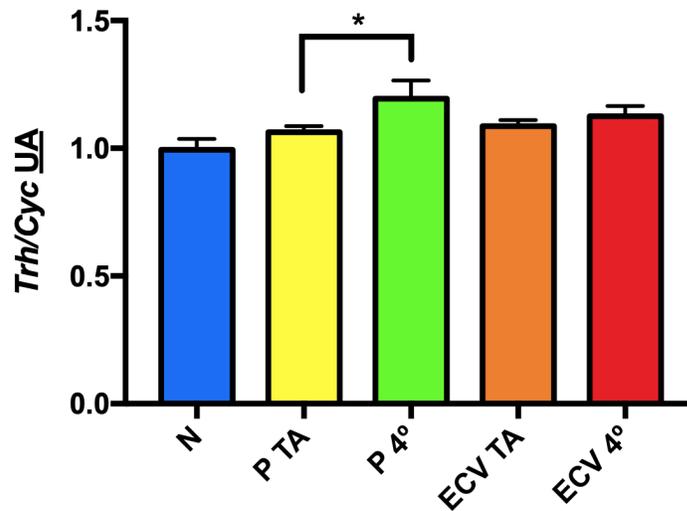


Fig.17 Niveles de expresión de *Trh*. Aumento significativo PTA vs P4° *P<0.05. No hay cambio en los animales estresados expuestos a frío.

TRH en Eminencia Media (EM)

Se cuantificó la cantidad de péptido de TRH en la EM por radioinmunoensayo (RIA). La EM es la parte del hipotálamo de donde se liberan los péptidos hipofisiotrópicos (Joseph-Bravo et al., 2016). Encontramos que los niveles de TRH en los animales del grupo P4° disminuyen en comparación con los P TA, y que en los animales del grupo ECV, tanto a TA como a 4° no presentan cambios, pero sí hay una disminución comparados con el grupo Naïve. Esto indica una mayor liberación de TRH en los grupos en los que la concentración es menor.

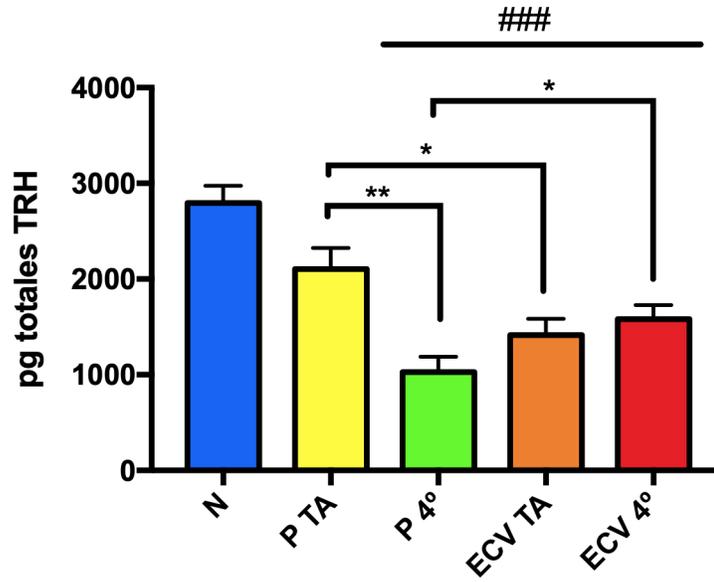


Fig.18. Cuantificación por RIA del péptido de TRH en extractos del hipotálamo mediobasal que incluyen la eminencia media. ANOVA $P < 0.05$. post hoc PTA vs P4º $**P = 0.002$. ### diferencia grupo N vs P4º, ECVTA y ECV4º $P < 0.001$. PTA vs ECVTA y P4º vs ECV4º $*P < 0.05$.

