



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

## Facultad de ciencias

Respuesta al ejercicio voluntario en la lipólisis regulada  
por hormonas tiroideas de ratas adultas sometidas a  
estrés crónico variable durante la adolescencia.

**Tesis**

que para obtener el título de:

**Bióloga**

Presenta:

**Karen Lissette Garduño Morales**

Directora de tesis:

**Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo.**



Ciudad Universitaria, CD.MX., 2022.



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 las mujeres que lucharon y luchan por nuestros derechos, gracias a las cuales hoy tengo la oportunidad de estudiar y de perseguir mis sueños, mi eterno respeto, admiración y agradecimiento.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Bajo la asesoría de la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo y la dirección del M. en C. Marco Antonio Parra Montes de Oca. Financiada por CONACYT 284883 y la beca Apoyo para ayudante de investigador nivel III con CVU No. 1002710.

## Agradecimientos Académicos

- ◆ A la Dra. Patricia Joseph Bravo permitirme realizar mi trabajo de tesis bajo su dirección, por su orientación, consejos y correcciones durante esta etapa de mi formación.
- ◆ Al Dr. Jean-Louis Charli por sus observaciones durante los seminarios y el apoyo durante la realización de este proyecto.
- ◆ A la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll y al Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade por aceptar formar parte de mi jurado, tomarse el tiempo de leer mi trabajo y hacerme llegar sus observaciones.
- ◆ A la Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy por además de aceptar ser parte de mi jurado, asesorarme durante mi estancia en el laboratorio y siempre estar dispuesta a aclarar mis dudas.
- ◆ Agradezco infinitamente al M.C. Marco Antonio Parra Montes de Oca, por aceptar ser mi nana, por todo lo que me enseñó a lo largo de este proyecto, por tenerme tanta paciencia y orientarme siempre que tuve dudas. Por además de ser un maestro ser un amigo.
- ◆ A los técnicos académicos: Q.I. Fidelia Romero Arteaga por su apoyo y enseñanzas en cuanto a preparación de reactivos, uso de equipos y materiales del laboratorio y en el protocolo de extracción de RNA. Por su disposición a aclarar mis dudas y su paciencia. Y al Q.F.B. Miguel Cisneros Ramírez por las enseñanzas sobre el funcionamiento de los equipos del laboratorio.
- ◆ A la M.C. Andrea Castillo Campos por la forma en que me hizo sentir bienvenida, sus consejos tanto fuera como dentro del laboratorio y su apoyo en las pruebas conductuales.
- ◆ A Manuel Villa por su apoyo dentro del bioterio y en los sacrificios de los animales.
- ◆ A las M.V.Z. Elizabeth Mata, M.V.Z. Graciela Cabeza y a todas las y los integrantes del bioterio por su apoyo con los animales y su trato siempre amable.
- ◆ Al Dr. José Luis Puente por inspirar a las generaciones de biólogas y biólogos a entrar en el mundo de la biotecnología, por su apoyo durante toda la estancia y su interés en cada estudiante que entra al taller.
- ◆ A las y los integrantes del grupo de la Dra. Patricia Joseph y del Dr. Jean-Louis Charli por hacerme sentir bienvenida, por los consejos, el apoyo y la retroalimentación a lo largo del proyecto.

## **Agradecimientos personales**

*A mis padres por darme la vida, y al perreo por darme las ganas de vivirla.*

*Gracias a mi mamá, Laura Morales Alcaraz, por enseñarme a luchar, por todo el tiempo y dedicación que invirtió en mi cuidado y en asegurarse de que fuera una persona feliz, por las risas, los abrazos y el cariño. También por impulsarme a perseguir mis sueños y enseñarme a ser resiliente. Gracias a mi papá, Jorge Alberto Garduño García, por siempre procurar mi bienestar, por consentirme, por escucharme cuando lo necesito y aconsejarme si lo cree necesario. Por no dudar de mí e incentivarme a siempre ir por más. Por todo el amor que me han brindado a lo largo de mi vida, por todo el esfuerzo que han hecho para que no me falte nada, sin ustedes esto no sería posible. No podría haber pedido unos mejores padres y le agradezco infinitamente al universo por ello, les amo.*

*Gracias a mi hermana, Ana Laura Garduño Morales, por ser mi partner in crime, por apoyarme en cada decisión que tomo, por reír conmigo, por inspirarme y por siempre estar para mí, no sabes lo mucho que te amo. Gracias a ti sé que no hay nada que no pueda lograr si me lo propongo.*

*Gracias a mis abuelitas Esther y Cata por todo su apoyo y su amor incondicional.*

*Gracias a mi familia y amistades por echarme porras y creer en mí.*

*Gracias a Isis, Ale, Areli, Kevin, Ricardo, Luliz y Telléz por su amistad incondicional durante tantos años y todos los momentos felices que me han brindado.*

*Gracias a las amistades que encontré durante mi paso por la facultad, en especial a Alexis, Alan, Gabo, Jime, Natt, Oscar y Erick. Por las risas, las fiestas, los consejos, por acompañarme y por todo lo que me enseñaron desde que nos conocimos, les quiero mucho.*

*Gracias a Christopher, por estar para mí, por escucharme y apoyarme, por el amor y los aprendizajes, gracias por cada momento que ha hecho especial al compartirlo conmigo.*

*Gracias al Guajolocombo, Emily, Ana Elena, Kenya, Cony, Jonathan, Pablo, Cat, Xai y Miguel, me alegra mucho haber coincidido con ustedes.*

*Gracias a todas y todos los maestros que me han aportado a lo largo de mi vida un cachito de sus conocimientos y experiencias.*

*Gracias a las personas que se tomen el tiempo de leer este trabajo.*

## ÍNDICE

Resumen .....	6
Índice de tablas y figuras. ....	7
Abreviaturas .....	8
I. Introducción.....	9
II. Marco teórico .....	11
II.I Adolescencia .....	11
II.II. Estrés .....	12
II.III Generalidades del eje HPT.....	13
II.IV Ejercicio .....	15
II.V Tejido adiposo blanco y lipólisis. ....	16
III. Antecedentes .....	17
III.I Estrés durante la adolescencia .....	17
III.II Respuesta del eje HPT al estrés y demandas energéticas.....	18
IV. Justificación .....	19
V. Hipótesis.....	19
VI. Objetivos .....	19
VII. Materiales y Métodos .....	20
VII.I Modelo y diseño experimental .....	20
VII.II Pruebas conductuales .....	21
V.II.I Evaluación de la actividad locomotora en jaula con el sistema de actividad fotoeléctrica.....	21
VII.II.II Prueba de campo abierto.....	21
VII.II.III Laberinto Elevado de Cruz .....	22
VII.III <i>Protocolo de Ejercicio Voluntario</i> .....	22
VII.IV Variables ponderales.....	23
VII.V Sacrificio .....	23
VII.VI Extracción de RNA y RT-PCR .....	24
VII.VII Determinación de la concentración de hormonas tiroideas.....	24
VII.VIII Análisis estadístico .....	25
VIII. Resultados.....	26
VIII.I. El estrés crónico variable durante la adolescencia produce cambios en las variables ponderables dependiendo del sexo .....	26

VIII.II. Las ratas hembra tienden a ser más susceptibles al estrés crónico variable durante la adolescencia en comparación con las ratas macho.....	27
VIII.III. El ECV durante la adolescencia produce una mayor disminución de las variables ponderales atribuidas al ejercicio dependiendo del sexo .....	29
VIII.IV. El ECV durante la adolescencia reduce la disposición al ejercicio voluntario en la edad adulta. ....	30
VIII.V. El estrés crónico variable durante la adolescencia favorece la acumulación de tejido adiposo blanco en ratas hembras en la adultez. ....	31
VIII.VI. El ECV y el ejercicio voluntario no alteran los niveles de hormonas tiroideas en ratas de ambos sexos.....	32
VIII.VII. El estrés crónico variable durante la adolescencia afecta el metabolismo del tejido adiposo blanco .....	33
IX. Discusión .....	36
X. Conclusión .....	39
XI. Perspectivas .....	39
I. Referencias.....	40
II. Anexos .....	44



## Resumen

El estrés puede definirse como una perturbación de la homeostasis del organismo. Durante la adolescencia se desarrollan circuitos neuronales involucrados en el procesamiento del estrés, por lo que representa una etapa de vulnerabilidad ante estímulos estresantes. El estrés es principalmente procesado por el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) y por el sistema nervioso simpático (SNS), donde se desencadena una serie de cambios fisiológicos que permiten contender contra el estímulo. Una respuesta inmediata es la alteración del balance energético con el fin de proveer al organismo la energía necesaria en el momento en que se presenta el estresor. El balance energético es regulado principalmente por el eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroideas (HPT). Los ejes HPT, HPA y el SNS son regulados por múltiples factores externos como la alimentación, los ritmos circadianos, la actividad física y el estrés.

El estrés crónico ocasiona alteraciones que afectan al balance energético al actuar como inhibidor de la actividad del eje HPT, lo que puede ocasionar una disminución de la movilización de las reservas energéticas ante situaciones de demanda energética. Adicionalmente, el estrés crónico durante la adolescencia puede generar alteraciones en la maduración de los circuitos involucrados en el estrés dando como resultado una respuesta alterada en la edad adulta. En este trabajo se evalúa si el estrés durante la adolescencia inhibe la expresión de genes lipolíticos regulados por hormonas tiroideas a nivel del tejido adiposo blanco en una situación de demanda energética como es el ejercicio voluntario en la etapa adulta.

Para realizar el proyecto se utilizaron ratas macho (N=36) y hembra (N=36) de la cepa Wistar de 30 días de edad, que se mantuvieron en habitaciones separadas de acuerdo al sexo y grupo experimental. Fueron divididas en dos grupos, control (C) (n=18) y estrés crónico variable (ECV) (n=18), las ratas del grupo ECV fueron sometidas a un protocolo de estrés crónico durante la adolescencia (hembras: 30 días; machos: 40 días). Durante este periodo también se realizaron pruebas conductuales. Una vez terminado el protocolo y alcanzada la edad adulta las ratas de ambos grupos experimentales se dividieron en: un grupo sedentario con alimentación *ad libitum* (S) (n=6); un grupo ejercitado (Ex) (n=6) y; un grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio (PF) (n=6). Las ratas en los grupos Ex cumplieron con un protocolo de ejercicio durante 14 días, el cual consistió en colocar a las ratas individualmente en una caja que contenía una rueda de ejercicio entre las 19:00 h. y 7:00 h del día siguiente. Una vez concluido el protocolo de ejercicio los animales fueron sacrificados y se colectó sangre y tejido adiposo blanco (TAB) para su posterior análisis.

Se usaron pruebas ELISA para cuantificar la concentración de Hormonas Tiroideas en sangre, los resultados no mostraron un aumento en la concentración de hormonas tiroideas. Pero al analizar el tejido adiposo blanco por PCR se observa un aumento de desyodasa 2, lo que puede sugerir un aumento en la concentración de Hormonas Tiroideas (HT) en órganos blanco. Además, en los animales del grupo Control-Ejercitados (C-Ex) al compararlos con los animales del grupo de Estrés Crónico Variable-Ejercitados (ECV-Ex) se observa una mayor expresión de genes regulados por HT que han demostrado estar involucrados en la regulación al alza de la lipólisis. Lo que nos lleva a concluir que el estrés durante la adolescencia produce una atenuación en la expresión de ciertos genes involucrados en la lipólisis y regulados por HT, en respuesta al ejercicio voluntario en el tejido adiposo blanco en la etapa adulta independientemente del sexo.

## Índice de tablas y figuras.

*Tabla 1. Variables Ponderales-Adolescencia/Protocolo de ECV.*

*Tabla 2. Prueba de campo abierto (OFT).*

*Tabla 3. Prueba de Laberinto Elevado en Cruz (EPM).*

*Tabla 4. Evaluación de la actividad locomotora en jaula con el sistema de actividad fotoeléctrica (PAS).*

*Tabla 5. Variables Ponderales-Adultez/Protocolo de ejercicio.*

*Figura 1. Periodo de pubertad y periodo estimado de adolescencia en ratas hembra y macho.*

*Figura 2. Respuestas al estrés.*

*Figura 3. Sistemas neuroendocrinos involucrados en la regulación del balance energético y sus efectos en diferentes órganos blanco.*

*Figura 4. Diagrama general de la Lipólisis*

*Figura 5. Cronograma del diseño experimental.*

*Figura 6. Distancia recorrida por los animales ejercitados.*

*Figura 7. Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario en el peso del tejido adiposo blanco de ratas macho y hembra.*

*Figura 8. Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio sobre la concentración sérica de HT de ratas macho y hembra.*

*Figura 9. Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario en los niveles de expresión de Dio2 en ratas hembra y macho.*

*Figura 10. Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario en los niveles de expresión de Adrb3 en ratas hembra y macho.*

*Figura 11. Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario en los niveles de expresión de HSL de ratas hembra y macho.*

## Abreviaturas

<b>ACTH</b>	Corticotropina
<b>Adrb3</b>	Receptor adrenérgico $\beta$ 3
<b>AVP</b>	Arginina vasopresina
<b>AGL</b>	Ácido Graso Libre
<b>ATGL</b>	Lipasa Adiposa de Triacilglicéridos
<b>BE</b>	Balance Energético
<b>CRH</b>	Hormona Liberadora de Corticotropina
<b>DG</b>	Diacilglicerol
<b>Dio2</b>	Desyodasa 2
<b>DPN</b>	Día Postnatal
<b>ECV</b>	Estrés crónico variable
<b>E</b>	Epinefrina
<b>EPM</b>	Prueba de Laberinto Elevado (Elevated Plus Maze Test)
<b>GR</b>	Receptores de Glucocorticoides
<b>HPT</b>	Eje Hipotálamo Pituitaria Tiroides
<b>HPA</b>	Eje Hipotálamo Pituitaria Adrenal
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormonas
<b>HT</b>	Hormonas Tiroideas
<b>LC</b>	Locus Ceruleus
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MAGL</b>	monoacilglicerol lipasa
<b>MC-2</b>	Receptores de melanocortina 2
<b>MG</b>	Monoacilglicerol
<b>MR</b>	Receptores de Mineralocorticoides
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>OFT</b>	Prueba de campo abierto (Open field test)
<b>PAS</b>	Sistema de actividad fotoeléctrica (Photobeam Activity System)
<b>PPII</b>	Piroglutamil peptidasa II
<b>PVN</b>	Núcleo Paraventricular (Paraventricular nucleus)
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAm</b>	RNA mensajero
<b>SNS</b>	Sistema Nervioso Simpático
<b>TAB</b>	Tejido Adiposo Blanco
<b>TG</b>	Triacilglicerol
<b>TAP</b>	Tejido Adiposo Pardo
<b>T3</b>	Triyodotironina
<b>T4</b>	Tiroxina

## I. Introducción

Nuestra sociedad se desenvuelve en un entorno con múltiples estímulos estresantes a consecuencia del estilo de vida ajetreado que hemos adoptado. Como consecuencia de ello ha habido un incremento en enfermedades relacionadas con el estrés como desórdenes psiquiátricos, problemas cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, obesidad, entre otras. Pero ¿cómo se define estrés? este es un concepto que ha sido difícil de definir debido a su multicausalidad, aunque varios autores coinciden al definirlo cómo una interrupción en la homeostasis del organismo que da como resultado la redirección adaptativa del gasto de energía y el comportamiento (Ulrich-Lai y Herman 2009; Rabasa y Dickson, 2016). De acuerdo con esta definición los seres vivos nos encontramos ante situaciones que comprometen la homeostasis de nuestro organismo constantemente, por lo que evolutivamente hemos desarrollado mecanismos que nos permitan contender contra estímulos estresantes.

