



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EL ESTRÉS DURANTE LA ADOLESCENCIA DE RATAS MODIFICA SU
RESPUESTA A RETOS METABÓLICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. MARCO ANTONIO PARRA MONTES DE OCA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. PATRICIA ILEANA JOSEPH BRAVO
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN
Instituto de Neurobiología, UNAM

Dra. GINA LORENA QUIRARTE
Instituto de Neurobiología, UNAM

Cuernavaca, Morelos, México. Junio, 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.

JURADO

PRESIDENTE

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay
Instituto de Biotecnología, UNAM

SECRETARIO

Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza
Instituto de Biotecnología, UNAM

VOCAL

Dr. David Ricardo Orozco Solís
Instituto Nacional de Medicina Genómica

VOCAL

Dra. Carolina Escobar Briones
Facultad de Medicina, UNAM

VOCAL

Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Este proyecto fue realizado 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 dirección de la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo. El proyecto fue financiado con los donativos de CONACyT 284883 y DGAPA IN204316 e IN213419. Durante los estudios de doctorado se recibió el apoyo económico de la beca del Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT (273496) y la beca de Doctorado/Obtención de Grado del proyecto PAPIIT-DGAPA IN213419. Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico otorgado para la asistencia a dos congresos nacionales y uno internacional.

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Joseph, por permitirme estar en su laboratorio y apoyarme en todo lo que necesitaba durante mi estancia, aún en los tiempos difíciles de la pandemia.

A la Dra. Teresa Morales y la Dra. Gina Quirarte, quienes formaron parte de mi comité tutor, muchas gracias por sus comentarios y observaciones en los tutorales; también gracias por apoyarme en mi formación durante estos años.

Al Dr. Jean-Louis Charli, así como a la Dra. Antonieta Cote y la Dra. Rosa María Uribe, quienes también integran el laboratorio de neurobiología celular y molecular, muchas gracias por sus comentarios y sugerencias durante los seminarios, además de su apoyo en el trabajo del laboratorio.

A la Dra. Lorraine Jaimes, investigadora asociada de la Dra. Joseph, quien siempre me estuvo apoyando en todo lo involucrado con el trabajo del laboratorio y del bioterio.

A la Quim. Fidelia Romero, técnico académico del laboratorio, por su apoyo en todo lo relacionado con las técnicas de biología molecular.

Al QFB Miguel Cisneros, técnico académico del laboratorio, por su apoyo en la realización de los radioinmunoensayos para corticosterona y TSH.

Al técnico Manuel Villa por su valioso trabajo en el laboratorio y en el bioterio; y a Sandra Verónica Serrano por su apoyo en el mantenimiento y organización del material de laboratorio.

A la Unidad del Bioterio del Instituto de Biotecnología y todas las personas que lo integran, MVZ Elizabeth Mata, MVZ Graciela Cabeza, Elvira Villa, Sergio González, Francisco Reyes.

A la Unidad de Biblioteca del Instituto de Biotecnología, principalmente al LI Omar Arriaga por su apoyo técnico para la realización de mis exámenes tutorales y seminarios.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio: Andie, Angie, Ana, Yamili, Adair, Marlen, Mari Tere y demás personas que estuvieron conmigo durante estos años y me apoyaron ya sea durante los sacrificios, en el laboratorio o simplemente para pasar el rato.

A mis estudiantes, Biol. Karen Garduño y Ulises Barrera, gracias por su apoyo y por haber confiado en mí para dirigir su tesis de licenciatura.

Dedicatoria

*A mis padres, Irma y José Luis; y a mi hermano Julio.
Gracias por estar conmigo en todas las decisiones que
tomo, este trabajo también es de ustedes.*

Contenido

Índice de figuras	III
Índice de tablas	V
Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico y Antecedentes	
El estrés y sus efectos en el organismo	2
Generalidades del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides	5
El ejercicio y sus efectos en la actividad del eje HPT	8
Respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides al estrés y retos metabólicos en ratas	9
Estrés durante la adolescencia	10
Respuesta del eje HPT en la edad adulta en animales sometidos a estrés durante el desarrollo	14
Justificación	15
Hipótesis	15
Objetivos	16
Materiales y Métodos	
Animales	17
Protocolo 1: Estrés crónico por aislamiento social y ejercicio voluntario alternado	17
Protocolo 2: Estrés crónico variable durante la adolescencia y ejercicio voluntario diario	18
Pruebas conductuales	19
Variables ponderantes	22
Obtención de tejidos	23
Cuantificación de hormonas	23
Disección de cerebros	24

Extracción de RNA y RT-PCR	24
Análisis estadístico	25
Resultados	
Protocolo 1: Efecto del aislamiento social desde la adolescencia en la respuesta del eje tiroideo al ejercicio voluntario alternado en ratas adultas	
Variables ponderantes durante la adolescencia	26
Variables ponderantes y actividad física durante el periodo de ejercicio	27
Respuesta del eje HPA al ejercicio voluntario alternado y al aislamiento social	29
Respuesta del eje HPT al ejercicio voluntario alternado y al aislamiento social	29
Protocolo 2: Efecto del estrés crónico variable durante la adolescencia en la respuesta del eje tiroideo al ejercicio voluntario en ratas adultas	
Variables ponderantes durante la adolescencia	33
Pruebas conductuales	35
Efecto del ECV en las variables ponderantes y estado de los ejes HPA y HPT	37
Variables ponderantes y actividad física durante el periodo de ejercicio	40
Respuesta del eje HPA al ejercicio voluntario y al estrés crónico variable durante la adolescencia	41
Respuesta del eje HPT al ejercicio voluntario y al estrés crónico variable durante la adolescencia	42
Discusión	48
Conclusiones	58
Perspectivas	58
Referencias	59
Anexos	71

Índice de figuras

Figura 1. <i>Respuesta del organismo a un estresor</i>	3
Figura 2. <i>Esquema general del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales</i>	4
Figura 3. <i>Esquema general del eje hipotálamo-pituitaria tiroides, algunos puntos de regulación y órganos blanco</i>	7
Figura 4. <i>Periodo de pubertad y periodo estimado de adolescencia en ratas hembra y macho</i>	12
Figura 5. <i>Representación gráfica desarrollo neurológico de las regiones subcorticales y prefrontales con respecto a la edad</i>	13
Figura 6. <i>Diagrama experimental para el protocolo de aislamiento social y ejercicio voluntario alternado</i>	18
Figura 7. <i>Diagrama experimental del protocolo de estrés crónico variable durante la adolescencia y ejercicio voluntario diario</i>	19
Figura 8. <i>Esquema del sistema de actividad fotoeléctrica para la evaluación de la actividad locomotora en jaula</i>	20
Figura 9. <i>Esquema de la prueba de campo abierto</i>	21
Figura 10. <i>Esquema de la prueba de laberinto elevado de cruz</i>	22
Figura 11. <i>Regiones hipotalámicas obtenidas de cortes coronales de cerebros congelados</i>	24
Figura 12. <i>Consumo de alimento por día por rata y ganancia de peso corporal durante la adolescencia de ratas macho y hembra</i>	26
Figura 13. <i>Efecto del ejercicio voluntario alternado y el aislamiento social en el peso del tejido adiposo blanco de diferentes regiones de ratas macho y hembra</i>	28
Figura 14. <i>Efecto del aislamiento social y el ejercicio voluntario alternado en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales de ratas macho y hembra</i>	29
Figura 15. <i>Efecto del aislamiento social y el ejercicio voluntario alternado en los elementos reguladores del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides en el hipotálamo medio basal de ratas macho y hembra</i>	30
Figura 16. <i>Efecto del aislamiento social y el ejercicio voluntario alternado en la respuesta del eje HPT de ratas macho y hembra</i>	31
Figura 17. <i>Efectos del aislamiento social y el ejercicio voluntario alternado en la expresión relativa de genes en tejido adiposo pardo de ratas macho y hembra</i>	31
Figura 18. <i>Esquema general de los efectos del aislamiento social desde la adolescencia y el ejercicio voluntario alternado en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides y sus elementos reguladores</i>	32
Figura 19. <i>Efecto del estrés crónico variable durante la adolescencia en el consumo de alimento por día y ganancia de peso corporal de ratas macho y hembra</i>	34
Figura 20. <i>Efecto del ECV durante la adolescencia en la actividad física de ratas macho y hembra</i>	40
Figura 21. <i>Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en el peso del tejido adiposo blanco de diferentes regiones de ratas macho y hembra</i>	41
Figura 22. <i>Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales de ratas macho y hembra</i>	42

Figura 23. <i>Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en los elementos reguladores del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides en el hipotálamo mediobasal de ratas macho y hembra</i>	43
Figura 24. <i>Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides de ratas macho y hembra</i>	44
Figura 25. <i>Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en la expresión de genes que responden a hormonas tiroideas en el tejido adiposo blanco de la región gonadal, músculo esquelético gastrocnemius y tejido adiposo pardo interescapular de ratas macho y hembra</i>	46
Figura 26. <i>Esquema general de los efectos del estrés crónico variable durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides y sus elementos reguladores</i>	47

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Consumo de alimento, ganancia de peso corporal, consumo relativo de alimento y eficiencia de alimento durante el periodo de adolescencia de ratas macho y hembra mantenidas en grupo o en aislamiento social</i>	27
Tabla 2. <i>Consumo de alimento, ganancia de peso corporal, consumo relativo de alimento, eficiencia de alimento y distancia por día durante el periodo de ejercicio de ratas macho y hembra mantenidas en grupo o en aislamiento social</i>	28
Tabla 3. <i>Consumo de alimento, ganancia de peso corporal, consumo relativo de alimento y eficiencia de alimento durante el periodo de adolescencia de ratas macho y hembra control y sometidas a estrés crónico variable</i>	35
Tabla 4. <i>Efecto del estrés crónico variable en la actividad locomotora en jaula evaluada por el sistema de actividad fotoeléctrica de ratas macho y hembra en el DPN 37</i>	35
Tabla 5. <i>Efecto del estrés crónico variable en la prueba de campo abierto en ratas macho y hembra en el DPN 44 y DPN 58</i>	36
Tabla 6. <i>Efecto del estrés crónico variable en la prueba de laberinto elevado de cruz de ratas macho en el DPN 51 y DPN 65 y ratas hembra en el DPN 51</i>	37
Tabla 7. <i>Variables ponderales, peso de las grasas y estado de los ejes HPA y HPT en ratas C y ECV de ratas macho y hembra con alimentación ad libitum, con consumo de alimento pareado al ejercicio y ejercitados después del periodo de ejercicio voluntario</i>	39

Resumen

La actividad del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) es inhibida por situaciones de estrés agudo, estrés crónico y déficit energético. Situaciones de demanda energética como la exposición al frío y el ejercicio voluntario promueven la actividad del eje HPT en ratas adultas, aunque este efecto puede verse atenuado cuando los animales son sometidos a un estrés previo. El estrés durante la etapa neonatal produce una reprogramación en la actividad del eje HPT lo que hace que responda diferente cuando los animales se someten a diferentes retos metabólicos dependiendo del sexo. La adolescencia se considera como una etapa crítica del desarrollo ya que ocurre un remodelamiento neurológico en el sistema límbico que prepara al animal para la etapa adulta, lo que hace vulnerable al estrés a los individuos en esta etapa del desarrollo. Poco se sabe sobre los efectos que tiene el estrés durante la adolescencia de las ratas en la actividad del eje HPT y cómo es que puede llegar a alterar su respuesta ante un reto metabólico como el ejercicio voluntario. En este trabajo se realizaron dos protocolos, en el primero se evaluó el efecto del aislamiento social desde la adolescencia y el ejercicio voluntario alternado en la etapa adulta y en el segundo se evaluó el efecto del estrés crónico variable durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en la etapa adulta. El ejercicio voluntario alternado no produjo la activación del eje HPT en machos, aunque si promovió la expresión de genes regulados a nivel transcripcional por hormonas tiroideas en el tejido adiposo pardo (*Adrb3*, *Dio2* y *Ucp1*), además de que la concentración sérica de T4 correlacionó negativamente con el peso del tejido adiposo blanco visceral. El aislamiento produjo una acumulación del tejido adiposo blanco visceral e inhibió la respuesta al ejercicio en la expresión de *Pomc* en el núcleo arcuato. En hembras no se observaron efectos por parte del ejercicio alternado y el aislamiento social en la respuesta del eje HPT. En el caso del estrés crónico variable, este produjo un efecto inhibitorio en la actividad basal del eje HPT en ambos sexos y se atenuó la expresión de genes que responden a hormonas tiroideas en órganos blanco (*Adrb3*, *Dio2*, *Pgc1a*, *Ucp1* por mencionar algunos) involucrados con el ejercicio principalmente en hembras. Esto sugiere que el estrés crónico durante la adolescencia produce un efecto inhibitorio en la respuesta del eje HPT al ejercicio voluntario de manera diferencial con respecto al sexo.

Introducción

El metabolismo a nivel orgánico está regulado por una serie de hormonas liberadas por sistemas neuroendócrinos y el sistema autónomo. El sistema simpático-adrenal y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA) promueven el gasto energético, a través de la liberación de catecolaminas (norepinefrina y epinefrina) y glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) respectivamente, promoviendo la movilización de las reservas de lípidos y carbohidratos (Rabasa & Dickson, 2016). El eje hipotálamo-pituitaria-tiroideas (HPT) modula la síntesis y liberación de hormonas tiroideas (T4 y T3) que son responsables del 30% del gasto energético basal y la termogénesis facultativa (Fekete & Lechan, 2014; Joseph-Bravo et al., 2015a).