Hormonas Tiroideas

Se midió por ELISA la concentración de T4 y T3 en suero. En T4 no se observan diferencias en ninguno de los grupos lo cual no es sorprendente ya que a 1h de exposición al frío no siempre se detecta un aumento significativo en T4 (I. Sotelo-Rivera et al., 2014)

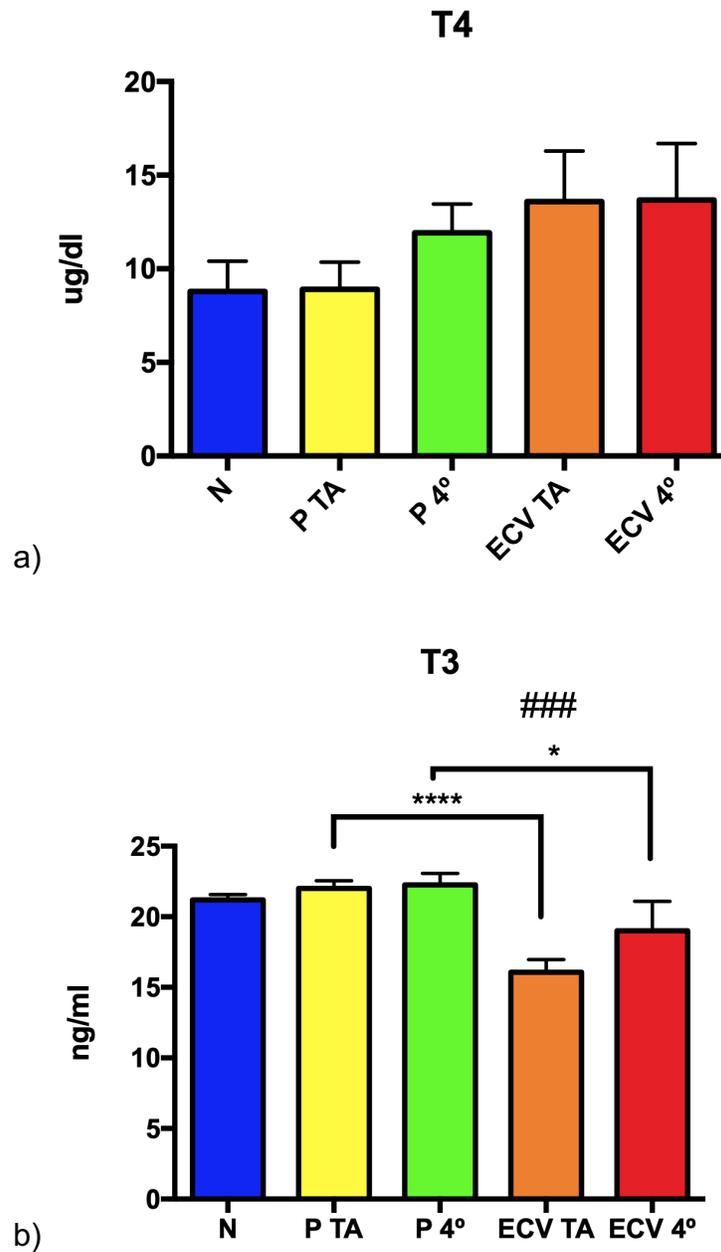
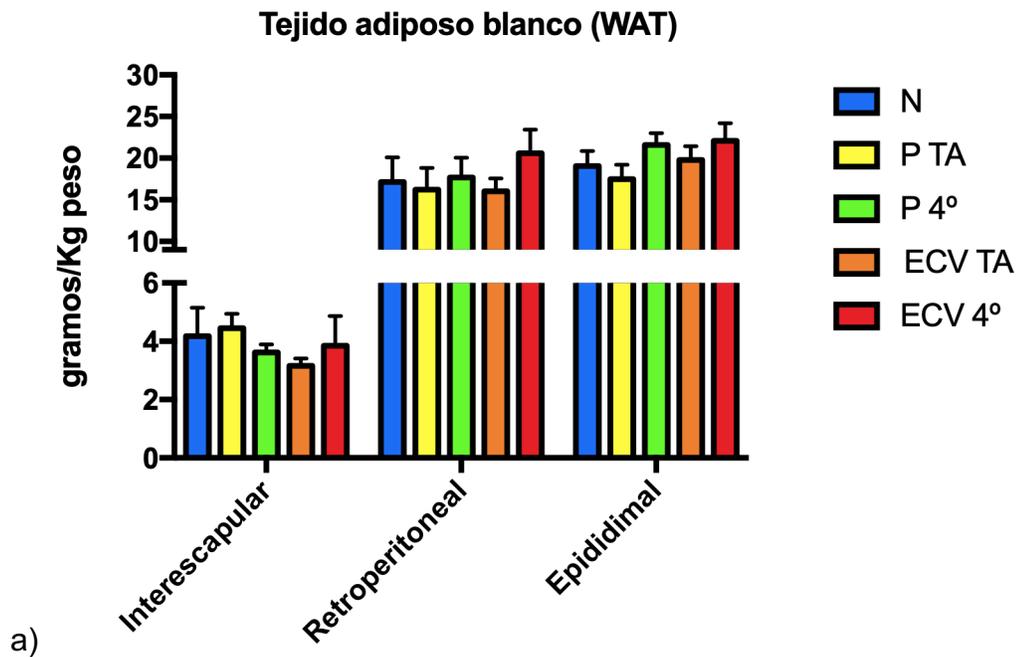