En animales, el estrés genera una respuesta integral que involucra la activación e interacción de múltiples procesos, los cuales incluyen los sistemas conductual, autónomo, endocrino e inmunológico (Ulrich-Lai y Herman, 2009). El principal componente endocrino de esta respuesta implica la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), lo que desencadena una cascada neuroendocrina que da como resultado la síntesis y secreción de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores y otras especies). La principal acción fisiológica de los glucocorticoides es la redistribución de energía a través del aumento en disponibilidad de sustratos energéticos para promover la supervivencia ante factores estresantes. Simultáneamente, el estímulo activa el Sistema Nervioso Simpático (SNS) el cual estimula la liberación de catecolaminas en las terminales nerviosas simpáticas (norepinefrina, NE) y de las glándulas suprarrenales (epinefrina, E). La liberación de catecolaminas estimula receptores de diferentes órganos blanco que promueven la respuesta de “lucha o huida”, incrementando la movilización de las reservas energéticas (Rabasa y Dickson, 2016). Otro sistema neuroendócrino que regula el gasto energético es el eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT), que se encarga de controlar alrededor del 30% del gasto energético basal (Fekete y Lechan, 2014) y a diferencia de los antes mencionados es inhibido por ciertos tipos de estresores (Joseph-Bravo y col., 2015a).

Los ejes HPT, HPA y el SNS son regulados por diferentes factores externos cómo la alimentación, los ritmos circadianos, la actividad física y el estrés; pudiendo afectar el balance energético de manera positiva o negativa (Herman y col., 2012; Joseph-Bravo y col., 2015a).

El estrés agudo activa el HPA y SNS, los cambios producidos son esenciales para la sobrevivencia; en cambio, el estrés crónico produce varias alteraciones que pueden llevar a la ansiedad o depresión y es considerado como un factor que induce a la obesidad ya que provoca alteraciones en el balance energético que contribuyen a un aumento en el consumo de alimento y a la acumulación de tejido adiposo por los efectos adipogénicos de los glucocorticoides (Rabasa y Dickson, 2016). Algunos tipos de estrés agudo o crónico

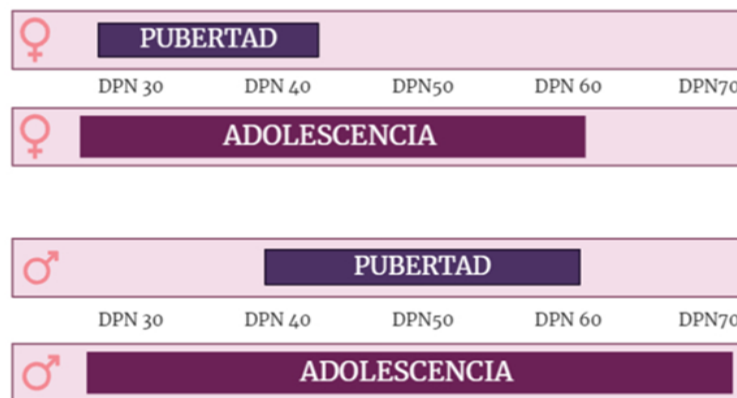
inhiben la actividad del eje HPT en estado basal y en su respuesta a retos metabólicos, lo que disminuye el gasto energético (Joseph-Bravo y col., 2015a). La Organización Mundial de la Salud define a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa ocasionada por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía, siendo perjudicial para la salud. En los últimos 30 años, la obesidad se ha convertido en una epidemia que afecta a uno de cada tres adolescentes y niños, y a siete de cada diez adultos en México (Rivera y col., 2018).

Debido a los cambios hormonales que ocurren durante períodos dinámicos de desarrollo y maduración, la forma en que el estrés es procesado se relaciona con el sexo y la edad del individuo (Bale y Epperson, 2015). La adolescencia es un período particularmente vulnerable a los estímulos del estrés, durante el cual se dan procesos de desarrollo neurológico que ayudan al organismo a contener contra el estrés (Hammerslag y Gulley, 2016). El ejercicio es considerado como una alternativa para disminuir los efectos nocivos del estrés, si bien promueve la activación del eje HPA, también se liberan neurotransmisores que amortiguan los efectos de los glucocorticoides (Chen y col., 2017). El eje HPT se activa por el ejercicio voluntario, pero esta respuesta se encuentra atenuada cuando los animales son previamente sometidos a estrés crónico, con la subsecuente disminución en la movilización de las reservas de grasa (Parra-Montes de Oca y col., 2019). En este trabajo se plantea evaluar los efectos del estrés crónico variable durante la adolescencia sobre la respuesta al ejercicio voluntario de genes lipolíticos regulados por hormonas tiroideas.

## II. Marco teórico

### II.I Adolescencia

La adolescencia es definida como un periodo de transición gradual de la niñez a la adultez y comprende un importante periodo de neurodesarrollo postnatal (Spear, 2013). Evolutivamente, es durante la adolescencia cuando maduran las habilidades sociales y cognitivas adultas que permiten incrementar la independencia de los individuos. En ratas, se estima que la adolescencia comienza aproximadamente desde el día posnatal (DPN) 30 y comprende aproximadamente 30 días en hembras y 40 días en machos (Figura 1).



**Figura 1.** Periodo de pubertad y periodo estimado de adolescencia en ratas hembra y macho. Se estima que la adolescencia en ratas comienza a partir del DPN 30 y se extiende hasta aproximadamente el DPN 60 en hembras y 70 en machos. DPN: día posnatal (Modificado de Schneider, 2013).

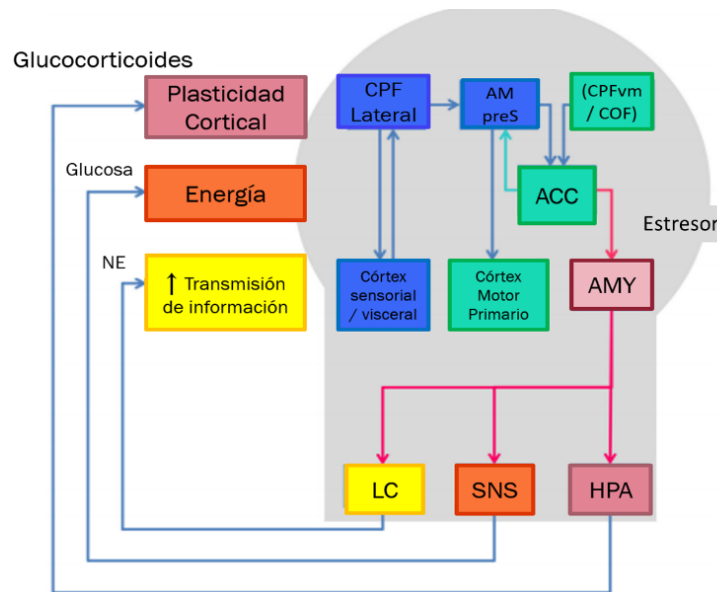
Los procesos de desarrollo neurológico que ocurren durante esta etapa se superponen e interactúan con el período de desarrollo puberal durante el cual se alcanza la madurez sexual (Schneider, 2013). Este periodo representa una etapa de vulnerabilidad a causa de los procesos de desarrollo neurológico de los sistemas subcorticales y de control prefrontal que tienen lugar durante esta etapa (Hammerslag y Gulley, 2016). Entre estos procesos se encuentran cambios a nivel celular en regiones límbicas y prefrontales, producción de nuevos axones y sinapsis, seguida de podas rápidas y crecimiento continuo en la densidad de las fibras que conectan la amígdala y la corteza prefrontal. Sin embargo, estos procesos no ocurren de manera simultánea, siendo las regiones límbicas las que se desarrollen antes que las regiones prefrontales, lo que provoca una tendencia a tomar decisiones impulsivas y tener actitudes riesgosas (Casey, 2008). La desregulación de los neurocircuitos de estrés es la característica más común en las enfermedades neuropsiquiátricas. Es durante la adolescencia cuando tienden a presentarse los primeros síntomas de este tipo de padecimientos (Bale y Epperson, 2015). Además de la predisposición a enfermedades neuropsiquiátricas generada por el estrés durante la adolescencia, el tener un estímulo estresante crónico durante este periodo de desarrollo puede provocar que la respuesta al

estrés en el individuo adulto esté alterada; a diferencia de los efectos del estrés durante la edad adulta, que suelen ser reversibles con el tiempo, los efectos del estrés durante la adolescencia pueden ser permanentes (Romeo, 2013).

## II.II. Estrés

El estrés como término fue definido por H. Seyle en 1936 como una perturbación de la homeostasis del organismo (Engelmann y col., 2004). La naturaleza de los estímulos estresantes es variable, por lo que es necesario clasificarlos de acuerdo a sus características, en función al tipo de amenaza al organismo, al tiempo de exposición, a su repetición a través del tiempo y al tipo de vías neuronales que se activan ante ellos. Los estresores psicológicos o amenazas predictivas son aquellos que no atentan directamente contra la vida del organismo, son procesados por el sistema límbico que involucra a la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal, donde se procesa la información sensorial y emocional que se transmite al hipotálamo activando al eje HPA y al SNS. Los estresores físicos son aquellos que ponen en riesgo la supervivencia inmediata del organismo, estos activan rutas somáticas y viscerales que activan núcleos del tallo cerebral que inervan al hipotálamo donde se desencadena la respuesta al estrés (Du Preez y col., 2021). De acuerdo a la duración un estresor se le puede clasificar cómo agudo cuando se presenta en un periodo de minutos, segundos u horas o crónico cuando se prolonga por días, semanas, meses e incluso años. El estrés crónico se puede clasificar a su vez en estrés homotípico que se refiere a cuando un mismo estresor se presenta repetidamente a lo largo del tiempo; y heterotípico dónde se presentan distintos estresores a lo largo del tiempo. Una respuesta apropiada al estrés altera los procesos fisiológicos y de comportamiento para promover la supervivencia.

Los mecanismos clave en la respuesta al estrés que se han descrito hasta ahora involucran a la corteza cingulada anterior (ACC) y la amígdala que, al intercambiar información con la corteza orbitofrontal, puede desempeñar un papel clave en la respuesta a las amenazas al bienestar (Figura 2). El complejo ACC-amígdala estimula dos importantes proyecciones descendentes: la vía hacia el locus coeruleus (LC) y la vía hacia los núcleos hipotalámicos ventromedial (VMN) y paraventricular (PVN), estimulando así el SNS y el HPA. Estas vías al ser activadas coordinan respuestas fisiológicas que entre sus efectos promueven la movilización de reservas energéticas para contender contra el estrés (Peters y col., 2017).



**Figura 2.** Circuitos neuronales y respuestas fisiológicas ante un estresor. Cuando el organismo es sometido a un estresor, el complejo ACC-amígdala activa tres subsistemas que retroalimentan al cerebro: el LC, el SNS y el eje HPA. El impulso de LC conduce a la liberación de norepinefrina (NE) cortical, lo que mejora la transmisión de información cortical. El SNS asigna la energía adicional requerida al cerebro que es necesaria para respaldar la transmisión de mensajes neuronales mejorada y más precisa. El eje HPA libera glucocorticoides que inhiben la plasticidad cortical (Modificado de Peters y col., 2017).

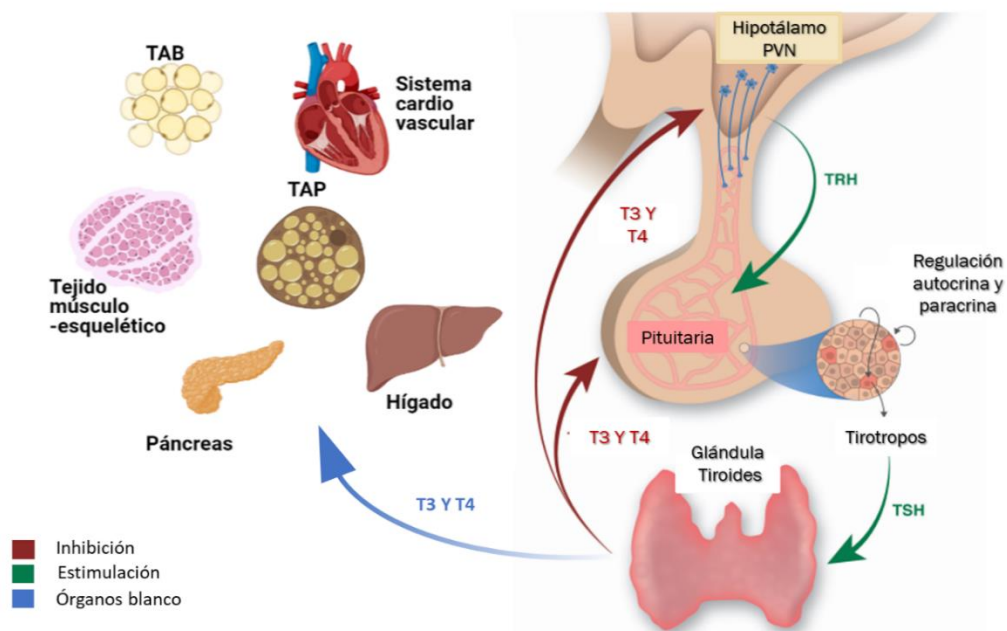
El correcto funcionamiento de estos sistemas permite que el organismo contienda contra el estrés y logre volver a su estado de homeostasis, este mecanismo se le conoce como alostasis. Cuando el estrés ocurre de manera crónica representa una amenaza prolongada a la homeostasis del organismo sometiéndolo a una carga alostática (Peters y col., 2017), ocasionando alteraciones que caracterizan una amplia gama de enfermedades y síndromes pudiendo alterar la regulación del balance energético (BE) a través de la actividad neuroendocrina.