El estrés en etapas sensibles (prenatal, neonatal y adolescencia) afecta el desarrollo y la madurez del cerebro, asociándose a un mayor riesgo de padecer enfermedades mentales que perduran en la etapa adulta. La exposición al estrés durante la etapa prenatal y la etapa neonatal produce una reprogramación en la actividad del eje HPA y afecta el desarrollo del cerebro, lo que desencadena una serie de problemas neuroendócrinos y conductuales (Lupien et al., 2009).

En este estudio exploramos el efecto de diferentes tipos de estrés durante la adolescencia sobre el funcionamiento del eje HPT en condiciones basales y ante una demanda energética como es el ejercicio voluntario.

Marco teórico y Antecedentes

El estrés y sus efectos en el organismo

El estrés es una perturbación de la homeostasis de un organismo ocasionado por diversas situaciones que alteran dicho equilibrio conocidas como estresores (Selye, 1967). Los estresores se han clasificado como físicos y psicológicos; los físicos son amenazas reales que comprometen a la homeostasis del organismo de manera fisiológica los como cambios bruscos de temperatura, las hemorragias o el dolor y son reconocidos por las vías somáticas, viscerales o sensoriales del cerebro. Los estresores psicológicos son amenazas que no atentan contra la vida del organismo, pero pueden inducir algún daño fisiológico, como el miedo o la angustia, los cuales involucran la historia del organismo; este tipo de estresores son

procesados por el sistema límbico involucrando la participación del hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (Engelmann et al., 2004).

Cuando el organismo es sometido a un tipo de estresor, se desencadena una respuesta adaptativa inmediata que activa de manera simultánea el Locus Coeruleus (LC), el sistema nervioso simpático (SNS) y el eje HPA (Figura 1). El LC libera norepinefrina actuando en las sinapsis de las regiones corticales del cerebro, incrementando la atención y produciendo un estado de alerta (Kvetnansky et al., 2013). Debido a que en estas situaciones se requiere de una gran cantidad de energía para contender con el desequilibrio, la activación del SNS y el eje HPA favorece la movilización de las reservas energéticas (Rabasa & Dickson, 2016). Adicionalmente, los glucocorticoides regulan la plasticidad sináptica en el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal media favoreciendo el aprendizaje y la adaptación al estrés (Peters et al., 2017).

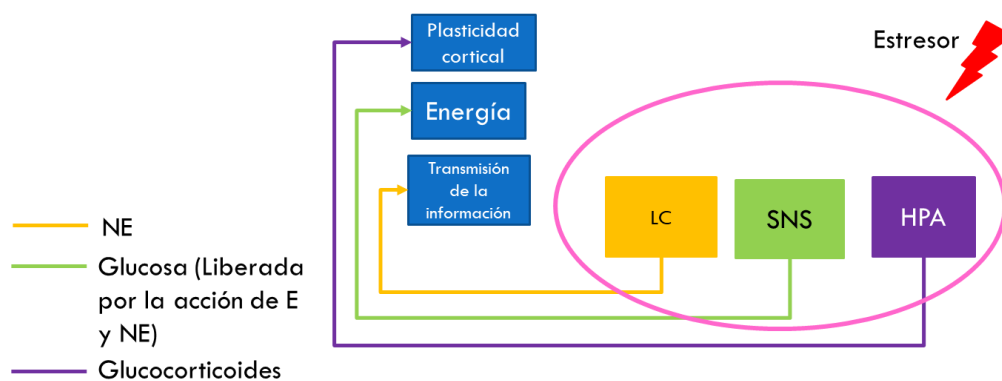


Figura 1. *Respuesta del organismo a un estresor* (Modificado de Peters et al., 2017). Cuando el organismo es sometido a algún estresor, se procesa esta información en diferentes regiones del sistema nervioso (vías somáticas, sensoriales o circunventriculares en caso de que sea un estresor físico; sistema límbico en caso de ser un estresor psicológico) convergiendo en la activación simultánea del Locus Coeruleus (LC), el sistema simpático adrenal (SNS) y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) (Peters et al., 2017).

La actividad del eje HPA se encuentra regulada por el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) donde se encuentran neuronas que producen a la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP). Las neuronas que sintetizan CRH o AVP son activadas, según el tipo de estrés, por neuronas del tallo cerebral y de otras regiones del sistema nervioso central causando la liberación de estos péptidos en la eminencia media (EM) de donde son transportados a los corticotropos de la pituitaria, induciendo la síntesis y

liberación de la hormona adrenocorticotrófica o corticotropina (ACTH) a la circulación. En las glándulas adrenales (o suprarrenales) la ACTH induce la síntesis y liberación de los glucocorticoides. Como todos los ejes neuroendócrinos, las hormonas del órgano periférico, como los glucocorticoides, ejercen una retroalimentación negativa del eje HPA inhibiendo directamente la síntesis de CRH en el PVN o a través de otras regiones del sistema nervioso la corteza prefrontal o el hipocampo, así como también inhiben la síntesis y liberación de ACTH en la pituitaria (Figura 2) (Engelmann et al., 2004; Herman et al., 2012).

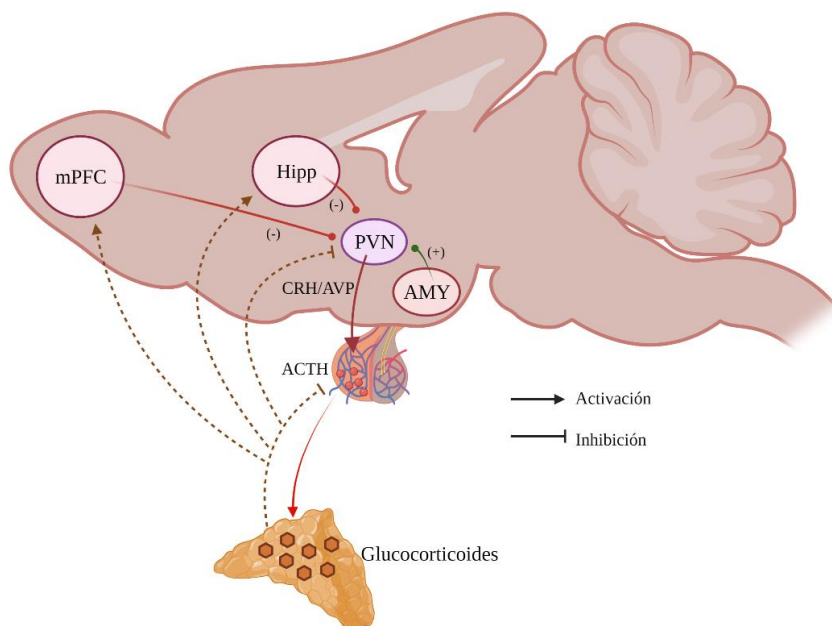


Figura 2. Esquema general del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (Basado en Romeo, 2010). El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) recibe señales excitatorias de la amígdala (AMY) mediante el lecho nuclear de la estría terminalis (BNST), estas señales promueven la síntesis de los péptidos CRH y AVP que inducen la síntesis y liberación de ACTH en la pituitaria anterior. Esta hormona estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides en las glándulas adrenales. Los glucocorticoides que actúan sobre los diferentes órganos blanco, además ejercen una retroalimentación negativa del eje a nivel de la pituitaria y el hipotálamo. Dentro de esta retroalimentación negativa, se pueden involucrar otras regiones del sistema nervioso central como el hipocampo (Hipp) y la corteza prefrontal media (mPFC) (Romeo, 2010).

El organismo puede adaptarse al estrés mediante respuestas concertadas los sistemas autónomo, neuroendócrino (HPA) e inmune, junto con los procesos metabólicos que ocurren en todos los órganos; este fenómeno se ha denominado alostásis (McEwen, 2017). Una activación constante de estos mediadores, conocida como carga alostática, ocasiona efectos patofisiológicos que causan problemas metabólicos. El estrés crónico produce un

incremento de la concentración local de glucocorticoides en el tejido adiposo blanco debido a un incremento en la actividad de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (HSD1), enzima que regenera la forma activa de los glucocorticoides; un aumento en la presencia de glucocorticoides activos en este tejido promueve la hipertrofia de los adipocitos, disminuye la sensibilidad a la insulina y altera el metabolismo de lípidos promoviendo su acumulación (Lee et al., 2014), estos efectos ocasionan un aumento en la necrosis de los adipocitos, reclutando a células inmunitarias proinflamatorias, produciendo una inflamación crónica relacionada con la obesidad (Maury & Brichard, 2010).

Generalidades del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides

La regulación del eje HPT inicia en las neuronas hipofisiotrópicas productoras de TRH que en ratas se encuentran en la zona media y posterior del PVN (Fekete & Lechan, 2014). La actividad de las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del PVN está regulada por hormonas provenientes de la circulación general (leptina, glucocorticoides), por estímulos neuronales provenientes del tallo cerebral y por neuronas de otros núcleos hipotalámicos, como el núcleo arcuato (Arc), o indirectamente de regiones corticolímbicas (Joseph-Bravo et al., 2015b; Radley & Sawchenko, 2015). El Arc se encuentra en la región basal del hipotálamo, recibe señales periféricas relacionadas con el estado metabólico del organismo que activan o inhiben neuronas productoras de péptidos orexigénicos (NPY y AgRP) o péptidos anorexigénicos (POMC y CART) (Schneeberger et al., 2014). Los péptidos anorexigénicos estimulan la síntesis de *Trh* mientras que los orexigénicos la inhiben (Fekete & Lechan, 2014). La hormona α estimuladora de melanocitos (α -MSH), es un péptido derivado del POMC que interacciona con el receptor de melanocortina tipo 4 (MC4R) de las neuronas TRHérgicas del PVN induciendo la activación de la fosfocinasa A (PKA) que fosforila a CREB y su unión a su elemento de respuesta en el promotor de *Trh* (Harris et al., 2001; Díaz-Gallardo et al., 2010; Lowry, 2016). Caso contrario, el NPY y el AgRP producen efectos opuestos; el NPY a través de la interacción con sus receptores Y1 y Y5 (Fekete et al., 2002) y el AgRP que es un “antagonista inverso” el cual antagoniza la activación de MC4R por α -MSH (Kleinau et al., 2020). La leptina puede actuar directamente en las neuronas del PVN, o a través de la activación de las neuronas de POMC del Arc (Nillni, 2010). La leptina, mediante su interacción con el receptor LepRb, propicia la fosforilación de JAK2, cinasa que fosforila al

factor transcripcional STAT3 el cual induce la transcripción de *Trh* (Hollenberg, 2008; Díaz-Gallardo et al., 2010). La norepinefrina liberada de neuronas del tallo cerebral, posiblemente del LC (Palkovits et al., 1999), activa a la PKA y la fosforilación de CREB, induciendo así la transcripción de *Trh* (Díaz-Gallardo et al., 2010).

La síntesis del precursor de TRH se realiza en el soma de las neuronas hipofisiotrópicas del PVN, empaquetado en gránulos de secreción, donde se procesa a TRH y viaja hasta localizarse en las terminales nerviosas de la EM, donde se localizan también los tanicitos en las paredes del tercer ventrículo y los capilares del sistema portahipofisiario. En los tanicitos se encuentra la desiodasa 2 (Dio2), que transforma T4 a T3, y la ectoenzima degradadora de TRH (TRH-DE) o piroglutamil peptidasa II, que puede inactivar al TRH liberado al hidrolizar el enlace pGlu-His (Rodríguez-Rodríguez et al., 2019). En respuesta a un estímulo neuronal, el TRH se libera en la EM y puede ser degradado por la TRH-DE o entrar a la circulación portahipofisiaria hasta la pituitaria anterior (AP), donde interactúa con el receptor TRH-R1 en los tirótrofos e induce la síntesis y liberación de la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) o tirotropina (Sekulić, 2003). La TSH es una glucoproteína conformada por dos subunidades, la TSH β es exclusiva de la TSH, mientras que la TSH α es común para la hormona luteinizante y la hormona estimuladora de folículos (Shupnik et al., 1989). La TSH liberada en la circulación general interacciona con su receptor en las células foliculares de la glándula tiroides, estimulando la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas T4 y T3 (Zoeller, 2007). Sólo un 30% del total circulante de T3 es liberado de la tiroides, el resto es producido por la actividad de las desiodasas (Dio) que se encuentran en diferentes órganos y tejidos donde están reguladas (Fekete & Lechan, 2014). Se conocen tres tipos de Dio, la Dio1 se encuentra principalmente en la tiroides, el hígado y los riñones, esta enzima regula los niveles circulantes de T4 y T3 a partir de la conversión de T4 a T3 y a T3 reversa (rT3), esta última es una forma inactiva de la T3 (Larsen & Zavacki, 2012). La Dio2 se encuentra en la pituitaria, la eminencia media, el corazón, el hígado, los riñones, músculo esquelético, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo donde produce T3 a partir de T4 (Mullur et al., 2014). La Dio3 inactiva a T3 convirtiéndola en rT3 y es importante para mantener los niveles fisiológicos de T3 (Ciavardelli et al., 2014). La T3 es la hormona responsable de la retroalimentación negativa del eje HPT, a nivel de la pituitaria inhiben la expresión de TRH-R1 (Sekulić, 2003) y de las subunidades de TSH, mientras que, a nivel hipotalámico, la T3

actúa directamente en las neuronas TRHérgicas del PVN. T3 es la forma activa a nivel transcripcional uniéndose a sus receptores THR α o β . Los efectos de retroalimentación inhibitorios de T3 se llevan a cabo mediante la unión al receptor THR β que forma homodímeros o heterodímeros con el receptor de retinol X, la unión de estos factores en el sitio THRE del promotor induce la transcripción de genes en ausencia de T3, pero se inhibe con su presencia (Hollenberg et al., 1995). Aunque el mecanismo por el cual ocurre la inhibición de la transcripción no está bien dilucidado aún (Joseph-Bravo et al., 2021).