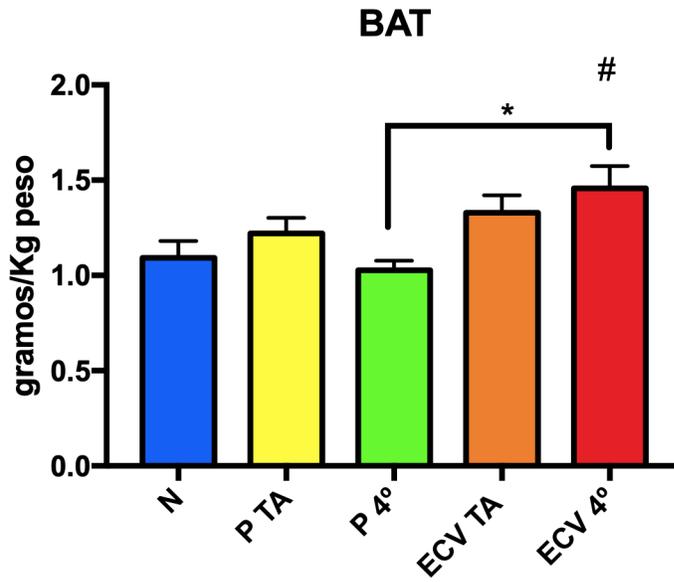
Fig.19 Concentración de hormonas tiroideas en suero. A) T4 sin diferencias. B) T3 disminuye significativamente en los animales estresados (ECV). ANOVA $P < 0.05$. Post-hoc: PTA vs ECVTA **** $P < 0.001$ - * $P < 0.05$ - ### Significancia estadística N vs ECVTA $P = 0.002$

La concentración de T3 en los grupos de animales ECV fue significativamente menor que en el grupo de animales P, tanto a TA como a 4°, coincidente con el efecto inhibitorio del estrés en la desyodasa hepática que transforma T4 a T3

7.4.4 Tejidos periféricos

Al momento del sacrificio, se extrajeron y pesaron las glándulas adrenales, tejido adiposo blanco (WAT) epididimal, retroperitoneal e interescapular y tejido adiposo pardo (BAT). En WAT no se observa ninguna diferencia en el peso de las grasas entre los grupos, la pérdida de peso que se observa a lo largo del experimento en los animales ECV, no se debe a la pérdida de grasa, sino posiblemente a la pérdida de masa magra (músculo). Esto podría explicarse debido a que el estrés crónico causa pérdida de masa magra (Tsigos & Chrousos, 2002). BAT presenta una disminución significativa en los controles experimentales expuestos a frío (P4°) comparados con los ECV 4°, que pudiera sugerir una mayor actividad del BAT del control al utilizar reservas de lípidos endógenos a tiempos cortos; sin embargo, esto puede respaldarse solo con la determinación de la expresión de genes termogénicos.





b)

Fig.20 a) datos de los pesos de la grasa blanca (WAT)b, normalizados con en peso corporal del animal. No hay diferencias. b) Peso de la grasa café (BAT)

7.4.5 Análisis semi-cuantitativo de los genes en BAT

La actividad termogénica del tejido adiposo pardo depende de la proteína desacopladora 1 (UCP-1) y de la desyodasa 2 (D2) que convierte T4 en T3 y es activada por SNS en respuesta al frío (Bianco & McAninch, 2013). La expresión de *Ucp1* aumentó significativamente en los animales del grupo P4° en comparación con el grupo P TA. En los animales ECV no se observan cambios, ni contra el grupo N. La expresión de D2 se ve disminuida en ambos grupos ECV, tanto los que se mantuvieron a TA, como los que se expusieron a frío en comparación con los animales del grupo N y P. No se observan diferencias entre los grupos P TA y P4°.