### II.III Generalidades del eje HPT

El eje HPT se encarga de la regulación del metabolismo a largo plazo y en situaciones de demanda energética (Fekete y Lechan, 2014; Joseph-Bravo y col., 2015a). El eje HPT está regulado por la hormona liberadora de tirotropina (TRH), un tripéptido compuesto por tres aminoácidos: ácido piroglutámico, histidina y prolinamida (pGlu-His-ProNH<sub>2</sub>) que se sintetiza en varias áreas del cerebro incluido el hipotálamo (Joseph-Bravo y col., 2015b). La producción de TRH está regulada por una red compleja de axones neuronales y señalización humoral que inciden sobre las neuronas TRH hipofisiotrópicas en el PVN, permitiendo al eje HPT responder a los cambios fisiológicos y ambientales (Ortiga-Carvalho y col., 2016). Las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas envían proyecciones hacia la capa externa de la eminencia media, liberando TRH en los vasos portales hasta llegar a la pituitaria anterior, promoviendo la síntesis y liberación de tirotropina (TSH). La TSH es



transportada por circulación sistémica hacia la glándula tiroides donde estimula la síntesis y la liberación de las hormonas tiroideas (HT, T3 y T4). Aunque T3 y T4 se producen en la glándula tiroides, la mayor parte de la T3 se deriva de la conversión de T4 a T3 por la actividad de las desiodasas (Dio), presentes en tejidos blanco; la concentración de T3 sérica deriva principalmente de la conversión en el hígado y los riñones. A través de un mecanismo de retroalimentación negativa, la T3 inhibe la actividad del eje HPT a nivel de pituitaria y directamente sobre las neuronas TRH hipofisiotrópicas (Fekete y Lechan, 2014).



**Figura 3. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides.** La actividad del eje HPT está regulada por las neuronas hipofisiotrópicas del PVN que liberan TRH; este péptido es liberado en la eminencia media y circula por el sistema porta-hipofisiario hasta la pituitaria anterior, favoreciendo la síntesis y secreción de TSH. Esta hormona actúa en la tiroides donde controla la producción y secreción de hormonas tiroideas (HT, T4 y T3). Las HT actúan sobre diferentes órganos blanco que regulan el balance energético; también producen un efecto de retroalimentación negativa en el eje a nivel de pituitaria e hipotálamo (Modificado de Ortega-Carvalho, 2016).

Las HT actúan en múltiples órganos y tejidos que están involucrados en el metabolismo energético. En particular, la señalización de HT y la estimulación del SNS promueven la termogénesis adaptativa y la biogénesis mitocondrial en tejido adiposo pardo (TAP); regulan las funciones cardiovasculares, incluida la presión arterial y la frecuencia cardíaca; modulan la homeostasis de la glucosa a través de acciones en las células  $\beta$  pancreáticas, además de regular la producción de glucosa endógena en el hígado; favorece la diferenciación de adipocitos y promueven la lipólisis y la lipogénesis en el tejido adiposo blanco (TAB); favorecen el desarrollo de fibras musculares, contracción de los miocitos y biogénesis mitocondrial en músculo esquelético (Mullur y col., 2014; Obregon, 2014). La actividad del eje HPT se encuentra regulada por el estado energético, paradigmas como el ayuno o la

restricción de alimento inhiben la actividad del eje, mientras que situaciones de demanda como la exposición al frío y el ejercicio voluntario la promueven (Joseph-Bravo y col., 2015a).

## II.IV Ejercicio

El ejercicio se refiere a cualquier actividad física estructurada y repetitiva que induce el gasto energético (Dishman y col., 2006). Dependiendo de la intensidad y del tiempo, el ejercicio puede generar diferentes respuestas fisiológicas. Ante el ejercicio agudo la primera respuesta que se desencadena en segundos es la activación del SNS que resulta en la liberación de NE en órganos blanco y en la circulación, a través de la conexión simpática con la glándula suprarrenal a esta respuesta se suma la liberación de E a la circulación. Al mismo tiempo se disminuye la secreción de insulina pancreática y aumenta la de glucagón. Segundos más tarde, aproximadamente a menos de un minuto del comienzo del ejercicio, el hipotálamo comienza a liberar hormonas como TRH, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y el factor de liberación de hormonas crecimiento (GHRF) para estimular la glándula pituitaria anterior. Una vez estimulada se liberan hormonas tróficas a la circulación, que actúan sobre su objetivo periférico específico. Una de las acciones más rápidas que se dan durante esa cascada es la del CRH que provoca la liberación de ACTH que a la vez provoca la liberación de cortisol (Hackney y col., 2016). Al liberarse TRH se estimula la liberación de TSH en la pituitaria y posteriormente de T3 y T4. Las HT contribuyen a la regulación de varios eventos involucrados en el ejercicio (Uribe y col., 2014; Parra-Montes de Oca y col., 2019), favorecen la movilización de las reservas de glucosa del hígado, aumentan la contracción muscular y la biogénesis de mitocondrias en músculo esquelético, además de actuar en sinergia con el SNS aumentando la frecuencia cardíaca y facilitando la movilización de las reservas de lípidos del TAB (Little, 2016).

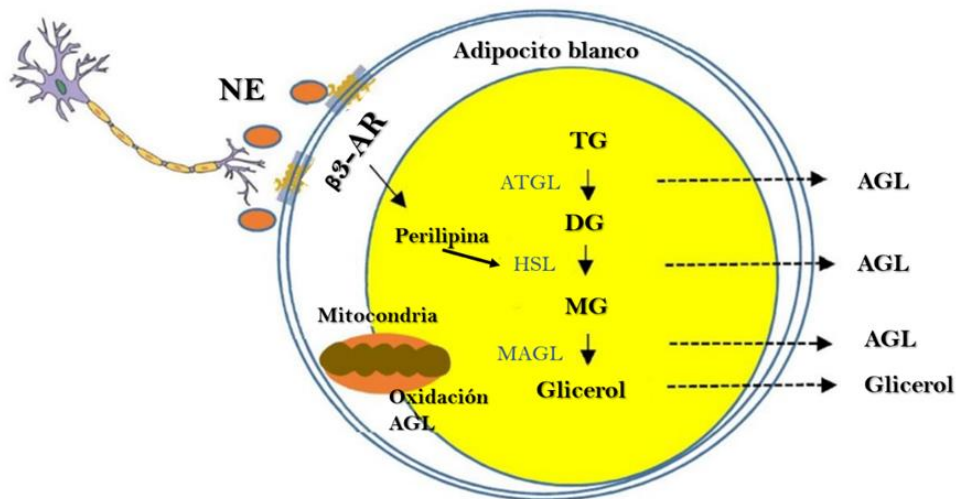
La activación del SNS y del eje HPA que ocurre durante la realización del ejercicio contribuye a establecer un balance energético negativo ya que se promueve la lipólisis y la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo, además de la glucogenólisis y gluconeogénesis en el hígado (Rabasa y Dickson, 2016).

Debido que el ejercicio promueve la actividad del SNS y del eje HPA, causando elevación en los niveles plasmáticos de catecolaminas y glucocorticoides se le ha llegado a considerar un estresor (Hackney y col., 2016; Chen y col., 2017). Pero al analizar los efectos que tiene el ejercicio sobre la fisiología del organismo no se detectan los efectos negativos que tiene el estrés. Hacer ejercicio aeróbico de manera regular mejora la función ejecutiva, la atención, la memoria y la capacidad cognitiva; además de que induce cambios plásticos que disminuyen el estrés psicológico (Hötting y Röder, 2013). El ejercicio voluntario se ha relacionado con aumento en la neurogénesis principalmente en el hipocampo (Stranahan y col., 2007; Venezia y col., 2016). En un paradigma en el que se aplicaron una variedad de factores estresantes de manera intermitente, el ejercicio mostró efectos protectores contra la disminución de GR del hipocampo observada en animales sometidos a estrés crónico

leve (Zheng y col., 2006); además de que mantiene los niveles de BDNF, otro factor relacionado con la plasticidad del hipocampo, en ratones físicamente activos después del estrés causado por inmovilización (Adlard y Cotman, 2004); también protege contra las consecuencias conductuales y neuroquímicas producidas por estrés físico (Stranahan y col., 2008), indicando que el ejercicio puede ser considerado como una estrategia para contener con los efectos nocivos del estrés.

## II.V Tejido adiposo blanco y lipólisis.

El tejido adiposo blanco es el principal sitio de almacenamiento, transporte, síntesis y movilización de lípidos y juega también un papel crítico como órgano endócrino. Los lípidos son la forma primaria de energía almacenada en los mamíferos y se encuentran en el TAB como triacilgliceroles (TG). Durante periodos de balance energético negativo, como ayuno o ejercicio, el TAB es capaz de movilizar sus depósitos de grasa para cubrir las necesidades energéticas de otros órganos (Carmean y col., 2014). La movilización de los lípidos se da a través de un proceso conocido como lipólisis, el cual consiste en la hidrólisis secuencial de TG en sus moléculas constituyentes, glicerol y tres ácidos grasos, que es catalizada por tres enzimas diferentes (Figura 4). En la primera etapa de este proceso, una molécula de TG se hidroliza a diacilglicerol (DG) y una molécula de ácido graso, en una reacción catalizada principalmente por la enzima lipasa de triglicérido adiposo (ATGL). Posteriormente, el DG se convierte en monoacilglicerol (MG) y se libera otra molécula de ácido graso por la acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL). Por último, la monoacilglicerol lipasa (MGL) hidroliza el MG, produciendo glicerol y un ácido graso. Los ácidos grasos libres son secretados al torrente sanguíneo y son utilizados como sustratos energéticos en otros tejidos (Bolsoni-Lopes y col., 2015).



**Figura 4.** Diagrama general de la lipólisis. En los adipocitos blancos, la inervación simpática regula una cascada de lipólisis para convertir los triglicéridos almacenados en ácidos grasos libres (AGL) y glicerol que pueden usarse como combustibles de otros tejidos. Esto inicia cuando la NE se une a

los A $\alpha$ 1. Provocando un aumento en la concentración de AMPc. El AMPc activa la proteína quinasa A (PKA). La PKA fosforila a la perilipina que a su vez fosforila a la HSL pasando a su forma activa. Las enzimas ATGL, HSL y MGL hidrolizan a los triglicéridos almacenados en diacilglicerol, monoacilglicerol, y por último en ácidos grasos libres y glicerol que posteriormente pueden ser utilizados como combustibles energéticos. NE: norepinefrina; A $\alpha$ 1: receptor adrenérgico  $\alpha$ 1; HSL: lipasa sensible a hormonas; ATGL: lipasa adiposa de triacilglicéridos; MAGL: monoacilglicerol lipasa; TG: triacilglicerol; DG: diacilglicerol; MG: monoacilglicerol; AGL: ácido graso libre (Modificado de Zhu y col., 2019).

Existen múltiples reguladores del metabolismo de los lípidos, entre ellos están: las HT, las catecolaminas y algunos receptores nucleares. Las HT participan en la diferenciación de los adipocitos y en la movilización de lípidos, actuando de manera sinérgica con el SNS (Obregon, 2014). T3 estimula la actividad de las catecolaminas a través del aumento de expresión de receptores adrenérgicos que promueven la lipólisis en TAB. Las catecolaminas modulan la lipólisis a través de los subtipos 1-3 de receptores adrenérgicos  $\beta$  ( $\beta$ -AR) que actúan como inductores de la lipólisis. Alteraciones metabólicas pueden aumentar o disminuir la cantidad de  $\beta$ -AR y por lo tanto afectar sus funciones (Liu y col., 2003). Las catecolaminas se unen a los  $\beta$ -AR, que se acoplan a las proteínas G estimulantes que activan el adenilato ciclasa aumentando las concentraciones de AMP cíclico intracelular (AMPc) (Tsiloulis y Watt, 2015). El AMPc funciona como un segundo mensajero y activa la proteína quinasa A (PKA). Posteriormente la PKA fosforila la perilipina, una proteína asociada a las gotas lipídicas, la cual promueve la fosforilación de la HSL (forma activa) favoreciendo la lipólisis (Zhu y col., 2019).

### III. Antecedentes

#### III.I Estrés durante la adolescencia

Se ha observado que la respuesta al estrés agudo en ratas es diferente de acuerdo a la edad, siendo las ratas adolescentes las que presentan una mayor reacción al estrés y tardan más en regresar al estado basal en comparación con las ratas adultas (Romeo, 2013). La respuesta al estrés también se ve modificada en ratas adultas que fueron sometidas a estrés crónico durante la adolescencia; se ha observado que las ratas sometidas a estrés durante la adolescencia presentan mayores concentraciones de glucocorticoides plasmáticos basales e inducidos por estrés, así como reducción de la expresión de MR y GR en el hipocampo en comparación con ratas adultas control (McCormick y col., 2010).

La experiencia del estrés durante la adolescencia altera la trayectoria del desarrollo cerebral, principalmente del hipocampo, alterando los sistemas emocionales y cognitivos, lo que conlleva a déficits leves en las tareas de aprendizaje y memoria, así como un aumento en la probabilidad de trastornos de ansiedad y conductas depresivas en la edad adulta (McCormick y col., 2010). También se plantea que el estrés durante la adolescencia

induce el consumo de alimentos palatables, altos en grasa y carbohidratos, lo que genera un incremento en la secreción de insulina y leptina alterando el metabolismo de lípidos y carbohidratos, lo que predispone a los individuos a padecer diabetes tipo 2, obesidad y síndrome metabólico a corta edad (De Vriendt y col., 2009; Pervanidou y Chrousos, 2012).

### III.II Respuesta del eje HPT al estrés y demandas energéticas

La exposición al estrés produce una inhibición en la actividad del eje HPT en ratas adultas (Joseph-Bravo y col. 2015a). Algunos estresores, psicológicos o metabólicos, disminuyen los niveles de ARNm de TRH del PVN (Gutiérrez-Mariscal y col., 2012; Joseph-Bravo y col. 2015a).

Estudios recientes han demostrado que al someter a ratas adultas a un periodo de estrés crónico previamente a una demanda energética (como la exposición al frío o al ejercicio voluntario) la respuesta del eje HPT se ve atenuada (Parra-Montes de Oca y col., 2019; Castillo-Campos y col., 2020).

Se ha observado que la respuesta al estrés puede presentar dimorfismo sexual y que esta diferencia puede estar determinada por eventos externos a lo largo de la vida del animal (Parra-Montes de Oca y col. 2021).

El estrés durante etapas críticas del desarrollo como, por ejemplo, la etapa de lactancia, causa efectos a largo plazo en la actividad del eje HPA en la etapa adulta (Turecki y Meaney, 2014). En animales sometidos a separación materna se observan también cambios en la respuesta del eje HPT a situaciones de demanda energética como el frío y el ejercicio voluntario (Jaimes-Hoy y col., 2021).

En ratas adultas de ambos sexos sometidas a un protocolo de estrés crónico por aislamiento se observa que la respuesta al estrés es mayor en machos en comparación con las hembras, además se observa que en machos el estrés no altera los efectos del ejercicio, en contraste con las hembras que presentan una respuesta atenuada al ejercicio al compararlas con hembras controles (Parra-Montes de Oca y col., 2019)

Se ha reportado que ratas ejercitadas antes o después de la exposición al estrés muestran resiliencia. Y que ante ciertos tipos de estrés las hembras responden más rápido que los machos. La susceptibilidad al estrés está determinada por el sexo, la edad y el tipo de estrés (Parra-Montes de Oca y col. 2021).

Se desconocen los efectos del estrés crónico durante la adolescencia sobre la respuesta de genes lipolíticos regulados por las HT al ejercicio voluntario en el TAB.