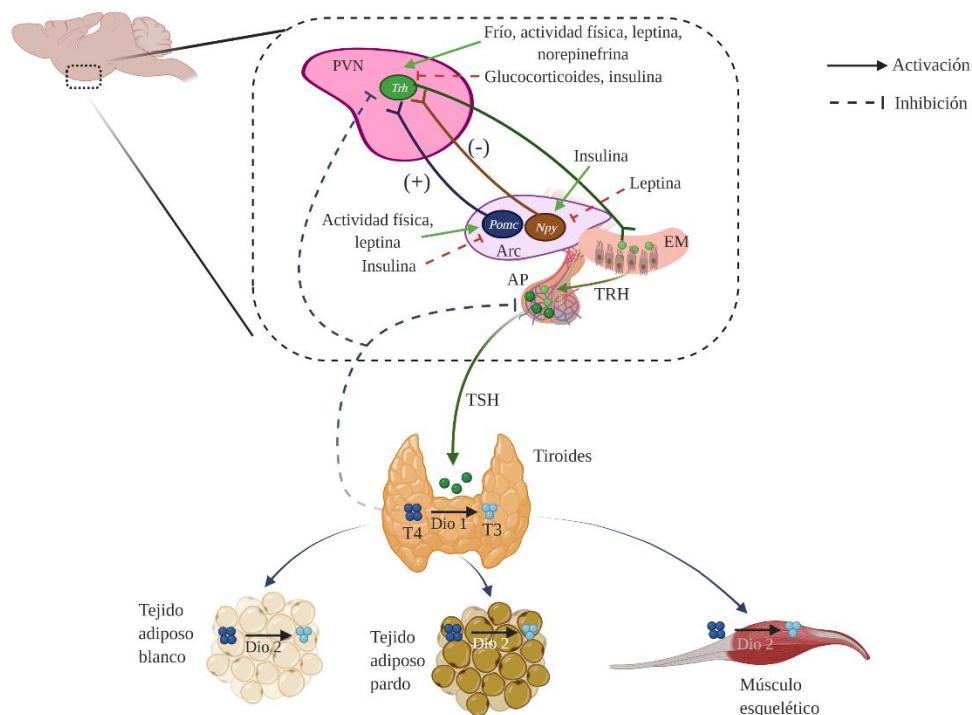


Figura 3. Esquema general del eje hipotálamo-pituitaria tiroides, algunos puntos de regulación y órganos blanco (Basado y modificado de Parra-Montes de Oca et al., 2019). El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) recibe señales periféricas o centrales (como las neuronas de POMC o NPY del núcleo arcuato [Arc]) las cuales regulan la actividad de las neuronas TRHérgicas hipofisiotróficas; estas neuronas liberan el péptido TRH en la eminencia media (EM) y, a través del sistema portahipofisario, este péptido llega a la pituitaria anterior (AP) donde interacciona con su receptor para inducir la síntesis y liberación de tirotrópina (TSH). Esta hormona viaja por la circulación general hasta la glándula tiroides donde promueve la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). Estas hormonas llegan a sus órganos blanco regulando donde ejercen diferentes funciones, además de que también ejercen un mecanismo de retroalimentación negativa del eje a nivel de la pituitaria y el hipotálamo.

La actividad del eje HPT se encuentra modulada por la situación energética del organismo. La restricción de alimento y el ayuno disminuyen la expresión de *Trh* en PVN y los niveles

de las hormonas TSH, T4 y T3 (Rondeel et al., 1992; van Haasteren et al., 1996; Jaimes-Hoy et al., 2016; Joseph-Bravo et al., 2020); estos efectos se atribuyen principalmente a los cambios circulantes de leptina cuya disminución induce un aumento en la expresión de *Npy*, así como una disminución en la expresión de *Pomc* en el hipotálamo medio basal (que incluye al Arc y la EM) (Brady et al., 1990; Jaimes-Hoy et al., 2016). El efecto de la leptina puede ser también directo sobre el PVN al estimular, vía STAT3, la síntesis de *Trh* en situaciones de exceso de energía como el consumo de dieta alta en grasa (Perello et al., 2010).

El ejercicio y sus efectos en la actividad del eje HPT

La actividad física o el ejercicio activan al eje HPT. El ejercicio se puede definir como a cualquier actividad física estructurada y repetitiva (Caspersen et al., 1985; Dishman et al., 2006). Las hormonas tiroideas participan en respuestas rápidas a nivel membranaral o transcripcional que regulan la activación de la lipólisis en el tejido adiposo blanco, la termogénesis en el tejido adiposo pardo, el aumento del gasto energético en el músculo esquelético y la estimulación en la contracción del miocardio (Mullur et al., 2014; Little, 2016). Sin embargo, debido a que la respuesta del eje es transitoria, los tiempos de toma de muestra son determinantes. Dependiendo del tipo de ejercicio se puede detectar activación o inhibición del eje HPT; el ejercicio forzado o de alta intensidad disminuye los niveles de hormonas tiroideas (Brabant et al., 2005; Mastorakos & Pavlatou, 2005; Fortunato et al., 2008) probablemente por provocar un estado energético negativo (Chatzitomaridis et al., 2017), mientras que el ejercicio de baja intensidad o el ejercicio voluntario hacen que aumente la expresión de *Trh* en PVN (Gutiérrez-Mariscal et al., 2012; Uribe et al., 2014). El ejercicio, a través de la estimulación noradrenérgica y las hormonas tiroideas, promueve la lipólisis en el tejido adiposo blanco lo que facilita la movilización de las reservas energéticas (Ogasawara et al., 2015); en roedores, el receptor adrenérgico β_3 ($Ad\beta_3$) modula la actividad de las catecolaminas que libera sistema simpático desencadenando una serie de reacciones que favorecen la activación de enzimas que inducen la lipólisis (Hackney & Viru, 2016), así mismo, se induce la expresión y actividad de Dio2 en los adipocitos (Liu et al., 2003) aumentando la concentración interna de T3 en los adipocitos, además de que se ha reportado que T3 promueve la expresión de *Adrb3* en este tejido (Mullur et al., 2014). PPAR γ es un factor de transcripción que regula el metabolismo de lípidos y carbohidratos, la función

principal que se le ha atribuido en este tejido es la de promover la diferenciación de los preadipocitos (adipogénesis) además de la síntesis *de novo* de los ácidos grasos (lipogénesis), aunque también favorece la sensibilidad a la insulina en este tejido (Janani & Kumari, 2015). La contracción muscular también contribuye al gasto energético, esto puede inducir a que aquellos músculos que utilizan mayoritariamente glucógeno y que tienen poca cantidad de mioglobina y mitocondrias, se aumente su capacidad oxidativa a través de un aumento en la biosíntesis de mitocondrias (Baar, 2014). Las hormonas tiroideas ejercen diferentes respuestas fisiológicas en el músculo esquelético, por lo que este tejido es considerado como un tejido blanco de estas (Mullur et al., 2014). El tipo de ejercicio define que tipo de músculo esquelético es el que tiene mayor participación, el ejercicio aeróbico (consumo de oxígeno menor a 65%) favorece el uso de músculos con alta capacidad oxidativa, es decir, aquellos que tienen una mayor cantidad de fibras musculares tipo I (contracción lenta) y una alta cantidad de mioglobina y mitocondrias, favoreciendo la oxidación completa de los carbohidratos y el uso de lípidos como sustrato energético, sin embargo, este tipo de músculos tiene una baja resistencia a la fatiga. El ejercicio anaeróbico (consumo de oxígeno mayor al 65% y concentración de lactato en sangre superior a 2mM; Spurway, 1992) favorece el uso de músculos con abaja capacidad oxidativa, este tipo de músculos tienen una mayor cantidad de fibras musculares de tipo II (contracción rápida) y una baja cantidad de mioglobina y mitocondrias, por lo que utiliza mayoritariamente a los carbohidratos como sustrato energético produciendo principalmente lactato, lo que contribuye a una alta resistencia a la fatiga (Burton et al., 2004). El tejido adiposo pardo es un tejido blanco de hormonas tiroideas que en conjunto con el sistema nervioso simpático es responsable de la termogénesis facultativa, la cual contribuye al gasto energético (Mullur et al., 2014; Sánchez-Delgado et al., 2015). Las señales noradrenérgicas estimulan la expresión de *Dio2* en el tejido adiposo pardo, incrementando la concentración de T3 dentro del mismo (Arrojo E Drigo et al., 2013); este aumento de T3 promueve la transcripción del *Adrβ3* y de *UCP-1* (Mullur et al., 2014).

Respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides al estrés y retos metabólicos en ratas

El estrés inhibe la actividad basal del eje HPT (Joseph-Bravo et al., 2015a). El aumento de glucocorticoides en sangre puede producir un aumento en la expresión de péptidos

oréxigénicos a nivel del ARC (revisado en Maniam & Morris, 2012) que pudieran participar en la inhibición de la actividad de las neuronas TRHérgicas. El estrés agudo disminuye la expresión de *Trh* en PVN y *Tshb* en la AP, así como en los niveles séricos de TSH y T3 (revisado en Joseph-Bravo et al., 2015a). El estrés crónico también produce efectos inhibitorios en la actividad del eje HPT, a distintos niveles, que dependen del tipo y duración del estrés (Kilburn-Watt et al., 2010; Helmreich & Tylee, 2011; Uribe et al., 2014). Parte de los efectos se le atribuyen al aumento de la concentración sérica de glucocorticoides ya que hay una correlación negativa entre esta y la expresión de *Trh* en PVN (Uribe et al., 2014; Joseph-Bravo et al., 2015a).

Someter a los animales a un estrés antes de realizar un reto metabólico que induciría la activación del eje HPT puede inhibir dicha respuesta. Un estrés agudo como la restricción de movimiento, así como la inyección de corticosterona 1 hora previa a la exposición al frío, inhibe la expresión de *Trh* en PVN (Uribe et al., 2011; Sotelo-Rivera et al., 2014). Estudios *in vitro* han demostrado que incubación simultánea de glucocorticoides y de activadores de PKA inhiben la traslocación al núcleo de la subunidad catalítica de la PKA y del receptor de glucocorticoides (GR), la fosforilación de CREB, la unión de pCREB y GR al promotor de *Trh*. Este mecanismo involucra una interacción proteína-proteína de la PKA catalítica con el GR activado (Sotelo-Rivera et al., 2017). A diferencia de la respuesta del eje HPA al estrés crónico homotípico (como la restricción de movimiento intermitente) o heterotípico (como el estrés crónico variable) que inducen, respectivamente, habituación o hiperactividad del eje HPA (Radley & Sawchenko, 2015), ambos inhiben la expresión de *Trh* al frío y respuesta del tejido adiposo pardo a las hormonas tiroideas (Castillo-Campos et al., 2021). El estrés crónico homotípico, previo a un periodo de ejercicio voluntario, inhibe la respuesta del eje HPT y disminuye la actividad física principalmente en ratas macho (Parra-Montes de Oca et al., 2019).

Estrés durante la adolescencia

El estrés en etapas sensibles (prenatal, neonatal y adolescencia) afecta el desarrollo y la madurez del cerebro, asociándose a un mayor riesgo de padecer enfermedades mentales que perduran en la etapa adulta. La exposición al estrés durante la etapa prenatal y la etapa neonatal produce una reprogramación en la actividad del eje HPA y afecta el desarrollo del

cerebro, lo que desencadena una serie de problemas neuroendócrinos y conductuales (Lupien et al., 2009).

La adolescencia es considerada como una etapa de mayor vulnerabilidad al estrés y una etapa crítica que puede interferir con la adecuada programación neuroendócrina; esta etapa se define como el periodo donde se pasa de la niñez a la adultez. Durante esta transición, los individuos experimentan una variedad de cambios en el cual se incluye la pubertad, que es el periodo donde se alcanza la madurez sexual, así como la adquisición de habilidades que le permiten la supervivencia para la etapa adulta, como la interacción social con sus similares y el aumento en las conductas de toma de riesgos y búsqueda de aspectos novedosos (Spear, 2000). El periodo de la adolescencia aún no está bien definido ya que no ocurre un solo evento que indique inicio o término, sino que engloba diferentes aspectos fisiológicos y conductuales que ocurren durante esta transición. Definir los límites de la adolescencia en animales de laboratorio ha sido controversial. Se postula que la adolescencia en ratas comienza después del destete (entre los días postnatales [DPN] 21-23) y acaba a distintos tiempos dependiendo del sexo (las hembras se desarrollan antes que los machos), los cambios conductuales (aumento en la exploración e interacción por pares) y el aumento en la tasa de crecimiento (alcanzando su pico máximo entre las 4 y 5 semanas de edad). Teniendo estos factores en cuenta, el periodo de adolescencia en las ratas hembra ocurre alrededor del DPN 22 y el DPN 60; mientras que en los machos podría ocurrir entre el DPN 28 y el DPN 70 (Figura 4) (Schneider, 2013).

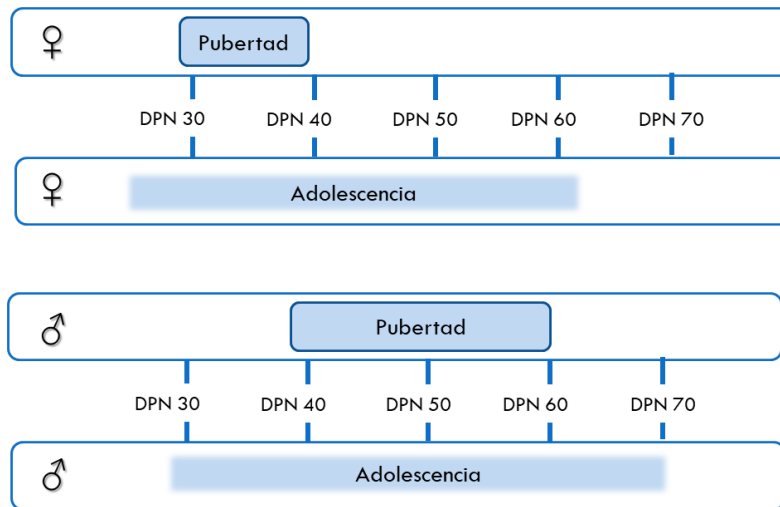


Figura 4. Periodo de pubertad y periodo estimado de adolescencia en ratas hembra y macho (Modificado de Schneider, 2013). El periodo de adolescencia en ratas aún no está bien definido, se estima que en las hembras comienza entre los días postnatales (DPN) 21 y 22, mientras que en los machos ocurre entre los DPN 28 y 30; así mismo, las hembras llegan a la edad adulta alrededor del DPN 60 y en los machos por el DPN 70. El periodo de pubertad en las hembras se considera entre el DPN 30 y el DPN 40 y en los machos es considerado entre el DPN 40 y el DPN 60.