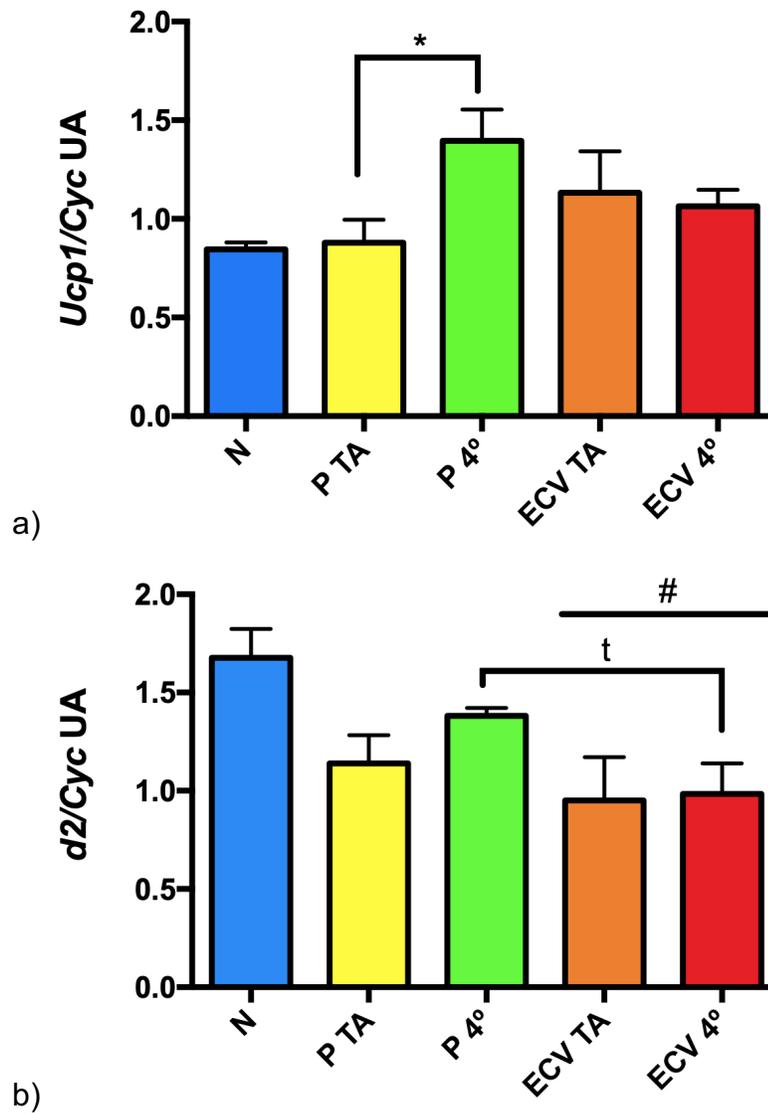


Fig.21 **a)** Niveles de expresión relativa de *Ucp1*. PTA vs P4° ANOVA $P < 0.05$; Post-Hoc: $*P < 0.05$

b) Expresión relativa de *d2*. ANOVA $P < 0.05$; Post-Hoc N vs ECVTA y ECV4° $\#P < 0.05$. Diferencia estadística por Ttest entre P4° y ECV4° $^tP < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

El objetivo de este proyecto fue investigar si el estrés crónico variable (ECV) afecta la respuesta del eje tiroideo al frío. Encontramos que someter a las ratas a distintos tipos de

estrés durante 15 días afecta de manera distinta parámetros ponderales, así como componentes tanto del eje HPA como del eje HPT. A lo largo del experimento medimos distintos parámetros que nos permitieron analizar la conducta alimentaria de los animales, entre ellos, el consumo de alimento y la ganancia de peso corporal. Los datos muestran que, como está reportado en (Armario, et al., 1994) y (Uribe et al., 2014a), los animales que están sujetos a estrés crónico disminuyen su consumo de alimento, alcanzando en este caso una diferencia de hasta el 18% comparado con el grupo naïf, lo cual repercute sobre su peso corporal. Sin embargo, el peso que pierden los animales ECV no se ve reflejado en el tejido adiposo, por lo que la pérdida pudiera ser de masa magra, al igual que en lo reportado por Harris et al., 2015.