## IV. Justificación

En la actualidad los estímulos constantes e intensos en la vida de los individuos pueden inducir a un estrés crónico el cual produce múltiples alteraciones metabólicas y psicológicas. La adolescencia es una etapa donde la vulnerabilidad a estresores aumenta debido a que se inicia la maduración de ejes neuronales relacionados con la respuesta al estrés. El ejercicio, además de contribuir a una disminución en la ingesta calórica y a un aumento en la lipólisis, también ha demostrado contrarrestar los efectos del estrés. El ejercicio voluntario activa el eje HPT y se le ha asociado a una disminución en el peso del TAB, pero situaciones de estrés crónico interfieren con esta activación y se hace evidente una deficiencia en la movilización de las reservas energéticas. En este trabajo se pretende evaluar si el estrés durante la etapa adolescente afecta la actividad de las hormonas tiroideas a nivel del tejido adiposo blanco en respuesta al ejercicio voluntario en la etapa adulta.

## V. Hipótesis

La expresión de genes involucrados en la lipólisis y regulados por hormonas tiroideas se ve afectada por el ejercicio voluntario en ratas adultas que fueron sometidas a estrés crónico variable durante la adolescencia.

## VI. Objetivos

### *Objetivo general*

Estudiar el efecto del estrés crónico variable durante la adolescencia sobre la respuesta de algunos genes involucrados en la lipólisis y regulados por las hormonas tiroideas en el tejido adiposo blanco, además de observar si hay dimorfismo sexual en dicha respuesta.

### *Objetivos particulares*

Evaluar los siguientes parámetros en ratas adultas expuestas al ejercicio voluntario estresadas durante la adolescencia:

- Peso del tejido adiposo blanco.
- Niveles séricos de hormonas tiroideas.
- Expresión de los genes Dio2, Adrb3 y HSL, involucrados en lipólisis que son modulables por hormonas tiroideas.



## VII. Materiales y Métodos

Este trabajo de tesis formó parte de un trabajo del laboratorio más amplio dirigido a evaluar los efectos del estrés crónico durante la adolescencia de ratas en la respuesta al ejercicio voluntario en la etapa adulta, sobre las actividades de los ejes HPT, HPA y órganos blancos como músculo y tejidos adiposos. La realización del presente trabajo fue previamente evaluada y aprobada por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología, con la clave 374.

### VII.I Modelo y diseño experimental

Ratas macho (N=36) y hembra (N=36) de la cepa Wistar de 30 días de edad se mantuvieron en habitaciones separadas de acuerdo al sexo y grupo experimental, en condiciones de temperatura (22-24°C) y humedad (50% HR) controladas, un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y se les ofreció alimento y agua *ad libitum*. Los animales de cada sexo dividieron en 2 grupos experimentales. Un grupo control (C) (n=18) donde la manipulación de los animales era lo mínima posible (sólo para cambio de cama, pesaje de animales o pruebas conductuales); y un grupo de estrés crónico variable (ECV) al cual se le aplicó un protocolo de estrés acorde a lo publicado por Toth y col. (2008) con modificaciones; los estresores aplicados eran de baja intensidad, los animales eran sometidos una vez al día y el periodo de estrés correspondía al periodo de adolescencia (hembras: 30 días; machos: 40 días) (Anexos I y II). Durante el periodo de ECV se realizaron pruebas conductuales, para evaluar el comportamiento ansioso de los animales (Figura 5).

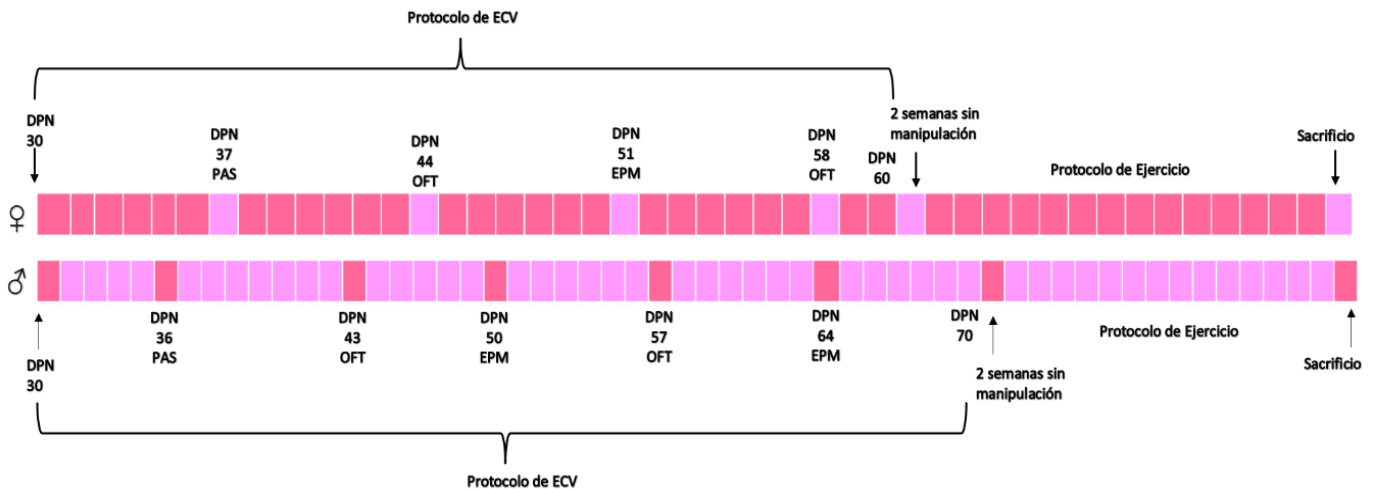


Figura 5. Cronograma del diseño experimental. Se ilustra los días en que se aplicó el protocolo de ECV, los días en los cuales se realizaron pruebas conductuales y los días en que se aplicó el Protocolo de ejercicio voluntario. (Durante los días en que se realizaron pruebas conductuales no se aplicó ningún estímulo estresante).

## VII.II Pruebas conductuales

La premisa básica de la mayoría de estos modelos es el conjunto de respuestas conductuales inducidas por la exposición a un nuevo entorno, que simultáneamente evoca miedo y curiosidad, creando un conflicto de acercamiento-evitación. Esto permite una evaluación conductual que brinda información sobre el estado mental de los animales dando indicativos de comportamiento ansioso o depresivo.

Los modelos conductuales que miden conflictos no condicionados se definen como etológicos (como Prueba de campo abierto [OFT], Laberinto Elevado de Cruz [EPM], caja claro-oscura y las pruebas de exposición a depredadores). Este tipo de pruebas se basan en el miedo/evitación que los animales presentan ante ambientes o estímulos nuevos, clasificándolos como comportamientos no aprendidos. El estudio de estas respuestas no condicionadas es una simulación en condiciones de laboratorio de lo que ocurre en la naturaleza (Campos y Col.,2013).

### V.II.I Evaluación de la actividad locomotora en jaula con el sistema de actividad fotoeléctrica

Para evaluar el comportamiento de los animales en un nuevo entorno se utilizó el sistema de actividad fotoeléctrica (PAS). Esta prueba consistió en colocar individualmente a las ratas durante 5 minutos en cajas que tienen integrado alrededor un sensor el cual se encuentra conectado a una computadora (*PAS-Home Cage, San Diego Instruments Co.*). El sistema detecta la actividad locomotora del animal mediante rayos infrarrojos distribuidos a lo largo y ancho de la caja; una vez concluido el tiempo, el animal era regresado a su caja habitual. La cantidad de movimientos fue analizada mediante el software incluido en el equipo, el cual los agrupa en centrales y periféricos, además de que se clasifican como finos (movimientos realizados en estado de reposo), ambulatorios (movimientos realizados durante la exploración de la caja) y totales (suma de movimientos finos y ambulatorios). La determinación de las zonas centro y periferia permite simular una prueba de campo abierto.

### VII.II.II Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto (OFT) consiste en medir el tiempo y la distancia recorrida por el animal en las zonas determinadas como centro y periferia de la caja de acrílico. Los roedores espontáneamente prefieren la actividad en la periferia del aparato en comparación con la actividad en el centro (Walsh y Cummins, 1976). De hecho, ratones y ratas tienden a presentar tigmotaxis, un comportamiento que consiste en preferir caminar cerca de las paredes, lo cual les proporciona una sensación de seguridad a la hora de explorar un nuevo ambiente. Conforme el animal pasa más tiempo en el aparato hay un aumento en el tiempo que toma para caminar o correr por la parte central, así como en la relación locomoción central/total y también hay una disminución de la latencia para entrar en la parte central, estos parámetros son indicadores de ansiólisis. Por el contrario, si el animal pasa mayor



tiempo y recorre una mayor distancia en la periferia sin intentar explorar el centro se interpreta como un comportamiento ansioso (Prut y Belzung, 2003).

Esta prueba se realizó en una arena cuadrada cerrada (100 cm x 100 cm x 60 cm) hecha de acrílico negro opaco (*San Diego Instruments Co.*). Al momento de la prueba, cada animal es colocado en el centro de la arena y se le deja explorar libremente por 5 minutos. Durante este lapso se evalúa el tiempo y la distancia recorrida que se da en el centro (un cuadro delimitado de 50 x 50 cm) y la periferia (zona cercana a las paredes).

### VII.II.III Laberinto Elevado de Cruz

El laberinto elevado de cruz (EPM) se basa en que las ratas muestran consistentemente altos niveles de exploración y a la vez preferencia por los brazos cerrados. Debido a que tanto los brazos abiertos como los cerrados evocan el mismo impulso exploratorio, evitar los brazos abiertos se atribuye a niveles más altos de miedo. Al probar drogas contra la ansiedad se ha observado que las entradas en los brazos abiertos aumentan, y lo contrario ocurre con drogas que promueven la ansiedad. Estos estudios demostraron la validez del EPM para medir niveles de ansiedad (Rodgers y Dalvi, 1997).

Para las pruebas de EPM se utilizó una estructura de 4 brazos hechos de acrílico negro opaco alineados en posición de cruz y elevados a 60 cm del suelo; dos de los brazos opuestos tenían paredes a los lados y al final con una altura de 50 cm (brazos cerrados) y los otros dos brazos no tenían barreras (brazos abiertos) (*San Diego Instruments Co.*). Al momento de la prueba, se colocó individualmente a cada animal en el centro y se le dejó explorar por 5 min. Se evaluó el número de entradas (considerándose entrada cuando las 4 patas del animal se encontraban en la zona delimitada), el tiempo y la distancia recorrida en los brazos abiertos y los brazos cerrados.

El comportamiento para OFT y EPM fue grabado y analizado mediante el software SMART 2.5 (*Panlab*). Los aparatos se limpiaron con ácido acético al 10% al final de la prueba de cada animal.

### VII.III Protocolo de Ejercicio Voluntario

Alcanzada la edad adulta (machos: 70 días de edad; hembras: 60 días de edad), las ratas de ambos grupos estuvieron sin manipulación por 2 semanas, excepto para la limpieza de las cajas cada semana. Posteriormente, los grupos experimentales se dividieron en un grupo sedentario con alimentación *ad libitum* (S) (n=6), un grupo ejercitado (Ex) (n=6) y un grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio (PF) (n=6), es decir, cada día se les ofrecía la misma cantidad de alimento que consumía el grupo ejercitado. El periodo de ejercicio fue de 14 días, este protocolo consistió en colocar a las ratas individualmente en una caja que contenía una rueda de ejercicio de 25 cm de diámetro, un contador digital,

agua y alimento *ad libitum* entre las 19:00 h y 7:00 h del día siguiente, cuando las ratas regresaban a su respectiva caja.

#### VII.IV Variables ponderales

El peso del alimento se registró cada 3 días durante la adolescencia y dos veces al día (en la mañana a las 7:00 h y en la tarde a las 18:00 h) en el periodo de ejercicio. Para calcular el consumo de alimento por día (CAD) se utilizó la siguiente ecuación:

$$CAD = \frac{\text{Peso alimento}_{final} (g) - \text{Peso alimento}_{inicial} (g)}{\text{Número de ratas por caja} \times \text{día}}$$

El registro de peso corporal se llevó a cabo cada 7 días durante la adolescencia y cada dos días en el periodo de ejercicio. Para calcular la ganancia de peso corporal (GPC) se utilizó la siguiente ecuación:

$$GPC = \text{Peso corporal}_{final} - \text{Peso corporal}_{inicial}$$

El consumo de alimento relativo (CAR) relaciona el consumo de alimento diario promedio con respecto al peso corporal en kilogramos. Es calculado con la siguiente ecuación.

$$CAR = \frac{CAD (g)}{\text{Peso corporal} (kg)}$$

La eficiencia de alimento (EA) relaciona la ganancia de peso corporal por cada 100 g de alimento consumido. Se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$EA = \frac{GPC (g) \times 100}{CA \text{ acumulado} (g)}$$

#### VII.V Sacrificio

A la mañana siguiente de la última noche de ejercicio, 3 horas después del cambio de luz, los animales fueron decapitados con una guillotina para ratas por un técnico capacitado. El sacrificio fue realizado en una sala acondicionada con las medidas de higiene necesarias y la guillotina fue debidamente sanitizada entre cada animal para evitar la contaminación cruzada entre individuos. De cada individuo se colectó sangre troncal que se dejó a temperatura ambiente por alrededor de 10 min, se colocó en hielo hasta el término del sacrificio y posteriormente se centrifugó a 3000 RPM (centrífuga Eppendorf 5810R) a 4°C durante 25 min para obtener suero, el cual fue almacenado en alícuotas conservadas a -20°C para su posterior análisis. Del cuerpo se colectaron diferentes regiones de TAB:

gonadal (TABG), retroperitoneal (TABR) e interescapular (TABI), estas se pesaron en fresco, se congelaron y guardaron a -80°C para su posterior análisis.

## VII.VI Extracción de RNA y RT-PCR

La extracción de RNA total del TAB se realizó por el método de Chomzynski y Sacchi (2006) con modificaciones. Aproximadamente a 100 mg de tejido adiposo congelado se agregan 350 µl de Solución D con β-mercaptoetanol; el tejido se sonicó y posteriormente se sometió a una centrifugación de 2870 RPM (centrifuga MIKRO 200R) a 4°C por 10 min; se retiró la fase superior de lípidos; después se agregó 35 µl de acetato de sodio 2M pH 4 y se mezcló por inmersión; se agregaron 350 µl de una solución de fenol saturado y se mezcló por inmersión; posteriormente se agregaron 300 µl de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y se homogenizó en vortex por 10 seg hasta que se formó una emulsión; las muestras se dejaron reposando en hielo por 15 min y se sometieron a centrifugación a 10000 RPM por 20 min a 4°C; se separó la fase acuosa cuantificando el volumen obtenido, adicionalmente se realizó un segundo tratamiento con cloroformo:alcohol isoamílico para remover el máximo de lípidos y se recupera la fase acuosa. Se midió el volumen de la fase acuosa (alrededor de 300 µl), se agregó el mismo volumen de isopropanol y se dejó por 2 horas a -20°C para precipitar los ácidos nucleicos de las muestras. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 10000 RPM por 20 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, las muestras se resuspendieron en 50 µl de agua tratada con DEPC y se adicionaron 125 µl de etanol absoluto y 5 µl de acetato de sodio 3M pH 5 y se mantuvieron a -20°C por alrededor de 12 h. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 13500 RPM por 15 min a 4°C y se descartó el sobrenadante; para eliminar residuos de sales que pudieran haber quedado, se realizó un lavado con 250 µl de etanol al 70% agitando suavemente y dejando reposar por 10 min a temperatura ambiente, se centrifugaron las muestras a 13500 RPM por 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y las muestras se dejaron secar por 5 min en campana de flujo laminar a temperatura ambiente; la pastilla fue resuspendida en 30 µl de agua tratada con DEPC y se procedió a cuantificar la concentración de RNA total utilizando un NanoDrop. Se realizaron alícuotas de 1 µg de RNA y se realizó la retrotranscripción para obtener el DNA complementario (cDNA). Se analizó la expresión relativa de los genes de interés (Dio2, Adrb3 y Hsl) mediante PCR semi-cuantitativa. Las condiciones de amplificación para cada gen se muestran en el Anexo III. Como control interno se utilizó Ciclofilina A (4 ml cDNA, Tm: 64°C, 20 ciclos).