Durante la pubertad, y en el transcurso de la adolescencia, ocurre un incremento en la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas, aumentando la concentración de los esteroides sexuales las cuales inducen cambios fisiológicos que llevan a la madurez sexual del individuo. Si bien al término de la pubertad los animales son capaces de reproducirse, la adolescencia comprende además cambios neurológicos que involucran un remodelamiento en los circuitos neuronales diferentes regiones del sistema límbico conectando la corteza prefrontal media (mPFC) con la amígdala y el hipocampo (Juraska et al., 2013; Juraska & Willing, 2017). La mPFC está asociada con la regulación de las funciones ejecutivas y los comportamientos de motivación, durante la adolescencia hay una disminución del volumen de la mPFC ocasionado por una poda sináptica, aunque también aumenta la materia blanca por la mielinización (Crews et al., 2007). La amígdala se relaciona con el control del aprendizaje emocional, en el transcurso de la adolescencia ocurre un efecto de U invertida en las conexiones que hay entre la amígdala y la mPFC, además de que sólo en los machos hay un aumento del volumen (Juraska et al., 2013). El volumen del hipocampo también aumenta durante la adolescencia, siendo mayor en machos que en hembras (Sumiyoshi et al., 2017). Los cambios estructurales de las estructuras límbicas hacen que la adolescencia sea

considerada como una etapa de mayor vulnerabilidad a situaciones de estrés que pueden producir repercusiones en la etapa adulta (Figura 5) (Casey et al., 2010).

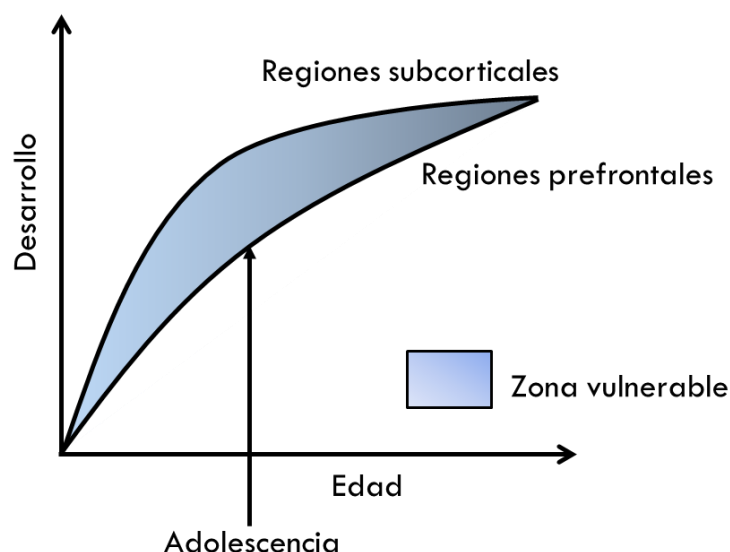


Figura 5. Representación gráfica desarrollo neurológico de las regiones subcorticales y prefrontales con respecto a la edad (Modificado de Casey et al., 2010). La región sombreada representa la vulnerabilidad al estrés que es considerada durante las etapas del desarrollo. Este desarrollo modifica el comportamiento del individuo y lo prepara para la etapa adulta; sin embargo, el desarrollo de estas regiones subcorticales y prefrontales no ocurren de manera simultánea, ocasionando el comportamiento impulsivo característico de esta etapa.

La modulación de la actividad del eje HPA termina de madurarse durante la adolescencia debido a la formación de circuitos entre las diferentes regiones del sistema límbico (McCormick & Mathews, 2010). La amígdala (específicamente la región central y la basolateral) y la región infralímbica de la mPFC promueven la activación del eje HPA, mientras que el hipocampo (la región subículo-ventral) y la región prelímbica de la mPFC inhiben su actividad, estas regiones no tienen conexiones directas con el PVN, por lo que las neuronas de estas regiones se conectan con el lecho nuclear de la estría terminal (BNST) y este proyecta las señales excitatorias o inhibitorias al PVN (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Debido durante la adolescencia se están estableciendo las conexiones en el sistema límbico, se ha descrito que los roedores adolescentes tienen una mayor respuesta al estrés agudo y tardan más tiempo en regresar a su estado basal en comparación con roedores adultos (Romeo, 2013; Romeo et al., 2016). El estrés crónico durante la adolescencia aumenta la concentración sérica de glucocorticoides en sangre provocando que las conexiones previstas

no se realicen de manera adecuada (Romeo, 2017). Las neuronas de la amígdala basolateral presentan un incremento en la complejidad dendrítica, pero hay disminución en la densidad de espinas dendríticas y de espinofilina (marcador de espinas dendríticas) lo que se asocia a un comportamiento ansioso (Leussis & Andersen, 2008; Eiland et al., 2012; Padival et al., 2015). El estrés crónico disminuye la longitud dendrítica de neuronas de la región CA3 del hipocampo (Eiland et al., 2012) y retrasa el aumento de su volumen (Isgor et al., 2004); atribuyéndole problemas en las habilidades de memoria y aprendizaje, así como una mayor reactividad emocional (McCormick & Mathews, 2010). La densidad dendrítica de las neuronas de la mPFC y la expresión de proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica como la espinofilina y la sinaptofisina disminuyen por efecto del estrés (Leussis & Anderson, 2008; Eiland et al., 2012), disminuyendo la regulación de las funciones ejecutivas (Liston et al., 2006).

Respuesta del eje HPT en la edad adulta en animales sometidos a estrés durante el desarrollo

La gestación, la etapa neonatal y la adolescencia son etapas cruciales que pueden alterar el funcionamiento del eje HPT. La exposición a glucocorticoides sintéticos como la dexametasona en los últimos días de gestación disminuye la expresión de *Trh* hipotalámico y la temperatura corporal de las crías hembras en la edad adulta (Carbone et al., 2012). El estrés en la etapa neonatal (modelo de separación materna) disminuye la concentración sérica de TSH en ambos sexos, pero aumenta la expresión de *Trh* en PVN de hembras y de *Trhde* en MBH de machos (Jaimes-Hoy et al., 2016). Los cambios en la expresión de *Trh* están asociados a modificaciones epigenéticas en el promotor de *Trh* de las neuronas hipofisiotrópicas y en el promotor de *Pomc* de neuronas del núcleo arcuato (Jaimes-Hoy et al., 2021). La separación materna no sólo afecta la actividad basal del eje HPT, también altera la respuesta del eje a situaciones energéticas como el ayuno, el consumo de dietas híper calóricas, su reacción al estrés agudo, la exposición al frío y el ejercicio voluntario de manera dependiente del sexo (Jaimes-Hoy et al., 2016, 2019, 2021).

Poco se sabe sobre los efectos del estrés durante la adolescencia en la actividad del eje HPT y su respuesta a retos metabólicos. En la presente tesis se estudiaron los efectos del estrés durante la adolescencia sobre la actividad del eje HPT y de sus elementos regulatorios después de un periodo de exposición al ejercicio voluntario.

Justificación

La obesidad ha tenido un incremento alarmante lo que justifica intentar dilucidar los mecanismos que contribuyen a esto y poder proponer estrategias de intervención. La demostración que el estrés en ratas adultas inhibe la actividad basal del HPT, así como su activación ante un reto metabólico como la exposición al frío o el ejercicio voluntario, y que durante las etapas pre y neonatal de roedores (consideradas como etapas vulnerables al estrés por sus cambios neuroplásticos), situaciones de estrés crónico ocasionan una reprogramación en la actividad del eje HPT y su respuesta a retos metabólicos en la etapa adulta constituyen bases importantes para proponer que el efecto del estrés crónico durante la adolescencia puede afectar la respuesta del eje HPT a retos metabólicos. La adolescencia es una etapa vulnerable al estrés debido a que prepara al individuo para su vida adulta a través de modificaciones neurológicas y neuroendócrinas. El estrés crónico durante la adolescencia en roedores produce alteraciones en el adecuado desarrollo de los individuos, lo que pudiera modificar la regulación del balance energético. El animal que fue estresado durante la adolescencia presenta hiper reactividad del eje HPA ante estresores durante la adultez, aunque se desconocen los posibles efectos sobre la actividad del eje HPT en la etapa adulta y su respuesta a un reto de demanda energética como es el ejercicio voluntario.

Hipótesis

El efecto deletéreo del estrés durante la adolescencia en ratas adultas produce una inhibición en la respuesta del eje tiroideo a nivel basal y ante el ejercicio voluntario.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la respuesta del eje HPT al ejercicio voluntario en ratas adultas que fueron sometidas a dos tipos de estrés crónico durante la adolescencia.

Objetivos particulares:

1. Caracterizar la respuesta del eje HPT al ejercicio voluntario alternado en ratas adultas que estuvieron en aislamiento social desde la adolescencia, a través de la evaluación de los siguientes parámetros:
 - Peso de dos regiones del tejido adiposo blanco visceral (gonadal y retroperitoneal) y una región subcutánea (interescapular).
 - Expresión de genes *Pomc*, *Npy*, *Dio2* y *Trhde* en el hipotálamo mediobasal.
 - Expresión de *Trh* en PVN y concentración sérica de TSH, T4 y T3.
 - Expresión de genes *Adrb3*, *Dio2* y *Ucp1* en el tejido adiposo pardo interescapular.
2. Caracterizar la respuesta del eje HPT al ejercicio voluntario diario en ratas adultas expuestas a estrés crónico variable durante la adolescencia a través de la evaluación de los siguientes parámetros:
 - Peso de dos regiones del tejido adiposo blanco visceral (gonadal y retroperitoneal) y una región subcutánea (interescapular).
 - Expresión de genes *Pomc*, *Npy*, *Dio2* y *Trhde* en el hipotálamo mediobasal.
 - Expresión de *Trh* en PVN y concentración sérica de TSH, T4 y T3.
 - Expresión de genes *Adrb3*, *Dio2*, *Pparg* y *Hsl* en tejido adiposo blanco gonadal.
 - Expresión de genes *Dio2* y *Pgc1a* en músculo esquelético gastrocnemius.
 - Expresión de genes *Adrb3*, *Dio2* y *Ucp1* en el tejido adiposo pardo interescapular.

Materiales y Métodos

Animales

Ratas Wistar provenientes de la colonia del Bioterio del IBt, descendientes de ratas Wistar de Charles River (Wilmington, MA, EE UU). A la edad de 21 días las crías se destetaron, se colocaron 3 animales/jaula y se albergaron en cuartos separados de acuerdo al sexo y grupo experimental. Las ratas son mantenidas en condiciones de temperatura controlada ($21\pm 1^\circ\text{C}$) y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (7:00 h a 19:00), con alimento (Teklad 2018SX, Envigo, USA) y agua *ad libitum*; las botellas utilizadas para el agua fueron de vidrio para evitar contaminación por químicos perturbadores endócrinos (Palanza et al, 2021). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de ética del Instituto de Biotecnología (aprobación No. 273 y 318).

Protocolo 1: Estrés crónico por aislamiento social y ejercicio voluntario alternado

Ratas macho (N=32) o hembra (N=32) de 30 días de edad fueron separadas en dos grupos experimentales: uno de aislamiento social (Iso) (n=16) que consistió en albergar cada rata por caja teniendo contacto visual, auditivo y olfatorio con otras ratas; y un grupo control (C) (n=16) con dos ratas por caja (Fone & Porkess, 2008). A los 63-64 días de edad, los grupos C e Iso fueron subdivididos para formar un grupo ejercitado (Ex) (n=8) y un grupo sedentario al que se le ofrecía la misma cantidad de alimento que consumía el grupo ejercitado el día anterior (alimentación pareada, PF) (n=8). Debido a tener un número limitado de cajas de ejercicio, cada rata la utilizó de manera alternada por 16 días ya que según lo publicado los efectos son similares al ejercicio diario (Mueller et al., 1997); cada rata realizó un total de 10 días de ejercicio (Anexo 1). El protocolo de ejercicio voluntario consistió en colocar cada rata en una caja con una rueda de ejercicio de 25 cm de diámetro con un contador digital (AccuScan Instruments Inc), agua y alimento *ad libitum* entre las 19:00 hrs. y las 7:00 hrs. del día siguiente, las ratas se pasaron de la caja de ejercicio a su respectiva caja, ya sea individuales para el grupo Iso o con su respectiva pareja para el grupo control (Uribe et al., 2014).