Las pruebas conductuales revelan que los animales sujetos al protocolo de estrés crónico presentan una conducta ansiosa, que incrementa a lo largo del ECV demostrada en la disminución del tiempo que estuvieron en brazos los abiertos del EPM o en el centro para OFT, así como aumentada la concentración sérica de CORT al final de la última prueba diaria durante la aplicación de ECV.

Cuantificar la concentración de CORT en suero antes y después de un estímulo estresante a lo largo del experimento ECV nos permitió analizar la respuesta del eje HPA ante el estrés heterotípico. La concentración sérica basal de CORT no aumentó, pero la detectada después de la prueba fue aumentando, lo que refleja que el protocolo de Estrés Crónico Variable no causó habituación como ocurre con el estrés crónico homotípico, en donde los niveles de corticosterona se aplanan después de la primera semana (Rabasa et al., 2015). Los resultados muestran también que la concentración de CORT en los controles experimentales (P), está al mismo nivel de los animales ECV basal (ECV-antes) que podría deberse en parte a la restricción alimentaria a la que están sujetos (Uribe et al., 2014). De manera paralela, la liberación de TSH de los animales ECV se ve disminuida debido al aumento en la concentración de CORT en suero debida al estrés (I. Sotelo-Rivera et al., 2014).

Cuando los animales son expuestos a frío durante 1h, los niveles de CORT en suero de los grupos ECV y P aumentan, indicando que están respondiendo a un nuevo estresor físico agudo, independiente de la respuesta del estrés crónico previo. Se esperaba que la respuesta del eje HPA al estrés en los animales ECV estuviera aumentada debido al

protocolo de estrés previo, sin embargo, la expresión de RNAm de *Crh* incrementó sólo en los controles experimentales (P) a 4º, mientras que en los animales ECV, el nivel de expresión de *Crh* ya estaba alto, lo cual era esperado debido al estrés previo. Se ha comprobado que el estrés crónico heterotípico (Herman & Tasker, 2016) genera un aumento en la expresión de RNAm de *Crh* sugiriendo adaptación en las neuronas CRHérgicas que facilitan la respuesta al estrés. En relación a la expresión de RNAm del receptor de CRH, *Crhr1*, (Imaki & Miyata, 2001) demostraron que posterior al estrés agudo aumenta significativamente, lo cual sucede en los animales control experimental (P), pero no en los animales ECV, cuyos valores de expresión están elevados incluso en animales mantenidos a TA. Contrario a lo esperado de acuerdo a Heman & Prewit, 1995, en donde hay una aumento en la expresión de RNAm de *gr*, los niveles del mensajero del receptor de glucocorticoides (GR) no cambian.

Los niveles de RNAm de *Trh* en PVN aumentaron en los animales control experimental (P) expuestos a frío, si bien a menor concentración que lo que se observa en lo reportado por Sotelo-Rivera et al., 2014. (disminución del 40%). Como reportado en (Zoeller et al., 1991),(I. Sotelo-Rivera et al., 2014), la exposición por 1hr al frío estimula la activación del eje HPT en condiciones basales. La falta de aumento en los niveles de RNAm de *Trh* en los animales ECV demuestran que el estrés crónico afecta la respuesta correcta del eje tiroideo. Nuestros datos muestran la activación esperada del eje HPT a la exposición al frío en el grupo control experimental (P) (incremento en la expresión de RNAm de *Trh*, liberación de péptido de TRH a la EM, y la respuesta del tejido adiposo pardo (BAT)). Los niveles séricos de hormonas tiroideas no varían por el corto tiempo del estímulo, sin embargo, actúan en el órgano blanco (BAT) incrementando la expresión de UCP1 (Bianco & McAninch, 2013), pero solo en el control P. Una inyección de corticosterona previa a una exposición al frío atenúa la respuesta del tejido adiposo incluyendo la estimulación simpática de la desyodasa (I. Sotelo-Rivera et al., 2014). La disminución en la concentración de T3 en los animales ECV, y que los niveles de transcripción de RNAm de *Trh* en el PVN de estos animales no cambien, podría ser indicativo de que un protocolo de estrés crónico variable sí inhibe al eje tiroideo en condiciones basales, pero la respuesta esperada a la estimulación por frío en los controles experimentales estuvo muy atenuada de acuerdo a lo reportado previamente en trabajos del laboratorio (Sotelo-Rivera

et al., 2017). Creemos que los controles pareados estuvieron también bajo estrés ya sea por disminución de comida obligatoria y/o el estrés de las entradas y salidas del cuarto experimental durante el periodo de ECV del grupo experimental, por lo que es necesario mantener a los controles en cuartos separados.