## VII.VII Determinación de la concentración de hormonas tiroideas

Como un indicativo del estado general del eje tiroideo, se determinó la concentración en suero de hormonas T3 y T4 con kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Diagnóstica Internacional). Para la prueba ELISA se utilizan antígenos y anticuerpos marcados con enzimas para detectar las moléculas biológicas. Este ensayo se basa en la

competencia de antígeno marcado contra el antígeno en la muestra por la unión al anticuerpo específico contra el antígeno de interés; los inmunoensayos permiten detectar cantidades muy pequeñas de antígenos como proteínas, péptidos, hormonas o anticuerpos en una muestra de líquido. Para realizar un ELISA, el antígeno en fase líquida se inmoviliza, generalmente en placas de microtitulación de 96 pocillos, permitiendo que el antígeno se una a un anticuerpo específico. Posteriormente se adiciona un segundo anticuerpo que reconoce al anticuerpo de la placa, este anticuerpo secundario tiene acoplado una enzima que produce una respuesta a partir de un sustrato cromogénico, lo que indica la presencia de antígeno. Las medidas cuantitativas o cualitativas pueden evaluarse basándose en la lectura colorimétrica (Gan y Patel, 2013).

## VII.VIII Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa GraphPrism 8. Se realizaron pruebas ANOVA de dos vías seguidas por la prueba posthoc de Tukey, en algunos casos se realizaron análisis entre dos grupos con la prueba *t*, (indicado en gráficas). Para analizar las variables ponderables (CAR, CAD y GPC), la concentración de hormonas tiroideas y la expresión de genes se utilizaron pruebas ANOVA ya que eran datos recolectados del mismo individuo. Mientras que para los datos que comparaban entre ambos grupos como pruebas conductuales, las variables tomadas del protocolo de ejercicio, y la prueba de bioimpedancia se realizó la prueba *t*. Para todos los resultados se realizaron pruebas para determinar si los resultados eran significativos considerando  $P < 0.05$ .

## VIII. Resultados

### VIII.I. El estrés crónico variable durante la adolescencia produce cambios en las variables ponderables dependiendo del sexo

Como se mencionó en la metodología, durante la adolescencia el peso del alimento consumido se registró cada 3 días y el peso corporal cada semana. Con los datos recabados se obtuvieron las variables de consumo de alimento diario (CAD), ganancia de peso corporal (GPC), consumo de alimento relativo (CAR) y eficiencia de alimento (EA) (Tabla 1).

Las hembras sometidas a ECV consumieron más alimento que las hembras control; mientras que en los machos no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, indicando que el ECV durante la adolescencia afecta la conducta alimentaria dependiendo del sexo. Si bien las hembras ECV mostraron mayor consumo de alimento, no ganaron peso, en contraste con los machos en donde a pesar de no haber diferencias en el consumo de alimento, el grupo ECV mostró una menor ganancia de peso corporal al compararlos con el grupo Control. Sin embargo, cuando se relaciona el consumo de alimento con el peso corporal (CAR) se evidencia que el grupo de hembras ECV consumió más alimento que los controles en relación a su peso corporal, mientras que en los machos no se observó una diferencia significativa entre los controles y los estresados. La EA fue menor en los sometidos a ECV de ambos sexos, lo que puede indicar que el estrés disminuye el aprovechamiento del alimento para ganar peso corporal.

*Tabla 1. Variables Ponderales-Adolescencia/Protocolo de ECV*

	C	ECV
CAD (g) - ♀	15.19 ± 0.20	16.16 ± 0.21*
CAD (g) - ♂	21.60 ± 0.18	21.13 ± 0.30
GPC (g) - ♀	137.78 ± 2.31	139.72 ± 3.11
GPC (g) - ♂	236.00 ± 3.10	210.94 ± 6.32***
CAR (g/kg) - ♀	73.04 ± 0.51	77.12 ± 1.05**
CAR (g/kg) - ♂	63.68 ± 0.67	67.17 ± 1.39
EA (g/100g alim) - ♀	32.12 ± 0.43	30.55 ± 0.62*
EA (g/100g alim) - ♂	31.27 ± 0.30	28.92 ± 0.88*

CAD: Consumo de Alimento Diario; GPC: Ganancia de Peso Corporal; CAR: Consumo de Alimento Relativo; EA: Eficiencia de Alimento (ganancia de peso corporal por cada 100 g de alimento consumido). Los resultados se expresan en Promedio ± EE (n=18). Prueba t. \*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$ , \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

## VIII.II. Las ratas hembra tienden a ser más susceptibles al estrés crónico variable durante la adolescencia en comparación con las ratas macho.

Las pruebas conductuales (PAS, OFT y EPM) permitieron evaluar si el protocolo de ECV alteró la conducta de los animales en comparación con el grupo control (En el ANEXO se encuentran las tablas de cada prueba con los datos individuales).

La prueba de locomoción analizada con el PAS se realizó el DPN 37 en las hembras y el DPN 36 en los machos. Los resultados de esta prueba mostraron que las hembras ECV registraron una menor cantidad de movimientos en comparación con las hembras control, mientras que en los machos no se observaron diferencias (Tabla 2).

*Tabla 2. Evaluación de la actividad locomotora en jaula con el sistema de actividad fotoeléctrica (PAS) en ratas macho y hembra.*

Número de movimientos detectados						
DPN 37	CenF	CenA	CenT	PerF	PerA	PerT
C ♀	30.88±1.97	178.17±7.94	209.05±7.80	38.94± 2.35	243.64±7.78	282.58±7.74
ECV ♀	25.82±1.2*	150.35±8.09*	176.17±8.94**	39.41±2.02	207.52±9.59**	246.94±9.53**
DPN 36	CenF	CenA	CenT	PerF	PerA	PerT
C ♂	30.38±1.89	182.72±10.90	213.11±10.31	36.22± 2.11	241.16±12.95	277.38±12.95
ECV ♂	28.11±1.40	159.05±10.81	187.16±11.02	38.44±1.81	206.27±12.34	244.72±12.67

DPN: Día Post-Natal. Prueba t. \*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$ . Movimientos: CenF: Centrales finos; CenA: Centrales Ambulatorios; CenT: Centrales Totales; PerF: Periféricos Finos; PerA: Periféricos Ambulatorios; PerT: Periféricos Totales. Los resultados se expresan en Promedio  $\pm$  EE (n=18). Prueba t. \*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$ , \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

Los experimentos de OFT fueron realizados en los DPN 44 y 58 en hembras y en los DPN 43 y 57 en machos. El porcentaje de tiempo en el centro se reporta de acuerdo al tiempo total de duración de la prueba para cada individuo. Las hembras ECV registraron menos tiempo en el centro en comparación con las hembras control, pero sólo en el DPN 58. En los machos no se observaron diferencias entre ambos grupos en ninguno de los días en cuanto al porcentaje de tiempo en el centro. Para la distancia total recorrida no se observaron cambios entre ninguno de los grupos lo que indica que la locomoción general no se vio alterada por el ECV.

*Tabla 3. Evaluación del comportamiento ansioso mediante la prueba de campo abierto en ratas macho y hembra durante la adolescencia.*

Porcentaje de tiempo en el centro		
Grupo	C	ECV
♀ DPN 44	10 ± 0.90	8 ± 0.67
♀ DPN 58	7 ± 0.43	4 ± 0.35 ***
♂ DPN 43	2 ± 0.45	2 ± 0.33
♂ DPN 57	2 ± 0.36	1 ± 0.43
Porcentaje de tiempo en la periferia		
Grupo	C	ECV
♀ DPN 44	90 ± 0.90	92 ± 0.67
♀ DPN 58	93 ± 0.43	4 ± 0.35 ***
♂ DPN 43	98 ± 0.45	98 ± 0.33
♂ DPN 57	98 ± 0.36	99 ± 0.43
Distancia total (cm)		
Grupo	C	ECV
♀ DPN 44	8530 ± 293.52	8741 ± 321.87
♀ DPN 58	8790 ± 244.46	9116 ± 314.28
♂ DPN 43	8469 ± 406.29	8485 ± 679.85
♂ DPN 57	8371 ± 666.89	7780 ± 545.35

DPN: Día Post-Natal. Los resultados se expresan en Promedio ± EE (n=18). Prueba t. \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

En cuanto a las pruebas de EPM, fueron realizadas en las hembras durante el DPN 51 y en los machos durante los DPN 50 y 64, esto debido a que el periodo de la adolescencia de los machos se extiende aproximadamente 10 días más en machos que en las hembras. Las hembras de ambos grupos no tuvieron cambios en ninguno de los parámetros evaluados. En los machos estresados se observó un menor porcentaje de tiempo en los brazos abiertos en comparación con el grupo control, solamente al DPN64 (Tabla 4).

*Tabla 4. Evaluación del comportamiento ansioso evaluado por laberinto elevado de cruz en ratas macho y hembra durante la adolescencia.*

Porcentaje de tiempo en Brazos Abiertos		
Grupo	C	ECV
♀ DPN 51	24.82 ± 2.17	25.49 ± 2.09
♂ DPN 50	8.30 ± 2.10	8.54 ± 1.34
♂ DPN 64	14.79 ± 1.47	7.81 ± 1.33 **
Porcentaje de tiempo en Brazos Cerrados		
Grupo	C	ECV
♀ DPN 51	27.43 ± 1.76	24.64 ± 1.16
♂ DPN 50	38.40 ± 2.69	41.47 ± 3.87
♂ DPN 64	22.79 ± 2.28	22.81 ± 3.24
Porcentaje de tiempo en Zona Neutra		
Grupo	C	ECV
♂ DPN 50	53.30 ± 2.02	49.99 ± 2.87
♂ DPN 64	62.42 ± 2.00	69.38 ± 2.84
Distancia total (cm)		
Grupo	C	ECV
♀ DPN 51	4266 ± 184.64	4205 ± 153.69
♂ DPN 50	3150 ± 205.30	3367 ± 145.37
♂ DPN 64	3487 ± 311.49	2939 ± 293.32

DPN: Día Post-Natal. Los resultados se expresan en Promedio ± EE (n=18). Prueba t. \*\*:  $P \leq 0.01$ .

El conjunto de estos resultados sugiere que las hembras tienden a ser más susceptibles al estrés durante la adolescencia en comparación con los machos, concordando con lo reportado en la literatura (Bale y Epperson, 2015).

### VIII.III. El ECV durante la adolescencia produce una mayor disminución de las variables ponderales atribuidas al ejercicio dependiendo del sexo

Las variables ponderales al término del periodo de ejercicio se muestran en la tabla 5. El ejercicio redujo el consumo de alimento en ambos grupos experimentales, mostrando una reducción del 13% (C-Ex) y 21% (ECV-Ex) en las hembras, mientras que en los machos hubo una disminución del 27% (C-Ex) y 18% (ECV-Ex). En cuanto a la GPC, los machos y hembras C-PF, así como los machos ECV-PF, disminuyeron su ganancia de peso corporal por efecto de la restricción de alimento. Se observó una pérdida de peso corporal sólo en los machos C-Ex por efecto del ejercicio, este efecto no se observó en los machos ECV-Ex. Las hembras ECV-PF mostraron una pérdida de peso corporal por efecto de la restricción de alimento y del ejercicio. La disminución de consumo de alimento y la pérdida de peso corporal tuvieron un impacto en las variables de CAR y EA debido a que fueron menores en los grupos ejercitados y con restricción de alimento, aunque sólo en las hembras se observaron diferencias entre los grupos control y ECV, sugiriendo que el estrés durante la adolescencia afecta de manera negativa el peso corporal en respuesta al



ejercicio y la restricción de alimento de manera que se presenta dimorfismo sexual, por lo que afecta principalmente a las hembras.

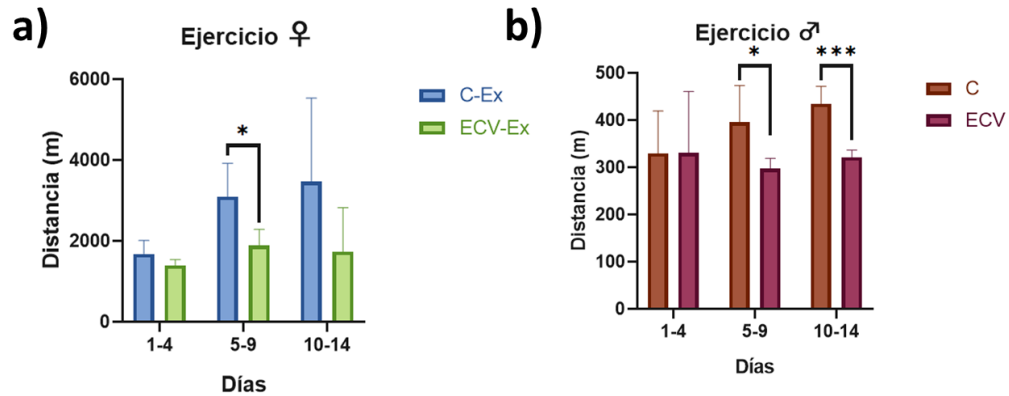
*Tabla 5. Variables Ponderales durante el periodo de ejercicio.*

	C-Sed	C-PF	C-Ex	ECV-Sed	ECV-PF	ECV-Ex
CAD (g) - ♀	16.87 ± 0.11	14.04 ± 0.00*	14.69 ± 0.95*	15.99 ± 0.16	12.24 ± 0.00***#	12.56 ± 0.54***#
CAD (g) - ♂	24.77 ± 0.40	17.64 ± 0.00*	18.01 ± 1.47*	22.61 ± 0.42	19.19 ± 0.00*	18.63 ± 1.18*
GPC (g) - ♀	20.83 ± 3.63	6.33 ± 3.57*	3.83 ± 2.37*	23.17 ± 4.00	-5.83 ± 3.92***#	-7.17 ± 4.30***#
GPC (g) - ♂	46.50 ± 3.41	8.67 ± 5.27**	-14.33 ± 21.65**	44.17 ± 3.72	19.33 ± 1.94*	31.33 ± 5.17**
CAR (g/kg PC)- ♀	63.85 ± 0.78	54.80 ± 1.65**	59.04 ± 3.44**	61.37 ± 2.15	49.66 ± 0.92***#	49.91 ± 1.44***#
CAR (g/kg PC)- ♂	55.16 ± 1.66	44.27 ± 0.75*	47.93 ± 4.23*	53.50 ± 1.38	46.13 ± 2.34*	44.16 ± 2.92*
EA (g/100g alim)- ♀	10.61 ± 1.87	3.41 ± 1.92*	2.15 ± 1.35**	11.89 ± 1.79	-3.66 ± 2.46***#	-5.11 ± 2.92***#
EA (g/100g alim)- ♂	16.51 ± 1.19	3.77 ± 2.29**	-8.27 ± 10.52**	14.93 ± 1.12	7.68 ± 0.77**	12.29 ± 1.64**

CAD: Consumo de Alimento Diario; GPC: Ganancia de Peso Corporal; CAR: Consumo de Alimento Relativo; EA: Eficiencia de Alimento. Los resultados se expresan en Promedio ± EE (n=6) y analizados por ANOVA de dos vías. Significancia de las ANOVAs después de la prueba *post hoc* \*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$ , \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ; #:  $P \leq 0.05$  vs. C del mismo grupo experimental.