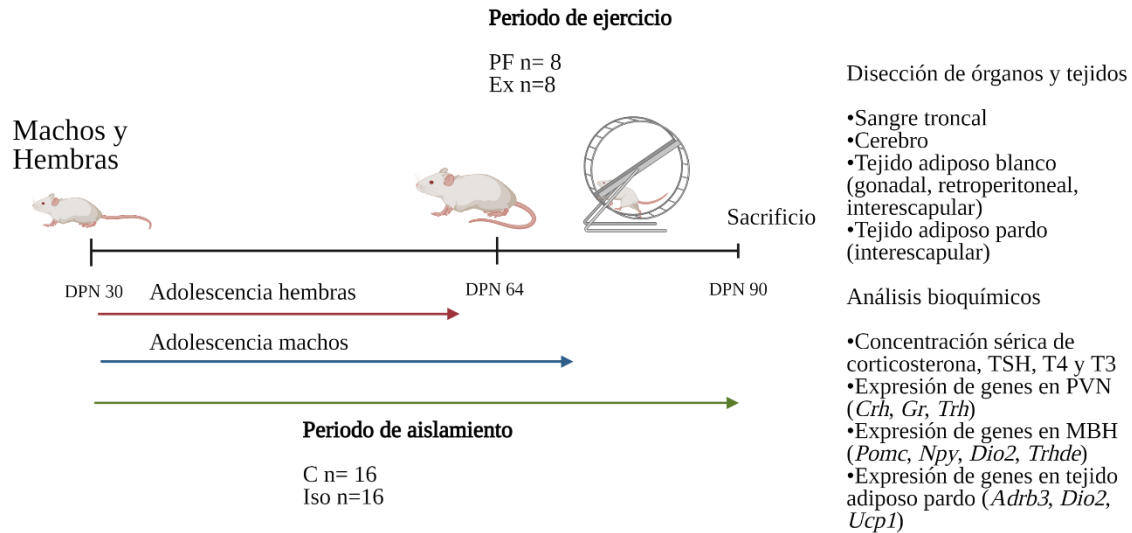
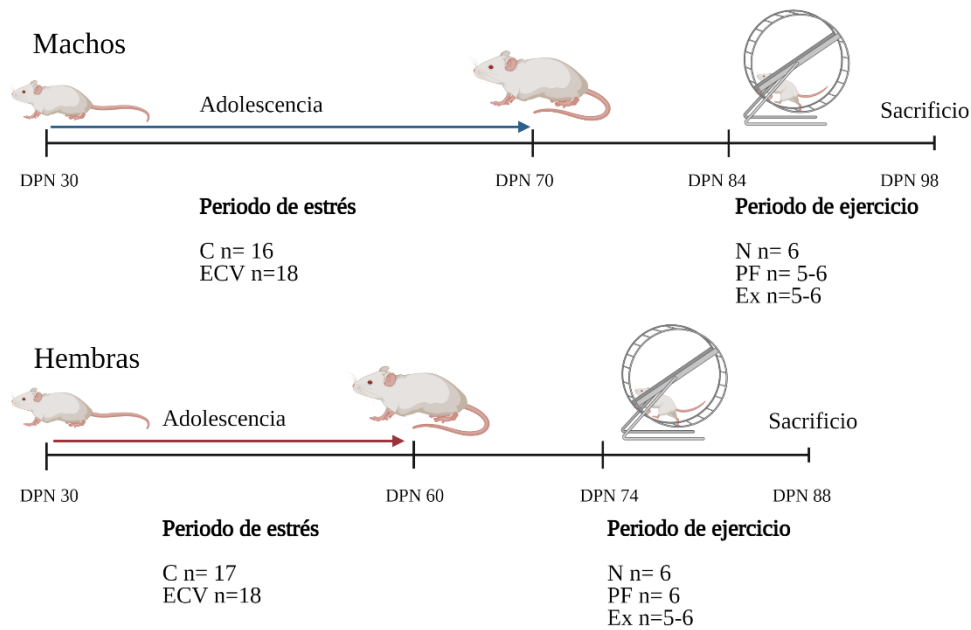


Figura 6. Diagrama experimental para el protocolo de aislamiento social y ejercicio voluntario alternado. DPN: día post natal; C: grupo control; Iso: grupo mantenido en aislamiento social; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario alternado.

Protocolo 2: Estrés crónico variable durante la adolescencia y ejercicio voluntario diario

Se realizaron dos experimentos independientes utilizando el siguiente diseño experimental. Ratas macho (N=35-36) y hembra (N=35-36) de la cepa Wistar de 30 días de edad, se dividieron en 2 grupos. Un grupo de estrés crónico variable (ECV) durante la adolescencia (n=18) (machos: del día postnatal [DPN] 30 al 70; hembras: del DPN 30 al 60) y un grupo control (C) (n=17-18) sin manipulación (excepto por cambio de caja o registro de peso); en ambos grupos los animales se mantuvieron 2 ratas por caja. El protocolo de ECV se realizó según lo publicado por Toth et al., 2008 con modificaciones; las ratas fueron sometidas a un estresor distinto cada día como se describe en el Anexo 1. Alcanzada la edad adulta (machos: DPN 70; hembras: DPN 60), todas las ratas estuvieron 2 semanas sólo con la manipulación necesaria para la limpieza de las cajas 2 veces por semana. Posterior a este periodo, ambos grupos fueron divididos en otros tres grupos: un grupo sedentario con alimento *ad libitum* (N) (n=6), un grupo ejercitado por 14 días (Ex) (n=5-6) y un grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio (PF) (n=6). El protocolo de ejercicio fue el mismo que en el experimento anterior.



Disección de órganos y tejidos

- Sangre troncal
- Cerebro
- Tejido adiposo blanco (gonadal, retroperitoneal, interescapular)
- Músculo esquelético (gastromemius)
- Tejido adiposo pardo (interescapular)

Análisis bioquímicos

- Concentración sérica de corticosterona, TSH, T4 y T3
- Expresión de genes en PVN (*Crh, Avp, Gr, Trh*)
- Expresión de genes en MBH (*Pomc, Npy, Dio2, Trhde*)
- Expresión de genes en tejido adiposo blanco (*Adrb3, Dio2, Pparg, Hsl*), músculo esquelético (*Dio2, Pgc1a*) y tejido adiposo pardo (*Adrb3, Dio2, Ucp1*)

Figura 7. Diagrama experimental del protocolo de estrés crónico variable durante la adolescencia y ejercicio voluntario diario. C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable; N: grupo sedentario con alimentación ad libitum; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario diario.

Pruebas conductuales

Dentro del protocolo de estrés crónico variable se realizaron pruebas conductuales con la finalidad de evaluar la conducta de los animales. Se analizó la actividad locomotora en jaula, la prueba de campo abierto y la prueba de laberinto elevado de cruz (Gutierrez-Mariscal et al., 2012) para evaluar el comportamiento ansioso. Todas las pruebas fueron realizadas entre las 10:00 y 14:00 hrs.

Actividad locomotora en jaula

La actividad locomotora en jaula fue evaluada utilizando el sistema de actividad fotoeléctrica en jaula (PAS-Home Cage) (San Diego Instruments Co.), la prueba consistió en colocar a una rata en una caja que tiene incorporada alrededor un sensor conectado a una computadora durante 5 minutos. El sistema detecta los movimientos del animal con rayos infrarrojos distribuidos a lo largo y ancho de la caja; una vez concluido el tiempo, el animal es regresado

a su caja habitual. La cantidad de movimientos se analizaron mediante el software incluido en el equipo, estos se agrupan 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) o totales (suma de movimientos finos y ambulatorios).

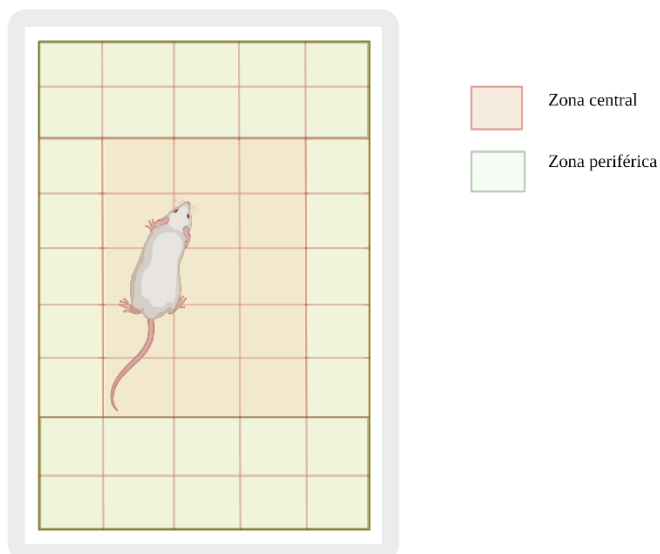


Figura 8. *Esquema del sistema de actividad fotoeléctrica para la evaluación de la actividad locomotora en jaula.* El aparato utiliza un marco que emite rayos LASER a través de la caja donde se encuentra el animal lo que permite detectar los movimientos finos y ambulatorios que va realizando. La zona central y la zona periférica las delimita el software del aparato.

Prueba de campo abierto

La prueba exploración en campo abierto (OFT) se realizó como se reporta en Gutiérrez-Mariscal et al., 2012; 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 se colocó en el centro de la arena y se dejó explorar libremente por 5 minutos. Se evaluó el tiempo de permanencia y la distancia recorrida en el centro (un cuadro delimitado de 50 x 50 cm) y la periferia (zona cercana a las paredes).

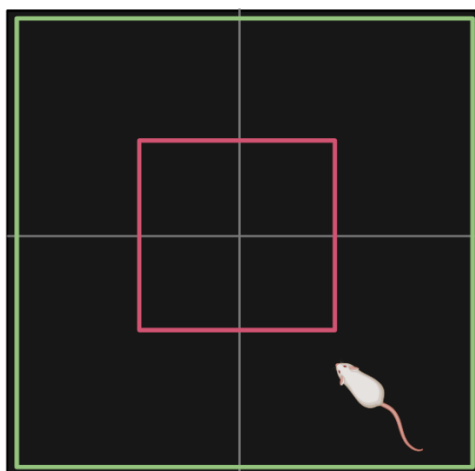


Figura 9. Esquema de la prueba de campo abierto. La zona centro (marcada en rojo) y la zona periférica (marcada en verde) se delimitan de acuerdo al software del aparato.

Laberinto elevado de cruz

La prueba de laberinto elevado de cruz (EPM) (Gutiérrez-Mariscal et al., 2012) consistió 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 sin barreras (brazos abiertos) (San Diego Instruments Co.). Al momento de la prueba, cada animal se colocó en el centro del laberinto 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 de permanencia y la distancia recorrida en los brazos abiertos y los brazos cerrados.

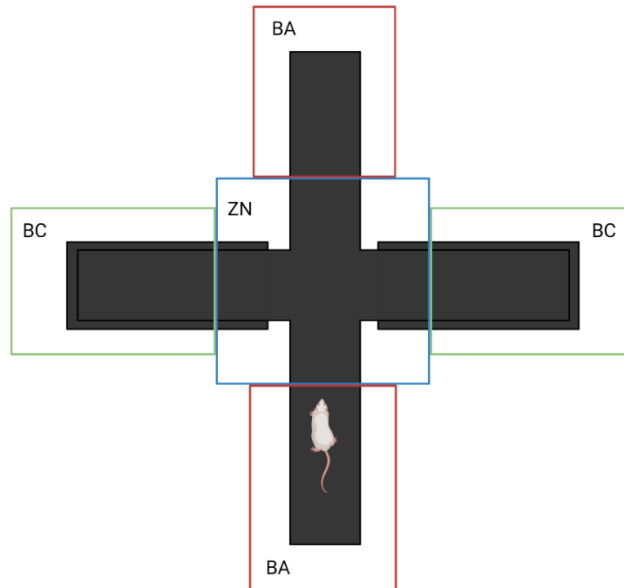


Figura 10. Esquema de la prueba de laberinto elevado de cruz (EPM). Las zonas de brazos abiertos (BA), brazos cerrados (BC) y neutra (ZN) se delimitan de acuerdo al software del aparato.

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% una vez terminado el recorrido de cada animal.

Variables ponderantes

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

$$CAD = \frac{\text{Alimento inicial (g)} - \text{Alimento final (g)}}{\text{Número de ratas por caja} \times \text{Día}}$$

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:

$$GPC = \text{Peso corporal final (g)} - \text{Peso corporal inicial (g)}$$

El consumo relativo de alimento (CRA) relaciona el consumo de alimento diario promedio con respecto al peso corporal en kilogramos.

$$CRA = \frac{CAD (g)}{Peso Corporal (kg)}$$

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

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

Obtención de tejidos

En el último día de ejercicio, todas las ratas fueron decapitadas por guillotina, se colectó la sangre troncal, se obtuvo el suero por centrifugación (3500 rpm por 25 min a 4°C) y se guardó en alícuotas de 200 µl y se almacenaron a -20°C para la posterior cuantificación de hormonas. Durante el sacrificio participaron varias personas para procesar el mayor número de ratas en el mínimo de tiempo posible. Se disecó el tejido adiposo blanco (TAB) de la zona gonadal (epidídimal y ovárica), retroperitoneal e interescapular y se registró el peso de cada tejido en fresco; el cerebro y el tejido adiposo pardo (TAP) se colocaron en hielo seco y se guardaron a -80 °C para hacer extracción de RNA total (Chomzynski & Sacchi, 2006) y análisis de PCR; adicionalmente, en el protocolo de ECV se disecó y guardó el músculo esquelético (ME) gastrocnemius de la pata inferior izquierda y se guardó parte del TAB de la zona gonadal. En el caso de las hembras, se realizó frotis vaginal para la determinar su estado del ciclo estral, en el cuerpo decapitado para evitar estrés adicional en el animal vivo.

Cuantificación de hormonas

Mediante ensayo radioinmunológico (RIA) se cuantificó en suero sanguíneo la concentración de corticosterona (reactivos de Merck-Millipore, PerkinElmer y Sigma) y TSH (reactivos y protocolos de NIDDK); la de T3 total y T4 total con kits de ELISA (Diagnóstica Internacional) incorporando suero de ratas hipotiroideas a la curva patrón de cada ensayo (Bianco et al., 2014). Todas las muestras se midieron por duplicado y la media fue tomada como una determinación; los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron <10%.