Aunque especulativo, la respuesta atenuada en los controles experimentales P, pudiera deberse a que están estresados en comparación con los Naif (N), pues los niveles basales de CORT están aumentados 5.5x y no llegan a ser estadísticamente distintos a los basales ECV. La concentración de CORT más alta que en el grupo N sugieren un estrés crónico en este grupo (P), cuyo alimento está restringido, y permanece en el mismo cuarto que los ECV. El ruido provocado por entrar dos veces al día al sacar las jaulas experimentales y, el causado por los animales estresados a su regreso, muy posiblemente causan estrés en los demás animales, ya que Sterley & Bains, 2017 demostraron que existe un fenómeno de “propagación del estrés” cuando los animales estresados permanecen en cercanía con animales que no han sido expuestos al estrés, sin necesidad de tener contacto físico directo. Elegimos tener al grupo con alimento pareado al experimental, ya que la restricción de alimento no voluntario inhibe al eje tiroideo. Si bien la mayoría de los estudios que analizan el modelo ECV comparan los resultados con animales Naif. Recientemente repetimos el experimento adicionando un grupo N a 4^o y otro a TA; los resultados preliminares muestran un incremento de 50% de RNAm de *Trh* en N-frío y nula respuesta en ECV, lo que revela que, en condiciones basales de no estrés, el eje tiroideo responde al frío como demanda energética, aunque sea en situaciones agudas. El resto de las variables está por analizarse.

9. CONCLUSIONES

Con base en estos resultados podemos afirmar que un protocolo de estrés crónico variable modifica la conducta alimentaria de los individuos que son sometidos al mismo, reduciendo la ganancia de peso, sin perder peso en masa grasa. Además, disminuye la ingesta de alimento y el peso corporal, que son dos marcadores de estrés crónico severo, por lo que el paradigma de Estrés Crónico Variable es un estresor fuerte.

La actividad del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides se vio afectada por el estrés crónico previo ante 1hr de frío a nivel de las neuronas TRHérgicas, afectando la liberación de TRH a la EM.

A nivel hormonal, el ECV no genera habituación en los animales a lo largo de un protocolo de 15 días, además, los animales son capaces de responder a un estresor físico agudo, como es 1hr de exposición al frío, y esto se ve reflejado en la respuesta inmediata del eje HPA, que es la liberación de CORT.

El estrés crónico afecta la respuesta al frío a nivel periférico en el BAT al disminuir la expresión de D2.

10. PERSPECTIVAS

Hace falta repetir el experimento, manteniendo los controles experimentales y los Naif en un cuarto separado del grupo ECV y añadiendo un grupo de animales Naif que también sea expuesto a frío. Los grupos N TA y N F permitirán garantizar la respuesta conocida del eje HPT y dilucidar si el estrés de la dieta forzada es suficiente para atenuar la respuesta al frío como lo publicado (I. Sotelo-Rivera et al., 2014)

Además, habría que hacer extracción de RNAm únicamente de la parte parvocelular del PVN en lugar del PVN completo, de modo que la respuesta no se vea afectada por las neuronas magnocelulares, las cuales no tienen una acción neuroendócrina que ayude a la homeostasis, si no que solo podrían generar ruido en los resultados.

En el laboratorio se han llevado a cabo distintas estrategias que permiten reconocer la respuesta a diferentes estresores, y en todas se ha visto que el estrés crónico previo a una exposición a un estresor agudo inhibe la respuesta del eje tiroideo.

Lo que se busca con estas estrategias es identificar si existe algún circuito del estrés que esté afectando al eje tiroideo.