#### VIII.IV. El ECV durante la adolescencia reduce la disposición al ejercicio voluntario en la edad adulta.

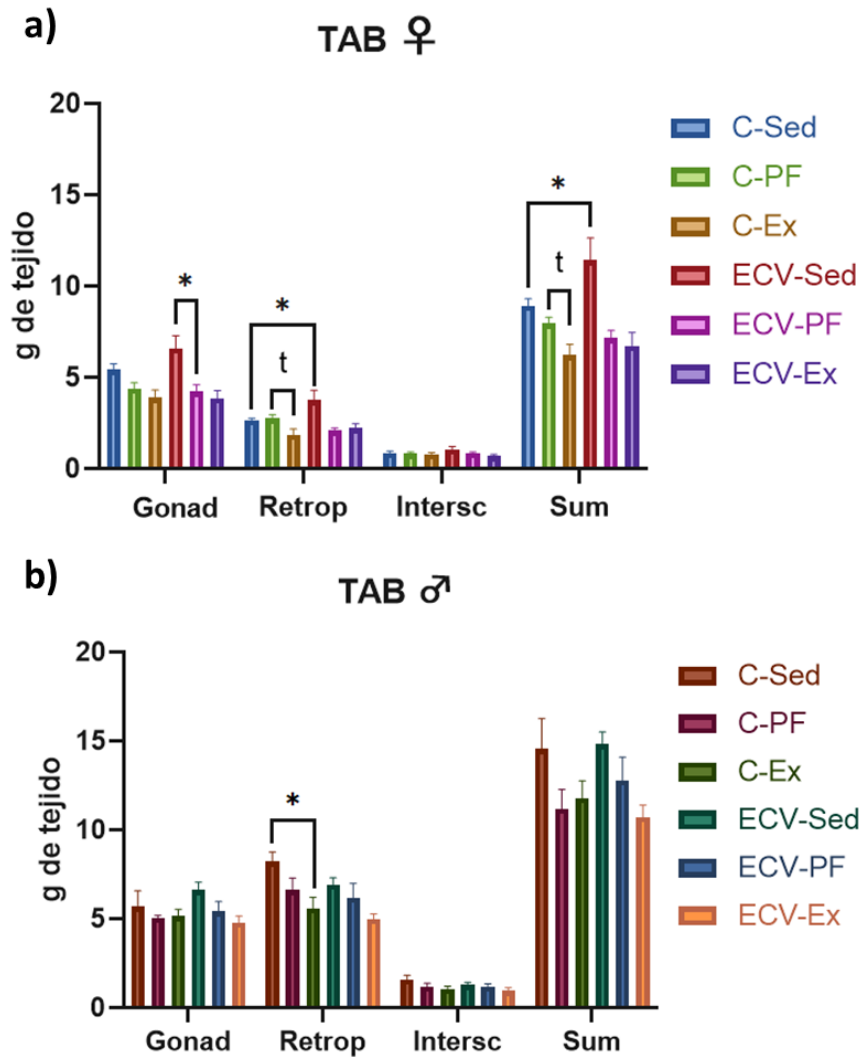
Durante el protocolo de ejercicio se determinó la distancia que recorrían los animales mediante el número de vueltas que daban las ruedas de ejercicio y conociendo la circunferencia de la rueda, reportando los resultados en metros recorridos. De acuerdo a los datos obtenidos, se observa que las hembras corrieron más en comparación con los machos, concordando con lo reportado en la literatura (Parra-Montes de Oca y col., 2019; Jaimes-Hoy y col., 2021). Además, se observó que los animales que fueron sometidos al protocolo de ECV presentaron una menor disposición a realizar ejercicio tanto en hembras como en machos (Figura 6).



**Figura 6.** Distancia recorrida por los animales ejercitados. Se registró la distancia recorrida por los animales durante los 14 días que duró el protocolo de ejercicio voluntario. Prueba t. \*:P ≤ 0.05, \*\*:P ≤ 0.01, \*\*\*:P ≤ 0.001.

#### VIII.V. El estrés crónico variable durante la adolescencia favorece la acumulación de tejido adiposo blanco en ratas hembras en la adultez.

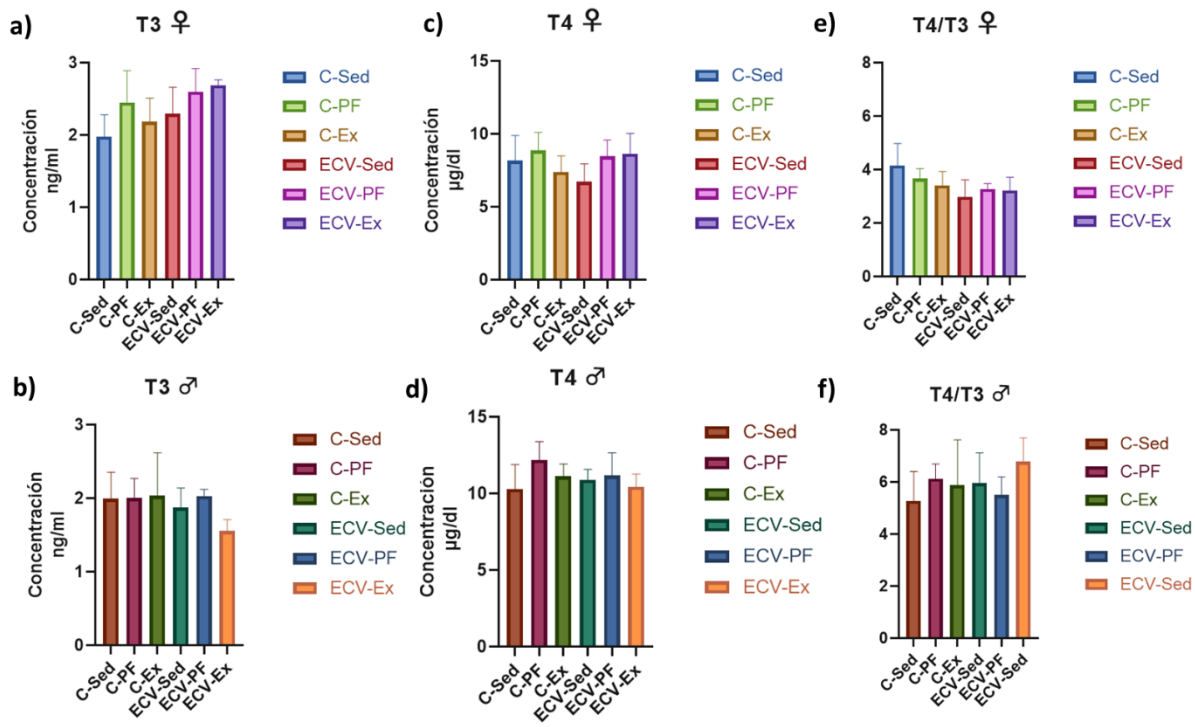
Tanto en hembras como en machos no se observaron diferencias significativas entre los grupos Sedentarios (C-Sed y ECV-Sed) y los Ejercitados (C-Ex y ECV-Ex). Sin embargo, en hembras se observa una mayor cantidad de tejido adiposo blanco almacenado en el grupo ECV-Sed en comparación con el grupo C-Sed, indicando que el ECV favorece acumulación de tejido adiposo blanco en las hembras. En los machos sólo se observa una diferencia significativa entre el grupo C-Sed y C-Ex en el TAB retroperitoneal, pero en la suma total no hubo diferencias, sugiriendo que los machos pueden estar usando las reservas de grasa visceral cuando realizan ejercicio.



**Figura 7.** Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario en el peso del tejido adiposo blanco de ratas macho y hembra. TAB: Tejido Adiposo Blanco; Gonad: Gonadal; Retrop: Retroperitoneal; Intersc: Interscapular; Sum: Suma; g: gramos. Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  E. E. (n=6) y analizados por ANOVA de 2 vías. Significancia de las ANOVAs después de la prueba *post hoc* \*:  $P \leq 0.05$ ; †:  $P \leq 0.05$  analizada por *t* de student.

#### VIII.VI. El ECV y el ejercicio voluntario no alteran los niveles de hormonas tiroideas en ratas de ambos sexos.

Para conocer el estado del eje tiroideo, en este experimento se cuantificó la concentración de las hormonas tiroideas T3 y T4 en suero con pruebas ELISA, además se calculó la relación entre la concentración de ambas hormonas. No se aprecian diferencias ni en la concentración de HT, ni en la relación T4/T3, entre ninguno de los grupos en ninguno de los dos sexos.

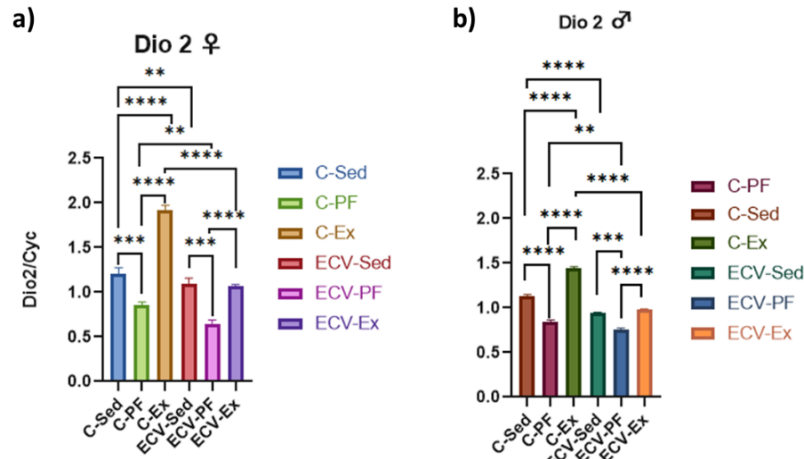


**Figura 8.** Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio sobre la concentración sérica de HT de ratas macho y hembra. a) Concentración sérica de T3 en hembras. b) Concentración sérica de T3 machos. c) Concentración sérica de T4 hembras. d) Concentración sérica de T4 machos. e) Relación T4/T3 en hembras. f) Relación T4/T3 en machos. Los resultados están expresados en promedio  $\pm$  E. E. (n=6)

## VIII.VII. El estrés crónico variable durante la adolescencia afecta el metabolismo del tejido adiposo blanco

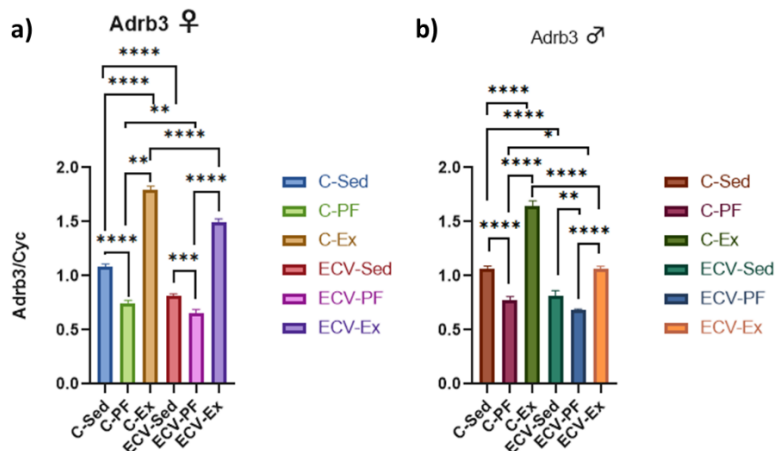
Para evaluar el efecto del ejercicio en la lipólisis regulada por las HT, se analizó la expresión de los genes *Dio2*, *Adrb3* y *Hsl* del TAB de la región gonadal, esto debido a que es una región que pertenece al área visceral que facilita la movilización de las reservas de grasa a otros tejidos como respuesta al ejercicio (Chusyd y col., 2016).

El ejercicio estimula la expresión de *Dio2* tanto en machos como en hembras de ambos grupos experimentales (Figura 9); sin embargo, esta respuesta fue menor en los animales ECV de ambos sexos (hay un aumento en la expresión de *Dio2* del 71% y 30% en los machos C-Ex y ECV-Ex respectivamente; y un aumento del 95% y 71% en las hembras C-Ex y ECV-Ex respectivamente. Estos resultados se expresan en % de PF a 100%).



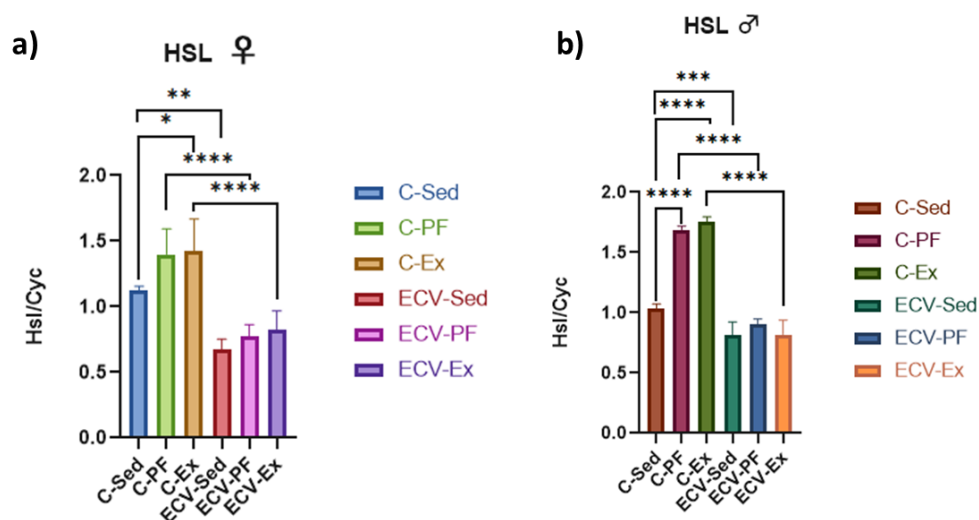
**Figura 9.** Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario en los niveles de expresión de *Dio2* en ratas hembra (a) y macho (b). La expresión de *Dio2* se normalizó con la expresión de ciclofilina, datos presentados en Promedio  $\pm$  E. E. (n=6) y analizados por ANOVA de 2 vías. Significancia de las ANOVAs  $P < 0.05$ . Prueba *post hoc* \*\*:  $P \leq 0.01$ , \*\*\*:  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

El ejercicio promovió la expresión de *Adrb3* en el TAB independientemente del sexo y el grupo experimental (Figura 10), aunque este aumento en la expresión de este gen es menor en los machos ECV-Ex. Esto puede relacionarse a que el ejercicio activa la respuesta del SNS, aumentando la liberación de NE (Dishman y col., 2006); si bien no se ve inhibición en la respuesta al ejercicio por parte del ECV, hay una menor respuesta en los grupos ECV contra el nivel de respuesta de los C-ECV evaluados contra sus respectivos grupos PF (Machos C-Ex: aumento del 112%; Machos ECV-Ex: aumento del 56%; Hembras C-Ex: aumento del 139%; Hembras ECV-Ex: aumento del 127%. Estos resultados se expresan en % de PF a 100%).