Dissección de cerebros

Los cerebros congelados fueron colocados sobre las cortezas para obtener rebanadas coronales de 1 mm de grosor (Figura 11). Utilizando un sample corer de 0.5 mm de diámetro interno (Fine Science Tools) se disecó el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) de la rebanada más anterior y de la siguiente, el hipotálamo medio basal (MBH) que contiene el núcleo arcuato y la eminencia media. Para el protocolo de ECV, se realizaron rebanadas de 200 μm en las regiones establecidas con la finalidad de separar el PVN anterior y PVN medio-posterior siendo este último el que se utilizó para realizar las determinaciones de expresión de genes.

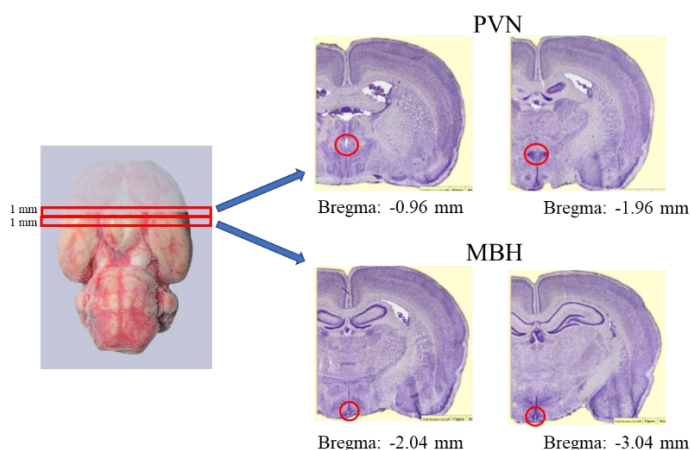


Figura 11. Regiones hipotalámicas obtenidas de cortes coronales de cerebros congelados. Se especifican las coordenadas de Bregma correspondientes para el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) y el hipotálamo medio-basal (MBH) (Paxinos & Watson, 2005).

Extracción de RNA y RT-PCR

La extracción de RNA total del PVN, el MBH y el ME se realizó por el método de Chomzynski & Sacchi, 2006; la extracción de RNA de los tejidos adiposos se hizo por el mismo método, pero se efectuó una centrifugación a 2870 rpm (Centrifuga MIKRO 200R) a 4 °C por 10 min para la eliminación de materia grasa antes del tratamiento con fenol y un lavado adicional de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). Posteriormente se obtuvo el cDNA por retrotranscripción y se analizó la expresión relativa de los genes (PVN: *Crh*, *Avp*, *Gr*, *Trh*; MBH: *Pomc*, *Npy*, *Dio2*, *Trhde*; TAP: *Adrb3*, *Dio2*, *Ucp1*; TAB: *Adrb3*, *Dio2*, *Pparg*, *Hsl*; ME: *Dio2*, *Pgc1a*) mediante PCR punto final semi-cuantitativa por densimetría con ayuda del software Image Lab (Bio-Rab Laboratories) Las condiciones de amplificación de

los genes se muestran en el anexo 4. Como genes reporteros se utilizaron Ciclofilina A (4 μ l cDNA, Tm: 64°C, 20 ciclos) y HPRT (4 μ l cDNA, Tm: 64°C, 28 ciclos). La expresión de genes que responden a hormonas tiroideas o que intervienen en la regulación del metabolismo energético en tejido adiposo blanco de la región gonadal fueron parte de la tesis de licenciatura de la alumna Karen Garduño Morales.

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar (esm). Para los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 8. Para analizar los efectos del estrés (aislamiento o ECV) y del sexo en las variables ponderales en el periodo de adolescencia y en los parámetros evaluados durante la adultez sin intervención del ejercicio, se utilizó ANOVA de dos vías; los efectos del estrés, la actividad física y el sexo sobre las variables ponderables, los parámetros bioquímicos (hormonas y expresión de genes) y su interacción se analizaron por ANOVA de tres vías (sexo*estrés*actividad) (en este apartado, para el protocolo de ECV, sólo se tomaron en cuenta los datos de un experimento representativo). El ANOVA de dos vías con medidas repetidas permitió analizar el comportamiento del consumo de alimento y ganancia de peso corporal durante la adolescencia. Se consideró un nivel de significancia ≤ 0.05 para todos los casos. Las diferencias entre medias se analizaron mediante la prueba de Holm-Sidak. En algunos casos (indicado en la figura) se analizó la diferencia entre dos grupos por la prueba *t*-student.

Resultados

Protocolo 1: Efecto del aislamiento social desde la adolescencia en la respuesta del eje tiroideo al ejercicio voluntario alternado en ratas adultas

El aislamiento social durante la adolescencia es un fuerte estresor en roedores que ha demostrado prevenir el desarrollo adecuado del cerebro y causar alteraciones conductuales y fisiológicas hasta la edad adulta (Lukkes et al., 2009; Arakawa, 2018). Los resultados de este experimento formaron parte de la publicación Parra-Montes de Oca et al. *Frontiers in Endocrinology (Laussane)* 10(418):1-13, 2019 (Anexo 4).

Variables ponderantes durante la adolescencia

Las ratas macho crecieron más rápido que las hembras sin diferencias significativas entre animales control y aislados para ambos sexos durante este periodo (Figura 12; Tabla 1).

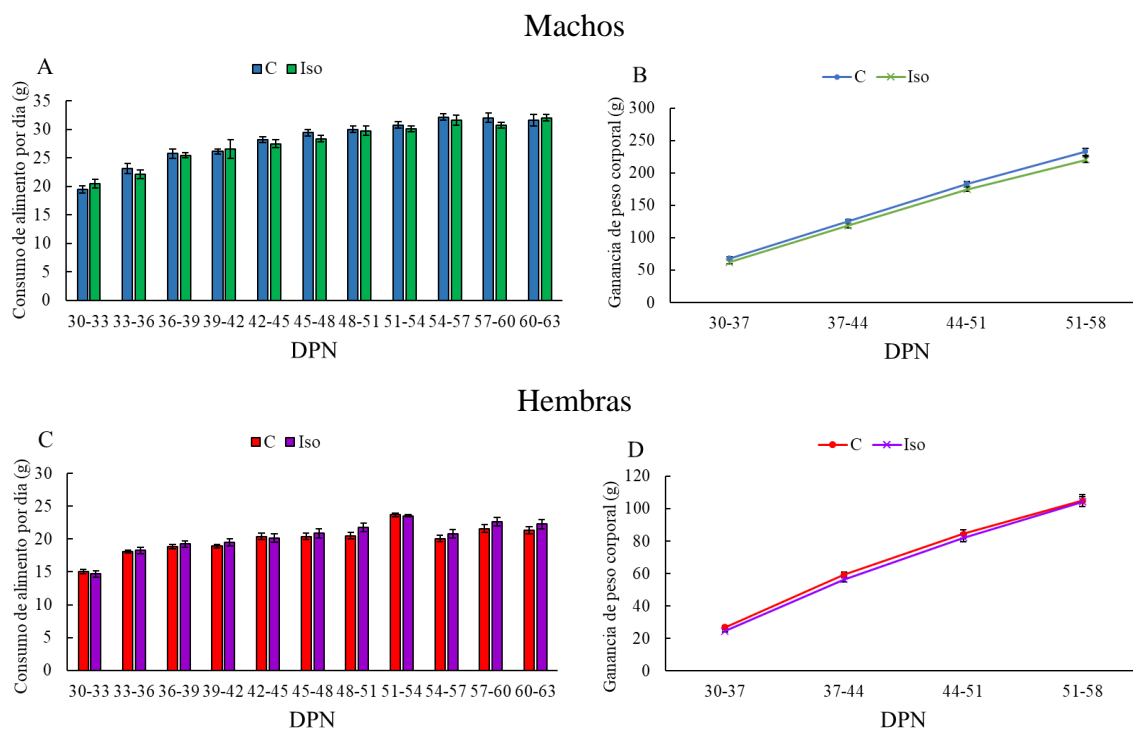


Figura 12. Consumo de alimento por día por rata y ganancia de peso corporal durante la adolescencia de ratas macho (A y B) y hembra (C y D). El peso del alimento se registró cada 3 días desde el día postnatal (DPN) 30 hasta el DPN 63 y el peso corporal se registró cada 7 días desde el DPN 30 hasta el DPN 58. Los resultados se expresan en promedio \pm esm (n=16). C: grupo control; Iso: grupo en aislamiento social.

Tabla 1. Consumo de alimento (CA), ganancia de peso corporal (GPC), consumo relativo de alimento (CRA) y eficiencia de alimento (EA) durante el periodo de adolescencia de ratas macho y hembra mantenidas en grupo (C) o en aislamiento social (Iso).

	MACHOS	C	Iso
CA (g/d)		27.58 ± 0.37	27.14 ± 0.64
GPC (g)		232.63 ± 5.48	220.00 ± 4.34
CRA (g/d/kg de PC)		80.82 ± 1.47	82.37 ± 1.00
EA (g de GPC/100 g alimento)		30.32 ± 0.53	29.20 ± 0.50
HEMBRAS			
CA (g/d)		19.55 ± 0.23 ^A	19.81 ± 0.53 ^A
GPC (g)		104.94 ± 3.57 ^A	104.19 ± 3.06 ^A
CRA (g/d/kg de PC)		96.20 ± 2.06 ^A	97.08 ± 0.87 ^A
EA (g de GPC/100g alimento)		19.21 ± 0.55 ^A	18.87 ± 0.30 ^A

Los resultados están expresados en promedio ± esm (n=16) y analizados por ANOVA de 2 vías. La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$) ^A: $P < 0.001$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental.

Estos resultados muestran que el aislamiento desde la etapa adolescente no afecta la conducta alimentaria y la ganancia de peso corporal durante la adolescencia.

Variables ponderantes y actividad física durante el periodo de ejercicio

En ambos sexos, el ejercicio voluntario alternado redujo el consumo de alimento en 19% para los C y 18% para los animales aislados comparado con el consumo promedio antes del ejercicio (Datos no mostrados); sin embargo, comparando los grupos ejercitados, las ratas hembra Iso-Ex consumieron más alimento que las C-Ex (Tabla 2). Después del periodo de ejercicio, las ratas Iso ganaron más peso corporal comparado con las ratas C pese a que hicieron la misma cantidad de ejercicio (Tabla 2). En el cálculo de la relación de consumo de alimento con el peso corporal y la eficiencia de alimento, las ratas hembra Iso consumieron más alimento y disminuyó su eficiencia. Las hembras recorrieron más distancia por día en comparación con los machos (Tabla 2).

Tabla 2. Consumo de alimento, ganancia de peso corporal, consumo relativo de alimento, eficiencia de alimento y distancia por día durante el periodo de ejercicio de ratas macho y hembra mantenidas en grupo o en aislamiento social.

MACHOS	C-PF	C-Ex	Iso-PF	Iso-Ex
CA (g/d)	24.74 ± 0.02	25.24 ± 0.84	26.04 ± 0.04*	26.30 ± 0.92
GPC (g)	16.67 ± 1.20	15.00 ± 3.84	30.83 ± 2.27*	25.50 ± 2.53* ^{&}
CAR (g/d/kg de PC)	63.31 ± 1.78	66.09 ± 2.09	70.26 ± 1.98*	68.56 ± 0.91*
EA (g de PC/100 g alimento)	3.20 ± 1.04	3.94 ± 1.22	9.19 ± 0.67*	6.60 ± 1.33*
DPD (m)		542 ± 36		570 ± 74
HEMBRAS				
CA (g/d)	16.99 ± 0.01 ^A	17.07 ± 0.34 ^A	18.16 ± 0.02* ^A	18.00 ± 0.46* ^A
GPC (g)	10.86 ± 2.98 ^A	7.17 ± 3.63 ^A	14.00 ± 1.41* ^A	13.14 ± 1.98* ^A
CAR (g/d/kg de PC)	75.65 ± 2.20 ^A	75.35 ± 3.27 ^A	77.72 ± 1.72 ^A	76.74 ± 2.21 ^A
EA (g de PC/100 g alimento)	4.26 ± 1.16	2.68 ± 1.44	5.14 ± 0.52 ^A	4.94 ± 0.79* ^A
DPD (m)		3061 ± 597 ^A		3753 ± 522 ^A

CA: consumo de alimento; GPC: ganancia de peso corporal; CAR: consumo de alimento relativo; EA: eficiencia de alimento; DPD: distancia por día; C: grupo control; Iso: grupo en aislamiento social; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario alternado. Los resultados están expresados en promedio ± esm (n=8) y analizados por ANOVA de 3 vías. La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). * $P < 0.05$ C vs Iso; [&] $P < 0.05$ PF vs Ex; ^A $P < 0.001$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental.

No se observaron diferencias entre el peso de las grasas de los machos sedentarios y ejercitados (Figura 13A), aunque los machos Iso tuvieron una mayor cantidad de grasa gonadal y retroperitoneal comparado con sus controles. Las hembras C-Ex perdieron grasa gonadal y retroperitoneal, mientras que el grupo Iso-Ex mostró una reducción en la grasa interescapular (Figura 13B).