11. REFERENCIAS

- Armario, A., Garcia-Marquez, C., & Jolin, T. (1987). The effects of chronic intermittent stress on basal and acute stress levels of TSH and GH, and their response to hypothalamic regulatory factors in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, *12*(5), 399–406. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(87\)90069-2](https://doi.org/10.1016/0306-4530(87)90069-2)
- Armario, A., Mart??, O., Gavald??, A., Giralt, M., & Jol??n, T. (1993). Effects of chronic immobilization stress on GH and TSH secretion in the rat: Response to hypothalamic regulatory factors. *Psychoneuroendocrinology*, *18*(5–6), 405–413. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(93\)90015-D](https://doi.org/10.1016/0306-4530(93)90015-D)
- Bailey, G. S. (1994). Radioimmunoassay of peptides and proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *32*, 449–59. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:449>
- Bhatnagar, S., & Dallman, M. (1998). Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary- adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience*, *84*(4), 1025–1039. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00577-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00577-0)
- Bianco, A. C., & McAninch, E. a. (2013). The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homoeostasis. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, *1*(3), 250–8. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70069-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70069-X)
- Can, A., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., Bhat, S., & Gould, T. D. (2011). The Tail Suspension Test. *Journal of Visualized Experiments*, (58), 3–7. <https://doi.org/10.3791/3769>
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the Stress Response 1. *Annu. Rev. Physiol*, *67*, 259–84. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>
- Chomczynski, P. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction, *159*, 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Eraslan, E., Akyazi, I., Ergül-Ekiz, E., & Matur, E. (2015). Noise stress-induced changes in mRNA levels of corticotropin-releasing hormone family molecules and glucocorticoid receptors in the rat brain. *Folia Biologica (Czech Republic)*, *61*(2), 66–73.
- Flak, J. N., Solomon, M. B., Jankord, R., Krause, E. G., & Herman, J. P. (2012). Identification of chronic stress-activated regions reveals a potential recruited circuit

in rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 36(4), 2547–2555.

<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08161.x>

Girotti, M., Pace, T. W. W., Gaylord, R. I., Rubin, B. A., Herman, J. P., & Spencer, R. L. (2006). Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience*, 138(4), 1067–1081.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.12.002>

Harris, R. (2015). Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models? *American Journal of Physiology-Regulatory, and Comparative Physiology*, 308(4), R250–R265.

<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00361.2014>

Heman, J. P., Adams, D., & Prewit, C. (1995). Regulatory Changes in Neuroendocrine Stress-Integrative Circuitry Produced by a Variable Stress Paradigm. *Neuroendocrinology*, 61:180, 180–190. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Herman, J. P., & Tasker, J. G. (2016). Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Frontiers in Endocrinology*, 7(OCT), 1–10.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00137>

Hogg, S. (1996). A Review of the Validity and Variability of the Elevated Plus-MAze as an Animal Model of Anxiety. *Harmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 21–30.

[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02126-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02126-4)

Imaki, T., & Miyata, M. (2001). Expression of Corticotropin-Releasing Hormone Type 1 Receptor in Paraventricular Nucleus, 8533, 293–301.

Jobin, M; Delgado, A. (1975). Interactions between the Pituitary, Thyroid and Adrenal Cortex during Acute Exposure to Cold or to Electric Shocks in the Rat. *Horm Res Paediatrics*, 6, 199–212.

Joseph-Bravo, P., Charli, J. L., Palacios, J. M., & Kordon, C. (1979). Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*, 104(3), 801–806.

<https://doi.org/10.1210/endo-104-3-801>

Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., & Charli, J. L. (2016). Advances in TRH signaling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 17(4), 545–558.

<https://doi.org/10.1007/s11154-016-9375-y>

- Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., Uribe, R. M., & Charli, J. L. (2015). TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: Control of the pituitary-thyroid axis. *Journal of Endocrinology*, *226*(2), T85–T100. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0124>
- Kiessig, S. T., & Porstmann, T. (1992). Enzyme immunoassay techniques. *Journal of Immunological Methods*, *150*, 5–21.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., F?gge, G., Korte, S. M., ... Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*(5), 1291–1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Lechan, R. M., & Fekete, C. (2004). Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*, *27 Suppl*(6), 105–119.
- López, M., Alvarez, C. V., Nogueiras, R., & Diéguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(7), 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.004>
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*, *10*(6), 434–445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- Martí, O., Martí, J., & Armario, A. (1994). Effects of chronic stress on food intake in rats: Influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology & Behavior*, *55*(4), 747–753. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90055-8)
- McEwen, B. S. (2001). Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *933*, 265–277. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05830.x>
- Mendez, M., Joseph-Bravo, P., Cisneros, M., Vargas, M. A., & Charli, J. L. (1987). Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Peptides*, *8*(2), 291–298. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(87\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0196-9781(87)90104-5)
- Myers, B., McKlveen, J. M., & Herman, J. P. (2014). Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *35*(2), 180–196. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.12.003>