**Figura 10.** Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario en los niveles de expresión de *Adrb3* en ratas hembra (a) y macho (b). La expresión de *Adrb3* se normalizó con la expresión de ciclofilina, datos presentados en Promedio  $\pm$  E. E. (n=6) y analizados por ANOVA de 2 vías. Significancia de las ANOVAs  $P < 0.05$ . Prueba *post hoc* \*\*:  $P \leq 0.01$ , \*\*\*:  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

Tanto en hembras como en machos los niveles de expresión de *Hsl* son mayores en los grupos Control al compararlos con su contraparte ECV. Se observa una diferencia significativa entre los grupos C-Sed y C-PF, C-Ex, esto puede deberse a que tanto la restricción de alimento como el ejercicio provocan la movilización de ácidos grasos para mantener el balance energético por lo que hay un aumento en la lipólisis. Este aumento en los niveles de expresión de *Hsl* no se ve en las ninguno de los grupos ECV, habría que investigar más a fondo los niveles de otras enzimas lipolíticas para evaluar cómo se ven afectadas por el estrés.



**Figura 11.** Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario en los niveles de expresión de *Hsl* de ratas hembra (a) y macho. La expresión de HSL se normalizó con la expresión de ciclofilina, datos presentados en Promedio  $\pm$  E. E. (n=6) y analizados por ANOVA de 2 vías. Significancia de las ANOVAs  $P < 0.05$ . Prueba *post hoc* \*\*:  $P \leq 0.01$ , \*\*\* :  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $P \leq 0.0001$ .

## IX. Discusión

El objetivo central de este trabajo fue evaluar el efecto del ejercicio en ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante la adolescencia sobre la respuesta de algunos genes involucrados en la lipólisis y regulados por las hormonas tiroideas en el tejido adiposo blanco. Como herramienta para analizar los cambios causados por el ECV durante la adolescencia y por el protocolo de ejercicio durante la etapa adulta se midieron distintas variables ponderales: CAD; GPC; CAR y EA. El ECV indujo un mayor consumo de alimento principalmente en las hembras, pudiéndose deber a distintos factores, uno de ellos es el aumento en la grelina circulante, una hormona reguladora del metabolismo, causado por el estrés crónico (Patterson y col., 2013), el cual genera a su vez un aumento del apetito y con ello un mayor consumo de alimento. Aunque se haya observado un mayor consumo de alimento de las hembras ECV, este no se vio reflejado en un aumento de la GPC, lo que puede sugerir que la mayor parte del alimento se esté almacenando en forma de grasa. En los grupos ECV de ambos sexos se observa una eficiencia de alimento menor en comparación con sus grupos Control; Rabasa y col. (2019) reportan una disminución en la eficiencia de alimento ante estrés crónico homotípico sin verse alterado el consumo de alimento, esto puede indicar que el estrés heterotípico, además de generar aumento en el consumo de alimento, también impide que sea aprovechado de manera óptima.

Las pruebas conductuales que se realizaron durante la adolescencia revelaron que los grupos sometidos al ECV presentaron un comportamiento alterado, especialmente en hembras. En la prueba PAS, las hembras ECV registraron una menor cantidad de movimientos en comparación con las hembras control; en el caso de los machos tuvieron un menor porcentaje de tiempo registrado en BA al compararse con el grupo control durante la última prueba de EPM. Se ha reportado una asociación entre la exposición a estresores y episodios de depresión (Ménard y Col. 2016; Campos, 2013). El comportamiento depresivo puede relacionarse con una menor actividad exploratoria (Krishnan y Nestler, 2012) lo que se aprecia en la cantidad reducida de movimientos que tuvieron los animales ECV. Bowman y col. (2006) reportan que el estrés también actúa como un agente ansiolítico en las hembras jóvenes mientras que en machos actúa como un agente ansiogénico, por lo que se podría haber esperado una mayor actividad locomotora por parte de las hembras ECV en el transcurso del periodo de estrés. Sin embargo, las hembras mostraron un mayor comportamiento ansioso en el DPN 58, lo que puede indicar que en específico este protocolo de estrés genera una respuesta ansiogénica en hembras. En el caso de los machos, aparentemente no se observan efectos producidos por el estrés hasta después del DPN 64. Las pruebas conductuales realizadas y la literatura nos indican que existe dimorfismo sexual en cuanto a la respuesta al estrés.

Se ha llegado a considerar al estrés como un factor que provoca alteraciones en el balance energético, que dependiendo del tipo de estresor y el tiempo durante el cual se presente puede causar ganancia o pérdida de peso. El estrés crónico favorece la acumulación de TAB como consecuencia de la hiperactivación del eje HPA, y de los efectos adipogénicos de los glucocorticoides (Rabasa y Dickson, 2016) y la inhibición de la actividad del eje HPT (Joseph-Bravo y col., 2015a). También se sabe que el ejercicio activa al eje HPT (Uribe y

col., 2014; Parra-Montes de Oca y col., 2019), además de que dependiendo de la intensidad y tiempo promueve la actividad del SNS y del eje HPA (Chen y col., 2017). La actividad física en este caso podría estar promoviendo la movilización de las reservas de lípidos del TAB (Ogasawara y col., 2015). Las alteraciones metabólicas que pudo generar el estrés y cómo es que éste puede atenuar la respuesta al ejercicio voluntario se observaron como cambios en las variables ponderales, en la composición corporal y en la expresión de genes involucrados en la actividad del eje HPT y el metabolismo energético en TAB.

Los cambios en cuanto a las variables ponderales, luego del protocolo de ejercicio, sólo se vieron reflejados significativamente en el peso de las grasas totales en hembras, donde el peso de la suma de TAB es mayor en el grupo ECV-Sed en comparación con el C-Sed, y en la grasa retroperitoneal en machos, mostrando que efectivamente el estrés provoca una mayor acumulación de TAB y que las hembras son más susceptibles a dicha acumulación. Este evento podría atribuirse a la desregulación del eje HPA provocada por el protocolo de ECV en la adolescencia. Se ha demostrado que el estrés crónico puede alterar el HPA. Causando una disminución de la sensibilidad a la regulación de retroalimentación negativa o una sensibilidad a los glucocorticoides alterada en el tejido adiposo y el tejido musculoesquelético. Un exceso en la concentración de glucocorticoides se ha asociado con un aumento en la acumulación de grasa visceral. Ya que altera los niveles de expresión de hormonas que interactúan con los glucocorticoides y están relacionadas con el balance energético y la ingesta calórica como la insulina, la grelina, la leptina y el NPY. estimulando el consumo de alimento y la acumulación de grasa (Tanja y Spel, 2007; Sinha y Jastreboff, 2013).

En cuanto a la cantidad de ejercicio realizado, se observa que tanto en hembras como en machos los animales ECV recorrieron una distancia menor en comparación con los controles. De acuerdo con lo reportado en la literatura, los machos presentan una menor actividad física en comparación con las hembras y dicha predisposición a la actividad física puede verse modificada por factores externos durante el desarrollo (Rosenfeld, 2016). Estos datos aunados a los recabados en la prueba conductual PAS realizada durante el protocolo de ECV, muestran que el estrés en este caso representa un factor que afectó la disposición a la realización de actividad física tanto en hembras como en machos.

Al analizar la concentración de diferentes moléculas relacionadas con el eje HPT se observa que el ejercicio en este caso no alteró de manera significativa la concentración de hormonas tiroideas como se ha reportado anteriormente (Uribe y col., 2014; Parra-Montes de Oca y col., 2019; Jaimes-Hoy y col., 2021). El eje HPT es modulado a niveles centrales y periféricos por distintos elementos para garantizar su retorno rápido a la homeostasis una vez que se ve alterado (Bianco y col., 2019). La concentración sérica de HT ante estímulos estresantes es rápida pero transitoria, la vida media de T4 junto con el control periférico de los niveles circulantes de T3 mediados por Dio1 de hígado y riñones, hacen difícil detectar cambios en las HT a nivel sérico por lo que resulta mejor hacerlo en órganos blanco (Jaimes-Hoy y col., 2021). Además, es importante resaltar que los resultados reportados pueden verse influenciados por el horario en el que se colectó la sangre y el momento del



sacrificio, debido a que las concentraciones de hormonas tiroideas tienden a fluctuar a lo largo del día dependiendo de los requerimientos energéticos y los ritmos circadianos (Fliers y col., 2015; Joseph-Bravo y col., 2015a). El estrés crónico y el ejercicio voluntario pueden alterar la concentración sérica de las hormonas tiroideas en las hembras (Parra-Montes de Oca y col., 2019), aunque en este trabajo no se observaron estos cambios. Es importante resaltar que a nivel de órganos blancos puede haber un incremento de T3 debido a que se reporta un incremento en la expresión de *Dio2*. En tejidos periféricos, la *Dio2* está involucrada en la regulación del eje HPT ya que participa activamente en la desiodinación de la T4 en su forma activa T3 lo que promueve la expresión de genes regulados por hormonas tiroideas (Ortiga-Carvalho y col., 2016).

Para comprobar cómo es que la lipólisis mediada por HT se ve afectada por el ejercicio y el estrés se evaluó la expresión de diferentes genes en el tejido adiposo blanco. La expresión de *Adrb3* está regulada por T3 (Liu y col., 2003), este receptor modula la actividad de las catecolaminas que son liberadas por el SNS desencadenando una cascada de reacciones en los adipocitos promoviendo la lipólisis (Fain y col., 1997; Hackeney y Mehis, 2016). Las catecolaminas se unen al menos a cinco subtipos de receptores adrenérgicos ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$ ) que se expresan en adipocitos y se acoplan con el sistema de adenilciclasa para activar o inhibir la actividad de la HSL (Liu y col., 2003). La expresión de *Adrb3* se vio aumentada por efecto del ejercicio en ambos sexos, este aumento se vio atenuado por el ECV, surgiendo que el estrés previo al ejercicio inhibió la expresión de este receptor. En Csanova y Col. 2017, se reporta una disminución de la expresión de receptor *Adrb3* en el TAB luego de un protocolo de estrés con inyecciones de lipopolisacárido (LPS) en hembras, y una mayor expresión en macho. Lo cual además de mostrar un posible dimorfismo sexual indica que el estrés sí altera la expresión de este receptor, aunque aún se desconoce el mecanismo por el cual se ve alterada la expresión de este gen a causa del estrés. Por lo que sería de interés ahondar más en el mecanismo de respuesta a estrés de este receptor.

La expresión de la *Hsl* en los grupos control se ve aumentada en el grupo ejercitado y con alimentación pareada, esto se puede deber a que en ambos casos hay un déficit calórico lo que promueve la movilización de las reservas de grasa (Zhu y col., 2019). Se ha reportado que en ratas hembra adultas el estrés crónico variable aumenta los niveles de expresión de *Hsl* (Kovačević y col. 2017); sin embargo, en este trabajo no se observó este efecto, tal vez porque el protocolo de estrés se realizó durante la adolescencia, lo que pudiera ocasionar un efecto inhibitorio en la respuesta esperada, aunque se necesitarían realizar otros experimentos para llegar a esta conclusión. La actividad de la *Hsl* está regulada por la respuesta de  $\beta 3$ -AR (Zhu y col., 2019). Sería interesante analizar la expresión de los genes *Hsl*, *Adrb3* y *Dio2* evaluados en otras áreas donde se distribuye el tejido adiposo, así como analizar el tamaño de los adipocitos de los animales experimentales cómo se hizo en Kovačević y col. (2017) y observar si hay diferencias significativas entre los grupos.

## X. Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran que el protocolo de Estrés Crónico durante la adolescencia generó una alteración en la respuesta metabólica al ejercicio. Los genes involucrados en la lipólisis y regulados por hormonas tiroideas *Adrb3*, *Dio2* y *Hsl* se vieron atenuados en los animales ECV. Además, se reporta dimorfismo sexual tanto en la conducta de los animales como en la acumulación de tejido adiposo blanco, dónde se reporta que las hembras en el grupo ECV presentan un comportamiento alterado y son más susceptibles a la acumulación de grasa causada por estrés. Lo que nos indica que el ECV durante la adolescencia influye en la actividad del eje HPT, en la conducta y en los mecanismos de respuesta al ejercicio. Aún falta dilucidar que otros genes lipolíticos se ven alterados por el estrés durante la adolescencia, cómo afecta la distribución de tejido adiposo blanco y hasta qué punto el ejercicio en la etapa adulta puede atenuar los efectos provocados por el estrés.

## XI. Perspectivas

Con base en lo observado en este proyecto se pueden proponer análisis adicionales, utilizando muestras de tejido y de suero, dónde se incluyan:

- Evaluación de los niveles de expresión de otras enzimas lipolíticas como Perilipina, MAGL y ATGL.
- Analizar por Western blot la expresión de proteínas que responden a hormonas tiroideas en el TAB.
- Analizar por inmunocitoquímica la presencia de proteínas que responden a hormonas tiroideas en el TAB.
- Evaluar cortes histológicos de TAB con el objetivo de comparar el tamaño y cantidad de adipocitos entre grupos experimentales.