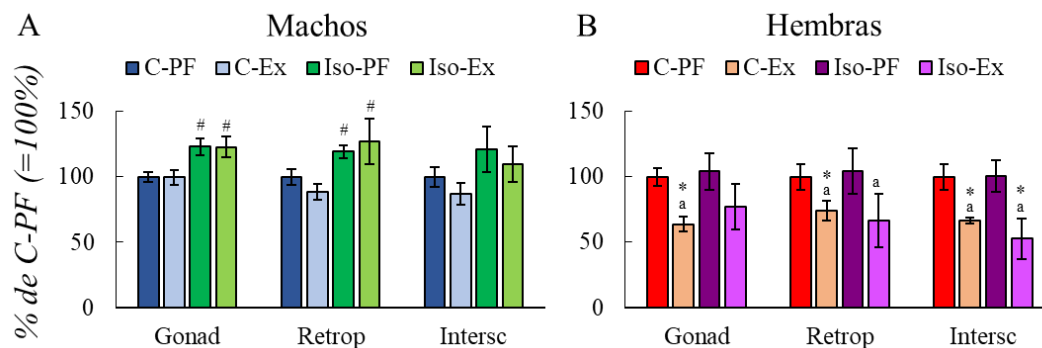


Figura 13. Efecto del ejercicio voluntario alternado y el aislamiento social en el peso del tejido adiposo blanco de diferentes regiones de ratas macho (A) y hembra (B). Se consideró el peso registrado del tejido adiposo blanco de la región gonadal (Gonad), retroperitoneal (Retrop) e interescapular (Intersc). Los resultados están expresados en promedio ± esm (n=8) y analizados por ANOVA de 3 vías (Anexo 5). La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). * : $P < 0.05$ PF vs Ex. ^a: $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental. C: grupo control; Iso: grupo en aislamiento social; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario alternado.

Respuesta del eje HPA al ejercicio voluntario alternado y al aislamiento social

En los machos C-Ex observó una tendencia a incrementar la expresión de *Gr* en PVN ($P=0.086$) y la concentración de corticosterona en suero ($P=0.075$) (Figura 14A). La actividad del eje HPA en hembras no se alteró por el ejercicio ni el aislamiento (Figura 14B), aunque el aislamiento social disminuyó la expresión de *Crh* en PVN y en la concentración de corticosterona en suero. También aumentó la expresión de *Gr* en PVN, aunque este sólo fue significativo en el grupo Iso-PF. Los resultados muestran una activación del eje en las ratas macho, mientras que las hembras se encuentran hiporesponsivas.

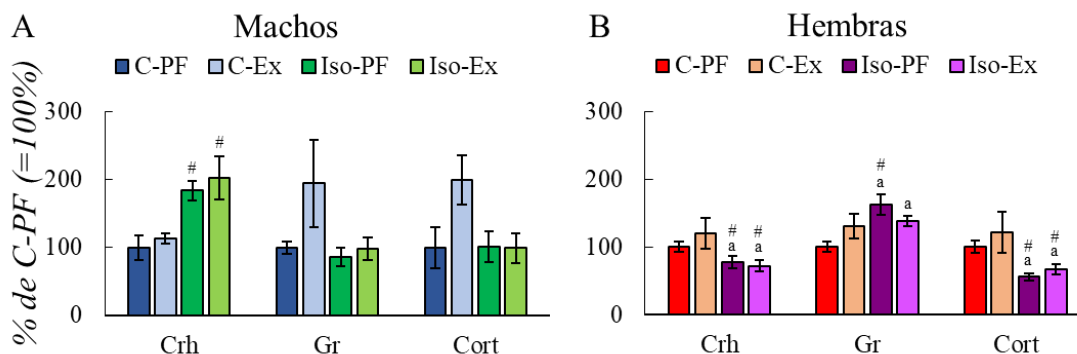


Figura 14. Efecto del aislamiento social y el ejercicio voluntario alternado en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales de ratas macho (A) y hembra (B). Los resultados están expresados en promedio \pm esm ($n=8$) y analizados por ANOVA de 3 vías (Anexo 5). La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). #: $P < 0.05$ C vs Iso. ^a: $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental. C: grupo control; Iso: grupo en aislamiento social; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario alternado.

Respuesta del eje HPT al ejercicio voluntario alternado y al aislamiento social

El ejercicio alternado indujo un aumento en la expresión de *Pomc* y *Dio2* en el MBH de los machos C-Ex, mientras que el aislamiento inhibió este efecto en los machos Iso-Ex (Figura 15A); La expresión de *Npy* disminuyó en los machos aislados comparado con sus controles. Cabe resaltar que el ejercicio voluntario alternado no produjo cambios en la expresión de *Pomc*, *Npy* y *Dio2* en las hembras C-Ex (Figura 15B), en cambio el ejercicio aumentó la expresión de *Trhde* de las hembras C-Ex. Un efecto del aislamiento social que tuvo en las hembras es que aumentó la expresión de *Npy* y disminuyó la expresión de *Trhde* y *Dio2* independientemente del ejercicio.

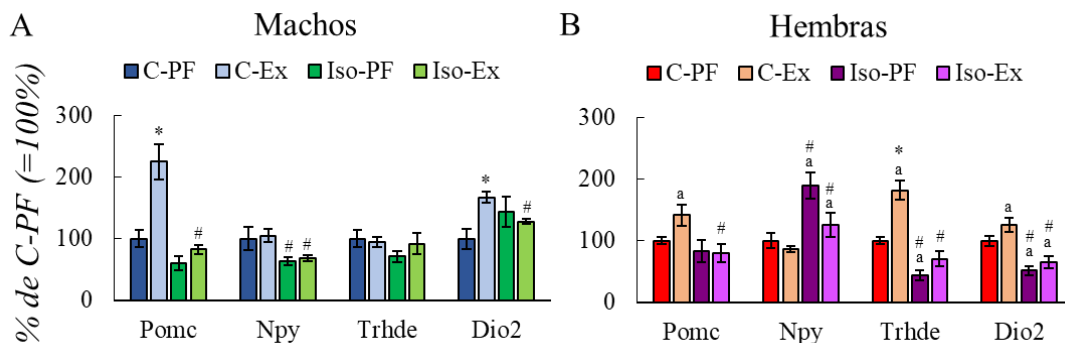


Figura 15. Efecto del aislamiento social y el ejercicio voluntario alternado en los elementos reguladores del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides en el hipotálamo medio basal de ratas macho (A) y hembra (B). Los resultados están expresados en promedio \pm esm (n=8) y analizados por ANOVA de 3 vías. (Anexo 5) *: $P < 0.05$ PF vs Ex. #: $P < 0.05$ C vs Iso. ^a: $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental. C: grupo control; Iso: grupo en aislamiento social; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario alternado.

El ejercicio voluntario alternado no estimuló la actividad del eje HPT en los machos C-Ex. En este trabajo los machos aislados y sometidos a ejercicio voluntario alternado presentaron una disminución en la concentración sérica de TSH, además de que el aislamiento social produjo un incremento en la concentración sérica de T4 independientemente del ejercicio (Figura 16A). Se observó una correlación positiva entre la concentración sérica de T4 y la masa de la grasa retroperitoneal ($r = 0.879$; $P = 0.009$), caso contrario en los machos C-Ex en donde se observó una correlación negativa ($r = -0.856$; $P = 0.030$). La relación T4/T3 fue mayor en los animales aislados (Iso-PF: 8.076 ± 0.524 ; Iso-Ex: 8.996 ± 0.719) comparado con los animales control (C-PF: 6.851 ± 0.676 ; C-Ex: 5.907 ± 0.648). En hembras, disminuyó la expresión de *Trh* en el PVN, pero aumentó la concentración sérica de TSH y T3 del grupo C-Ex (Figura 16B); mientras en las hembras Iso-Ex disminuyó la concentración sérica de T4, pero aumentó en la de T3. En contraste con los efectos observados en machos, la relación T4/T3 fue menor en las hembras aisladas (Iso-PF: 12.936 ± 0.978 ; Iso-Ex: 10.237 ± 1.129) comparado con las ratas control (C-PF: 14.259 ± 1.520 ; C-Ex: 13.734 ± 0.828).

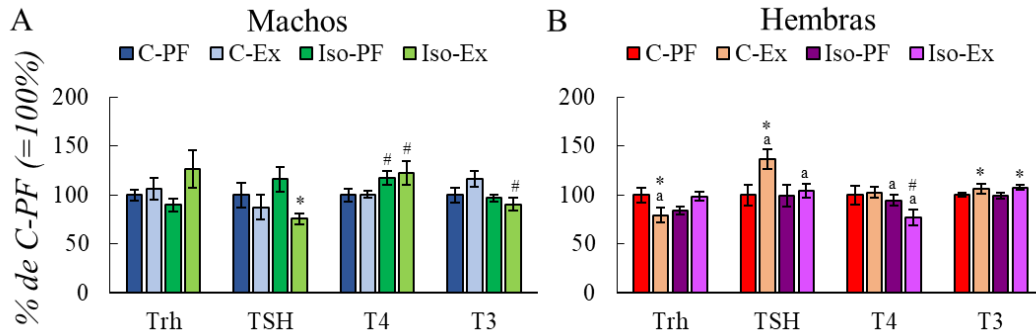


Figura 16. Efecto del aislamiento social y el ejercicio voluntario alternado en la respuesta del eje HPT de ratas macho (A) y hembra (B). Los resultados están expresados en promedio \pm esm (n=8) y analizados por ANOVA de 3 vías (Anexo 5). La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ PF vs Ex. #: $P < 0.05$ C vs Iso. ^a: $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental. C: grupo control; Iso: grupo en aislamiento social; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario alternado.

El tejido adiposo pardo, al ser un tejido blanco de hormonas tiroideas y que también responde al ejercicio (Mullur et al., 2014; Uribe et al., 2014), se analizó la expresión de *Adrb3* como marcador de la actividad simpática y *Ucp1* de la actividad termogénica, ambos genes regulados por actividad simpática y hormonas tiroideas (Mullur et al., 2014). En machos, el ejercicio voluntario alternado produjo un incremento en la expresión de *Adrb3* y *Ucp1* de ambos grupos experimentales; no se observaron cambios en la expresión de *Dio2* en ninguno de los tratamientos (Figura 17A). Las hembras control no mostraron cambios en los genes evaluados por efecto del ejercicio voluntario alternado, mientras que las hembras Iso-Ex mostraron un incremento en la expresión de *Dio2* y *Ucp1* (Figura 17B).

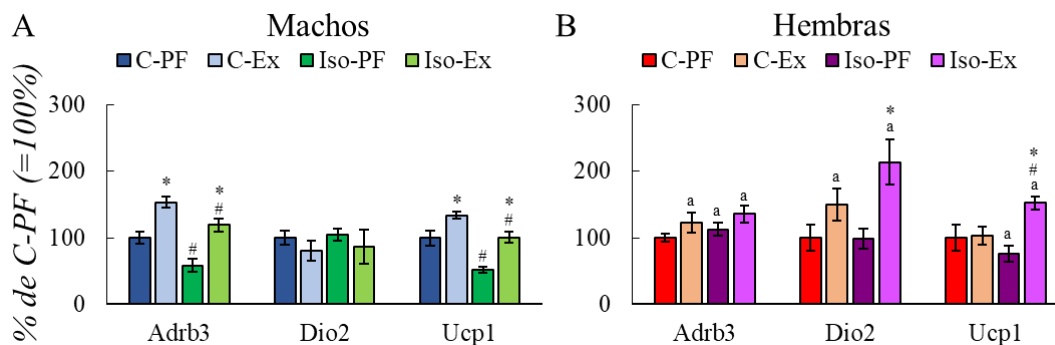


Figura 17. Efectos del aislamiento social y el ejercicio voluntario alternado en la expresión relativa de genes en tejido adiposo pardo de ratas macho (A) y hembra (B). Los resultados están expresados en promedio \pm esm (n=8) y analizados por ANOVA de 3 vías (Anexo 5). La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ PF vs Ex. #: $P < 0.05$ C vs Iso. ^a: $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental. C: grupo control; Iso: grupo en aislamiento social; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario alternado.

El conjunto de estos resultados sugiere que el ejercicio voluntario alternado no reproduce en machos la activación esperada del eje HPT como había sido reportado en animales sometidos al ejercicio diario (Uribe et al., 2014); además de que el aislamiento inhibe la respuesta al ejercicio en la expresión de *Pomc* en el hipotálamo mediobasal para ambos sexos, pero no inhibe esta respuesta en la expresión de *Adrb3* y *Ucp1* en machos. Estos efectos al parecer dependen del sexo ya que en hembras no se observaron efectos por parte del ejercicio alternado y el aislamiento social en la respuesta del eje HPT.

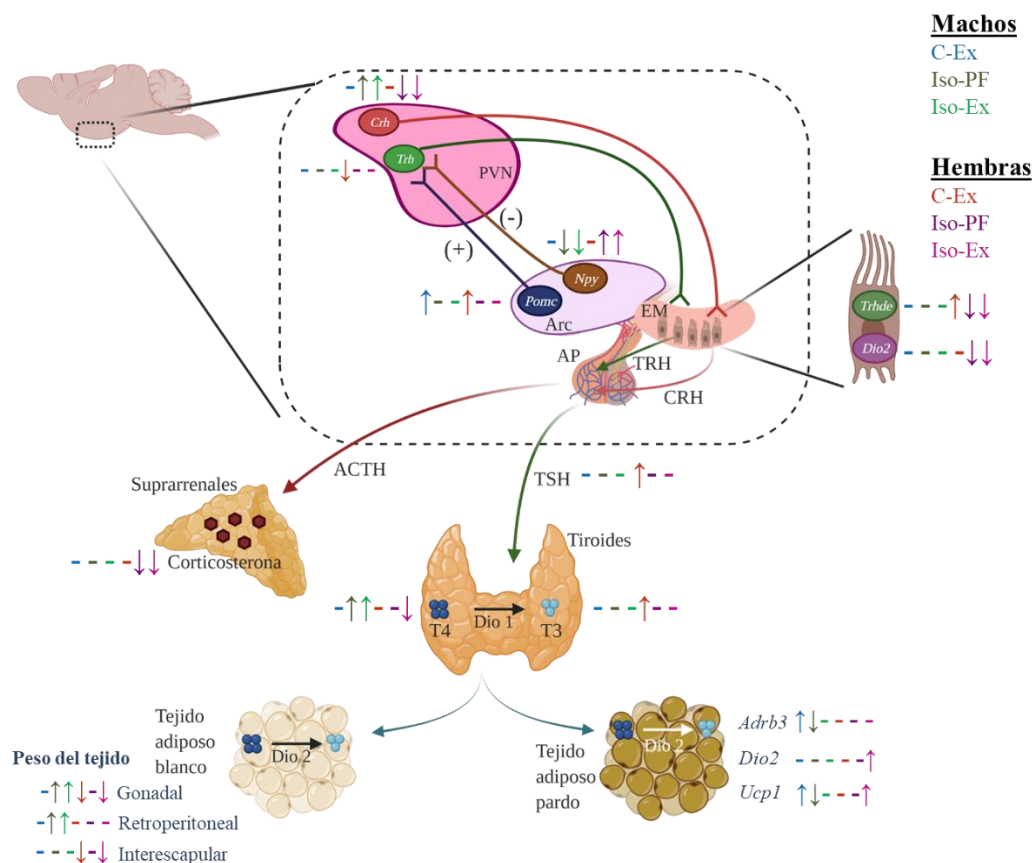


Figura 18. Esquema general de los efectos del aislamiento social desde la adolescencia y el ejercicio voluntario alternado en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides y sus elementos reguladores. C: grupo control; Iso: grupo en aislamiento social; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo con ejercicio alternado; PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo; Arc: núcleo arcuato; EM: eminencia media; AP: pituitaria anterior. Las flechas indican incremento o decremento, mientras que los guiones indican que no hay cambios en cada grupo experimental comparado con el grupo C-PF de cada sexo.