- Perreau-Lenz, S., Pévet, P., Buijs, R. M., & Kalsbeek, A. (2004). The Biological Clock: The Bodyguard of Temporal Homeostasis. *Chronobiology International*, *21*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1081/CBI-120027984>
- Pervanidou, P., & Chrousos, G. P. (2011). Stress and obesity/metabolic syndrome in childhood and adolescence. *International Journal of Pediatric Obesity : IJPO : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *6 Suppl 1*(January), 21–28. <https://doi.org/10.3109/17477166.2011.615996>
- Prut, L., Belzung, C., Rabelias, U. F., & Psychobiologie, E. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors : a review, *463*, 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Rabasa, C., Gagliano, H., Pastor-Ciurana, J., Fuentes, S., Belda, X., Nadal, R., & Armario, A. (2015). Adaptation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: A new perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *56*, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.06.013>
- Ramos A, & Mormede, P. (1998). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, *22*(1), 33–57.
- Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997). Anxiety , Defence and the Elevated Plus-maze, *21*(6), 801–810.
- Sánchez, E., Uribe, R., & Zoeller, R. T. (2001). Activation of Early Genes in Hypothalamic Neurons Differential Responses of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Neurons to Cold Exposure or Suckling Indicate Functional Heterogeneity of the TRH System in the Paraventricular Nucleus of the Rat Hypothalam. *Neuroendocrinology*, *62*(2), 407–422.
- Sotelo-Rivera, I., Cote-Vélez, A., Uribe, R. M., Charli, J. L., & Joseph-Bravo, P. (2017). Glucocorticoids curtail stimuli-induced CREB phosphorylation in TRH neurons through interaction of the glucocorticoid receptor with the catalytic subunit of protein kinase A. *Endocrine*, *55*(3), 861–871. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1223-z>
- Sotelo-Rivera, I., Jaimes-Hoy, L., Cote-Vélez, A., Espinoza-Ayala, C., Charli, J. L., & Joseph-Bravo, P. (2014). An acute injection of corticosterone increases thyrotrophin-releasing hormone expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus

but interferes with the rapid hypothalamus pituitary thyroid axis response to cold in male rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(12), 861–869.

<https://doi.org/10.1111/jne.12224>

Sterley, T., & Bains, J. S. (2017). Social transmission and buffering of synaptic changes after stress. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0044-6>

Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53(4), 865–871. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00429-4)

Tupone, D., Madden, C. J., & Morrison, S. F. (2014). Autonomic regulation of brown adipose tissue thermogenesis in health and disease: Potential clinical applications for altering BAT thermogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 8(8 FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00014>

Uribe, R. M., Jaimes-hoy, L., Ramírez-martínez, C., García-vázquez, A., Romero, F., Cisneros, M., ... Joseph-bravo, P. (2016). Voluntary Exercise Adapts the Hypothalamus- Pituitary-Thyroid Axis in Male Rats, 155(October), 2020–2030. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1724>

Uribe, R. M., Jaimes-Hoy, L., Ramírez-Martínez, C., García-Vázquez, A., Romero, F., Cisneros, M., ... Joseph-Bravo, P. (2014a). Voluntary exercise adapts the hypothalamus- Pituitary-Thyroid axis in male rats. *Endocrinology*, 155(5), 2020–2030. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1724>

Uribe, R. M., Jaimes-Hoy, L., Ramírez-Martínez, C., García-Vázquez, A., Romero, F., Cisneros, M., ... Joseph-Bravo, P. (2014b). Voluntary exercise adapts the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male rats. *Endocrinology*, 155(February), en20131724. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1724>

Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, 83(3), 482–504. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>

Wilcox, T., & Hirshkowitz, A. (2015). Circadian Phase and Sex Effects on Depressive/Anxiety-Like Behaviors and HPA Axis Responses to Acute Stress, 85(0 1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.045>.The