## I. Referencias

1. Adlard PA, Cotman CW. (2004) Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience*. 124(4):985-92.
2. Bale TL, Epperson CN. (2015). Sex differences and stress across the lifespan. *Nat Neurosci*. 18(10):1413-1420.
3. Bianco, A., Dumitrescu, A., Gereben, B., Ribeiro, M., Fonseca, T., Fernandes, G.y Bocco, B. (2019) Paradigms of Dynamic Control of Thyroid Hormone Signaling. *Endocr. Rev.* 40(4),1000-1047.
4. Volume, Issue 4, August 2019, Pages 1000–1047
5. Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale MIC. (2015). Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update. *Arch Endocrinol Metab*. 59(4):335-342.
6. Bowman R, Maclusky N, Diaz S, Zrull M, Luine V. (2006). Aged rats: Sex differences and responses to chronic stress. *Brain Res*. 1126(1):156–166.
7. Campos, A. Fogaça, M., Aguiar, D., Guimarãe, F. (2013) Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz J Psychiatry*. 35 Suppl 2:S101-S111.
8. Carmean, C., Cohen, R. y Brady, M. (2014) Systemic regulation of adipose metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1842(3):424-430.
9. Casey BJ, Jones R, Hare T. (2008) The Adolescent Brain. *Ann NY Acad Sci*. 1124(1):111-126.
10. Castillo-Campos A, Gutiérrez-Mata A, Charli JL, Joseph-Bravo P. (2020) Chronic Stress Inhibits Hypothalamus–Pituitary–Thyroid Axis and Brown Adipose Tissue Responses to Acute Cold Exposure in Male Rats. *J Endocrinol Invest*. 44:713-723.
11. Chen C, Nakagawa S, An Y, Ito K, Kitaichi Y, Kusumi I. (2017) The exercise-glucocorticoid paradox: How exercise is beneficial to cognition, mood, and the brain while increasing glucocorticoid levels. *Front Neuroendocrinol*. 44:83-102.
12. Chomczynski P, Sacchi N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 1(2):581-5.
13. Chusyd D, Wang D, Huffman D, Nagy T. (2016). Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Front Nutr*. 3:10.
14. De Vriendt T, Moreno LA, De Henauw S. (2009). Chronic stress and obesity in adolescents: Scientific evidence and methodological issues for epidemiological research. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 19(7):511–519.
15. Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Gandevia SC, Gomez-Pinilla F, Greenwood BN, Hillman CH, Kramer AF, Levin BE, Moran TH, Russo-Neustadt AA, Salamone JD, Van Hoomissen JD, Wade CE, York DA, Zigmond MJ. (2006) Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring)*. 14(3):345-356.
16. Du Preez A, Eum J, Eiben I, Eiben P, Zunszain PA, Pariante CM, Fernandes, C. (2021). Do different types of stress differentially alter behavioural and neurobiological outcomes associated with depression in rodent models? A systematic review. *Front Neuroendocrinol*. 61:100896.

17. Engelmann M, Landgraf R, Wotjak C. (2004) The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 25:132–149.
18. Fain JN, Coronel EC, Beauchamp MJ, Suleiman W, Bahouth SW. (1997) Expression of leptin and  $\beta$ 3-adrenergic receptors in rat adipose tissue in altered thyroid states. *Biochem J.* 322(1):145–150.
19. Fekete C, Lechan R. (2014). Central Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Under Physiological and Pathophysiological Conditions. *Endocr Rev.* 35(2):159–194.
20. Fliers E, Bianco AC, Langouche L, Boelen A. Thyroid Function in Critically Ill Patients. *Lancet Diabetes Endocrinol.* (2015) 3:816-825.
21. Gan S, Patel K. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol.* 133(9):e12.
22. Goliszek A, Crawford G, Lawrence H, Bennett J, Williams F, Hurley S. (1996). Effects of prepubertal stress on subsequent ACTH response to novel stress and CRH in male vs. female rats. *Stress Med.* 12:199–204.
23. Hackney, A. y Viru, M. (2016). Sports Physiology and Endocrinology (Endurance vs. Resistance Exercise). En: *Exercise and Human Reproduction* (pp. 175-192). Springer, New York, NY.
24. Hammerslag L, Gulley M. (2016) Sex differences in behavior and neural development and their role in adolescent vulnerability to substance use. *Behav Brain Res.* 298(Pt A):15-26.
25. Helmreich DL, Parfitt DB, Lu XY, Akil H, Watson SJ. (2005) Relation between the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology.* 81(3):183-92.
26. Herman J, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B. (2012) Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Biol Res.* 45(4) 292-298.
27. Hötting K, Röder B. (2013) Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neurosci Biobehav Rev.* 37(9 Pt B):2243-2257.
28. Jaimes-Hoy, L, Pérez-Maldonado A, Narváez-Bahena E, de la Cruz-Guarneros N, Rodríguez-Rodríguez A, Charli JL, Soberón X, Joseph-Bravo P. (2021). Sex Dimorphic Changes in Trh gene Methylation and Thyroid-Axis Response to Energy Demands in Maternally-Separated Rats. *Endocrinology.* 162:bqab110.
29. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Charli JL. (2015a) Regulation of TRH Neurons and Energy Homeostasis-Related Signals under Stress. *J Endocrinol* 224:R139-R159.
30. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Uribe RM, Charli JL. (2015b) 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *J Endocrinol.* 227(3):X3.
31. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Charli JL. Advances in TRH signaling. *Rev Endocr Metab Disord* (2016) 17:545-558.
32. Kovačević S, Nestorov J, Matić G, Elaković I. (2017). Fructose and stress induce opposite effects on lipid metabolism in the visceral adipose tissue of adult female rats through glucocorticoid action. *Eur. J. Nutr.,* 56(6), 2115–2128.

33. Krishnan, V. y Nestler, E. (2012) Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 7: 121–147.
34. Little A G, (2016) A review of the peripheral levels of regulation by thyroid hormone, *J Comp Physiol B.* 186:677-688.
35. Liu, YY., Schultz, J. y Brent, G. (2003) A Thyroid Hormone Receptor  $\alpha$  Gene Mutation (P398H) Is Associated with Visceral Adiposity and Impaired Catecholamine-stimulated Lipolysis in Mice. *J. Biol. Chem.* 278:(40), 3. 38913–38920.
36. McCormick C, Mathews I, Thomas C, Waters P. (2010). Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn.* 72(1):73–85.
37. Ménard, C., Hodes, G. E., & Russo, S. J. (2016). Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. *Neuroscience*, 321, 138–162.
38. Mullur R., Liu, YY., y Brent G. (2014) Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol Rev.* 94: 355–382.
39. Obregon, M.-J. (2014). Adipose tissues and thyroid hormones. *Front. Physiol*, 5.
40. Ogasawara J, Izawa T, Sakurai T, Sakurai T, Shirato K, Ishibashi Y, Ishida H, Ohno H, Kizaki T. (2015) The Molecular Mechanism Underlying Continuous Exercise Training-Induced Adaptive Changes of Lipolysis in White Adipose Cells. *J Obes.* 2015:473430.
41. Ortega-Carvalho T, Chiamolera M, Pazos-Moura C, Wondisford F. (2016). Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Compr Physiol.* 6:1387-1428.
42. Parra-Montes de Oca M A, Gutiérrez-Mariscal M, Salmerón-Jiménez M F, Jaimes-Hoy L, Charli J-L, Joseph-Bravo P. (2019) Voluntary exercise-induced activation of thyroid axis and reduction of whit fat depots is attenuated by chronic stress in a sex dimorphic pattern in adult rats. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 10(418):1-13.
43. Patterson Z, Khazall R, Mackay H, Anisman H, Abizaid A. (2013) Central ghrelin signaling mediates the metabolic response of C57Bl/6 male mice to chronic social defeat stress. *Endocrinology.* 154:1080-1091.
44. Pervanidou P, Chrousos GP. (2012). Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism.* 61(5):611–619.
45. Peters A, McEwen BS, Friston K. (2017) Uncertainty and stress: Why it causes diseases and how it is mastered by the brain. *Prog Neurobiol.* 156:164-188.
46. Prut L, Belzung C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 463(1-3):3–33.
47. Rabasa C, Dickson S. (2016) Impact of stress on metabolism and energy balance. *Curr Opin Behav Sci.* 9:71-77.
48. Rabasa C, Askevik K, Schéle E, Hu M, Vogel H, Dickson SL. (2019) Divergent Metabolic Effects of Acute Versus Chronic Repeated Forced Swim Stress in the Rat. *Obesity (Silver Spring)*. 27(3):427-433.
49. Rivera JA, Colchero MA, Fuentes ML, González de Cosío T, Aguilar CA, Hernández G, Barquera S. (2018). La obesidad en México. Estado de la política pública y recomendaciones para su prevención y control. Instituto Nacional de Salud Pública. México.

50. Rodgers R, Dalvi A. (1997). Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 21(6):801-810.
51. Romeo RD. (2013) The teenage brain: The stress response and the adolescent brain, *Curr Dir Psychol Sci.* 22(2):140-145.
52. Rosenfeld CS. (2016). Sex-dependent differences in voluntary physical activity. *J Neurosci Res.* 95(1-2):279-290.
53. Schneider M. (2013) Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res.* 354(1):99-106.
54. Sinha, R. y Jastreboff, A.M. (2013) Stress as a Common Risk Factor for Obesity and Addiction. *Biol. Psychiatry.* 73:827–835.
55. Spear LP. (2013). Adolescent neurodevelopment. *J Adolesc Health.* 52(2 Suppl 2):S7-S13.
56. Stranahan AM, Khalil D, Gould E. (2007). Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus.* 17(11):1017-1022.
57. Stranahan AM, Lee K, Mattson MP. (2008). Central Mechanisms of HPA Axis Regulation by Voluntary Exercise. *Neuromol med.* 10(2):118-127.
58. Tanja, A. y Spel, E. (2007) Stress, eating and the reward system. *Physiol. Behav.* 91 (2007) 449–458
59. Toth E, Gersner R, Wilf-Yarkoni A, Raizel H, Dar D E, Richter-Levin G, Levit O, Zangen A, (2008) Age-dependent effects of chronic stress on brain plasticity and depressive behavior, *J Neurochem.* 107:522-532.
60. Tsiloulis T, Watt MJ. (2015). Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 135:175-201.
61. Turecki, G. y Meaney, M. (2014) Effects of the social environment and stress on glucocorticoid receptor gene methylation: a systematic review. *Biol Psychiatry.* 79(2): 87–96.
62. Ulrich-Lai YM, Herman JP. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Rev.* 10:397-409.
63. Uribe R M, Jaimes-Hoy L, Ramírez-Martínez C, García-Vázquez A, Romero F, Cisneros M, Cote-Vélez A, Charli J-L, Joseph-Bravo P. (2014) Voluntary exercise adapts the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male rats. *Endocrinology.* 155(5):2020-2030.
64. Walsh R, Cummins R. (1976). The open-field test: A critical review. *Psychol Bull.* 83(3):482-504
65. Zheng H, Liu Y, Li W, Yang B, Chen D, Wang X, Jiang Z, Wang H, Wang Z, Cornelisson G, Halberg F. (2006) Beneficial effects of exercise and its molecular mechanisms on depression in rats. *Behav Brain Res.* 168(1):47-55.
66. Zhu Q, Glazier BJ, Hinkel BC, Cao J, Liu L, Liang C, Shi H. (2019) Neuroendocrine Regulation of Energy Metabolism Involving Different Types of Adipose Tissues. *Int J Mol Sci.* 20(11):2707.

## II. Anexos

Anexo I. Calendario de Protocolo de Estrés Crónico Variable en Ratas hembra

	DPN 31	DPN 32	DPN 33	DPN 34	DPN 35	DPN 36	DPN 37
M	Caja inclinada <b>3 h</b>			Ruido blanco <b>3h</b>	Plataforma elevada <b>15 min</b>		PAS
T		<b>Aislamiento</b>	<b>Luz encendida</b>			<b>Aislamiento</b>	
	DPN 38	DPN 39	DPN 40	DPN 41	DPN 42	DPN 43	DPN 44
M	Frío <b>1 h</b>		RES <b>1h</b>	Luz estroboscópica <b>3h</b>		Ayuno <b>4 h</b>	OFT
T		<b>Luz encendida</b>			<b>Aislamiento</b>		
	DPN 45	DPN 46	DPN 47	DPN 48	DPN 49	DPN 50	DPN 51
M			Plataforma elevada <b>15 min</b>	Luz estroboscópica <b>3h</b>	RES <b>1h</b>	Caja inclinada <b>3h</b>	EPM
T	<b>Luz encendida</b>	Ayuno <b>Toda la noche</b>					
	DPN 52	DPN 53	DPN 54	DPN 55	DPN 56	DPN 57	DPN 58
M	Ruido blanco <b>3h</b>			Caja inclinada <b>3 h</b>	Frío <b>1 h</b>	Plataforma elevada <b>15 min</b>	OFT
T		Ayuno <b>Toda la noche</b>	<b>Luz encendida</b>				
	DPN 59	DPN 60					
M		<b>Prueba hedónica</b>					
T	<b>Aislamiento</b>						

*\*M:Mañana; T:Tarde; DPN: Día Post Natal.*

Anexo II. Calendario de Protocolo de Estrés Crónico Variable en Ratas macho.

	DPN 31	DPN 32	DPN 33	DPN 34	DPN 35	DPN 36	DPN 37
M			Ruido blanco <b>3 h</b>	Caja inclinada	Plataforma elevada <b>15 min</b>	PAS	Luz estroboscópica <b>3 h</b>
T	<b>Aislamiento</b>	<b>Luz encendida</b>					
	DPN 38	DPN 39	DPN 40	DPN 41	DPN 42	DPN 43	DPN 44
M		RES <b>1 h</b>	Caja inclinada <b>3 h</b>	Luz estrob. <b>3h</b>		OFT	Ruido blanco <b>3 h</b>
T	<b>Luz encendida</b>				<b>Aislamiento</b>		
	DPN 45	DPN 46	DPN 47	DPN 48	DPN 49	DPN 50	DPN 51
M	RES <b>1h</b>		Plataforma elevada <b>15 min</b>	Ruido blanco <b>3 h</b>	Ayuno <b>4 h</b>	EPM	Caja inclinada <b>3 h</b>
T		<b>Luz encendida</b>					
	DPN 52	DPN 53	DPN 54	DPN 55	DPN 56	DPN 57	DPN 58
M	Frío <b>1 h*</b>		Plataforma elevada <b>15 min</b>		Luz estrob. <b>3 h</b>	OFT	RES <b>1 h</b>
T		<b>Aisla-miento</b>		Ayuno <b>Toda la noche</b>			
	DPN 59	DPN 60	DPN 61	DPN 62	DPN 63	DPN 64	DPN 65
M				Plataforma elevada <b>15 min</b>	Ruido blanco <b>3 h</b>	EPM	Caja inclinada <b>3 h</b>
T	<b>Luz encendida</b>	Ayuno <b>Toda la noche</b>	<b>Aislamiento</b>				
	DPN 66	DPN 67	DPN 68	DPN 69	DPN 70		
M	RES <b>1 h</b>	Frío <b>1 h*</b>	Luz estrobos. <b>3h</b>		<b>Prueba de hedónica</b>		
T				<b>Aisla-miento</b>			



Anexo III. Genes analizados y condiciones de PCR

<b>Gen</b>	<b>cDNA (µl)</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Secuencia del primer</b>
<b><i>Dio2</i></b>	2	64	26	S: GATGCTCCCAATTCCAGTGT AS: AGGCTGGCAGTTGCCTAGTA
<b><i>Adrb3</i></b>	4	64	27	S: TCTGTGCTGGCTGCCCTTCTT AS: CTTCTCCTCCCCCAACCCTCAA
<b><i>Hsl</i></b>	3	58	27	S: GTGGGGACCAGCAGTGAAAAA AS: GTGGCCTCATTGGGAGACT