Protocolo 2: Efecto del estrés crónico variable durante la adolescencia en la respuesta del eje tiroideo al ejercicio voluntario en ratas adultas

En el protocolo anterior los animales se mantuvieron aislados durante todo el experimento ya que se ha observado que los animales aislados presentan conductas agresivas si estos vuelven a estar en grupo (Fone & Porkess, 2008), por lo que se podría considerar un estrés adicional. Con la finalidad de evaluar solamente los efectos que se producen por el estrés durante la adolescencia, se modificó entonces el paradigma a un estrés crónico variable (ECV), para evitar la habituación producida por estrés homotípico (Goliszek et al., 1996) durante las edades que corresponden a la adolescencia de cada sexo; las ratas se ejercitaron todos los días con la finalidad de replicar los resultados antes reportados (Uribe et al., 2014). Para garantizar el efecto a largo plazo y no inmediato anterior al ejercicio, los animales permanecieron sin estímulos durante dos semanas posterior al periodo de estrés, antes de someterlos al periodo de ejercicio voluntario.

Variables ponderantes durante la adolescencia

El estrés durante la adolescencia puede modificar la conducta alimentaria de los roedores. Las hembras sometidas a ECV, a partir del DPN 48 hasta el DPN 60, tuvieron un mayor consumo de alimento comparado con el grupo C. Por otro lado, los machos ECV tuvieron un consumo similar a los controles, sin embargo, ganaron menos peso corporal que el grupo C en el DPN 65 (Figura 19).

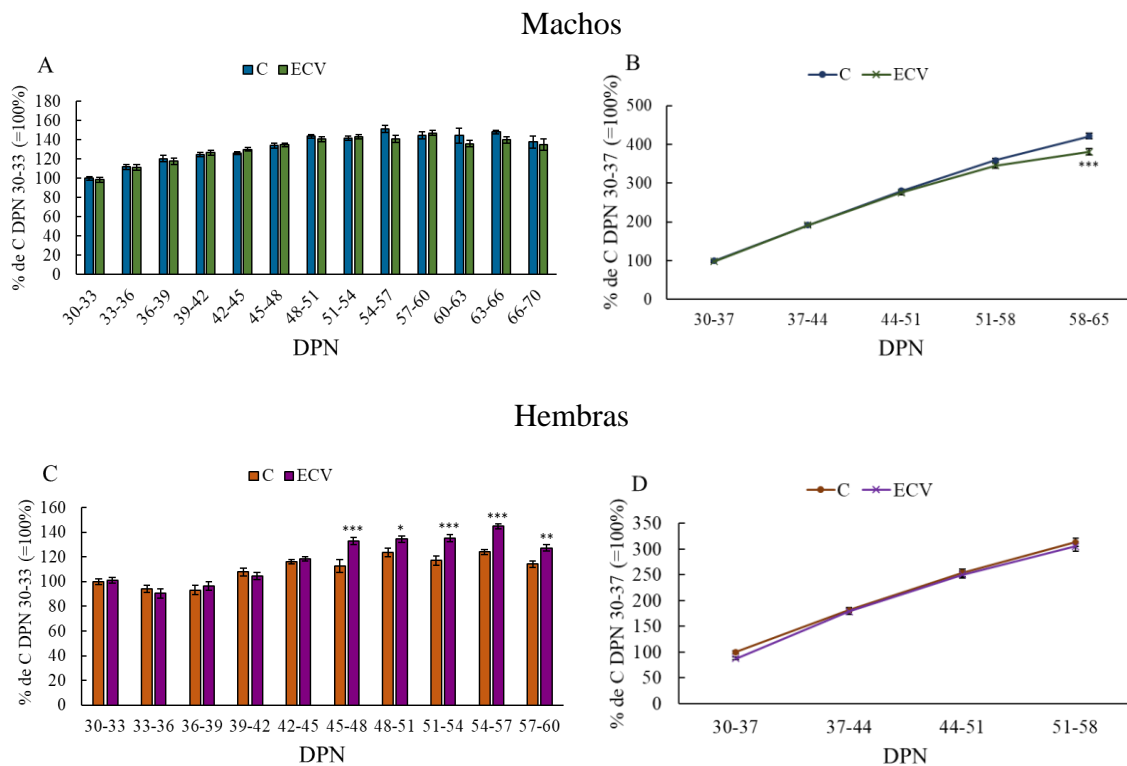


Figura 19. Efecto del estrés crónico variable durante la adolescencia en el consumo de alimento por día y ganancia de peso corporal de ratas macho (A y B) y hembra (C y D). Los resultados están normalizados en % de C en el día post natal (DPN) 30-33 para consumo de alimento y en el DPN 30-37 para ganancia de peso corporal, expresados en promedio \pm esm y analizados por ANOVA de 2 vías de medidas repetidas. La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$): *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ C vs ECV del mismo DPN. C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable.

Al final de la adolescencia, aunque la ingesta de alimento fue similar entre controles y estresados, la menor ganancia de peso en los machos ECV causó una eficiencia de alimento menor y un consumo relativo de alimento mayor en comparación al grupo control (Tabla 3). En cambio, las hembras ECV consumieron más alimento que los controles, pero ganaron un peso similar, provocando un mayor consumo relativo de alimento tendiendo también a una menor eficiencia de alimento (Tabla 3).

Tabla 3. Consumo de alimento, ganancia de peso corporal, consumo de alimento relativo y eficiencia de alimento durante el periodo de adolescencia de ratas macho y hembra control y sometidas a estrés crónico variable.

	CA (g/día)	GPC (g)	CAR (g/día/kg de PC)	EA (g de PC/100 g alimento)
MACHOS				
<i>C</i>	22.65 ± 0.26	231 ± 3	66.79 ± 0.96	29.24 ± 0.50
<i>ECV</i>	22.57 ± 0.33	210 ± 4***	70.46 ± 0.96**	26.77 ± 0.59**
HEMBRAS				
<i>C</i>	16.72 ± 0.45	96 ± 2	79.01 ± 1.29	25.29 ± 1.28
<i>ECV</i>	17.80 ± 0.45*	93 ± 3	85.03 ± 1.64**	23.12 ± 1.34

CA: Consumo de alimento; GPC: ganancia de peso corporal; CAR: consumo de alimento relativo; EA: eficiencia de alimento; C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable. Los resultados están expresados en promedio ± esm y analizados por ANOVA de 2 vías. La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ C vs ECV; ^A: $P < 0.001$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental.

Pruebas conductuales

El evaluar la actividad locomotora permite conocer el comportamiento habitual de la rata en un ambiente similar al de sus condiciones de vivienda registrando los movimientos finos y ambulatorios. Estos movimientos se pueden agrupar en centrales y periféricos, simulando las condiciones de la prueba de campo abierto. Los machos estresados tuvieron un menor número de movimientos centrales finos comparados al grupo control, aunque no se observaron cambios en el número total de movimientos centrales. Las hembras ECV registraron menos movimientos totales en el centro, pero sin diferencias entre los movimientos centrales finos y ambulatorios (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del estrés crónico variable en la actividad locomotora en jaula evaluada por el sistema de actividad fotoeléctrica de ratas macho y hembra en el DPN 37.

NÚMERO DE MOVIMIENTOS						
	Cen finos	Cen ambul	Cen totales	Per finos	Per ambul	Per totales
MACHOS						
<i>C</i>	29 ± 1	122 ± 12	151 ± 13	35 ± 2	165 ± 16	200 ± 16
<i>ECV</i>	24 ± 1*	107 ± 11	132 ± 12	36 ± 2	143 ± 13	184 ± 14
HEMBRAS						
<i>C</i>	48 ± 4 ^A	170 ± 13 ^A	218 ± 14 ^A	60 ± 5 ^A	235 ± 18 ^A	295 ± 20 ^A
<i>ECV</i>	42 ± 4 ^A	140 ± 9 ^A	182 ± 10* ^A	54 ± 5 ^A	195 ± 13 ^A	249 ± 15 ^A

C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable; DPN: día postnatal; Cen: movimientos centrales; Per: movimientos periféricos; ambul: movimientos ambulatorios. Los resultados están expresados en promedio ± esm y analizados por ANOVA de 2 vías. La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ C vs ECV; ^A $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental.

La prueba de campo abierto (OFT) permite evaluar la actividad locomotora exploratoria, además de conocer el grado de ansiedad comparando el tiempo en la zona central (menos

ansiedad) contra la zona periférica (mayor ansiedad) (Verma et al., 2010). El ECV no indujo cambios en la actividad locomotora ni en comportamiento ansioso para ambos días entre los machos (Tabla 5). Sin embargo, las hembras sometidas a ECV pasaron menos tiempo en el centro y más en la periferia comparado en el grupo control en ambos días de experimentación (Tabla 5). Estos resultados sugieren un comportamiento ansioso en las hembras después de 14 días de estrés crónico variable. Como esta prueba se realizó en dos días diferentes, nos permitió evaluar el aprendizaje no-asociativo en los animales, mostrando una sensibilización al campo abierto por parte de las hembras ECV la segunda vez que se sometieron a esta prueba (Anexo 6).

Tabla 5. Efecto del estrés crónico variable en la prueba de campo abierto en ratas macho y hembra en el DPN 44 y DPN 58.

	t Per (s)	D Per (m)	D Tot (m)	t Cen (s)	D Cen (m)	D Tot (m)
DPN 44						
MACHOS						
<i>C</i>	296 ± 0.8	71 ± 3.2	73 ± 3.2	4 ± 0.8	2 ± 0.3	73 ± 3.2
<i>ECV</i>	295 ± 0.7	70 ± 4.3	72 ± 4.5	5 ± 0.7	2 ± 0.4	72 ± 4.5
HEMBRAS						
<i>C</i>	280 ± 2.2 ^A	77 ± 2.0	85 ± 2.1 ^A	20 ± 2.2 ^A	8 ± 0.8 ^A	85 ± 2.1 ^A
<i>ECV</i>	287 ± 1.8* ^A	73 ± 2.2	79 ± 2.6	13 ± 1.8* ^A	6 ± 0.7* ^A	79 ± 2.6
DPN 58						
MACHOS						
<i>C</i>	294 ± 0.9	65 ± 5	67 ± 5	6 ± 0.9	2 ± 0.4	67 ± 5
<i>ECV</i>	294 ± 1.4	70 ± 3	73 ± 4	6 ± 1.4	3 ± 0.6	73 ± 4
HEMBRAS						
<i>C</i>	279 ± 1.9 ^A	81 ± 2.2 ^A	91 ± 2.3 ^A	21 ± 1.9 ^A	10 ± 0.8 ^A	91 ± 2.3 ^A
<i>ECV</i>	288 ± 1.4* ^A	82 ± 2.3 ^A	88 ± 2.6 ^A	12 ± 1.4* ^A	6 ± 0.7* ^A	88 ± 2.6 ^A

C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable; DPN: día postnatal; t: tiempo; D: distancia; Per: periferia; Cen: centro; Tot: total (suma de centro y periferia). Los resultados están expresados en promedio ± esm y analizados por ANOVA de 2 vías. La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ C vs ECV; ^A $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental.

La prueba de laberinto elevado de cruz (EPM) evalúa el comportamiento ansioso comparando el tiempo de permanencia y/o número de entradas en brazos abiertos (menos ansioso) contra brazos cerrados (más ansioso) (Carobrez & Bertoglio, 2005). A las 3 semanas de haber iniciado el ECV, no hubo diferencias en el comportamiento entre los machos estresados y los controles, mientras que después de 5 semanas, pasaron menos tiempo y recorrieron menos distancia en los brazos abiertos comparados al grupo control, lo que sugiere un comportamiento ansioso (Tabla 6). Las hembras ECV permanecieron menos

tiempo en los brazos abiertos, tuvieron menos número de entradas y recorrieron menor distancia después de 3 semanas de estrés (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto del estrés crónico variable en la prueba de laberinto elevado de cruz de ratas macho en el DPN 51 y DPN 65 y ratas hembra en el DPN 51.

	t BA (s)	Ent BA	D BA (m)	t BC (s)	Ent BC	D BC (m)
DPN 51						
MACHOS						
<i>C</i>	47 ± 5.4	8 ± 1	11 ± 1.3	102 ± 6.6	17 ± 1	25 ± 1.2
<i>ECV</i>	42 ± 5.6	6 ± 1	8 ± 1.3	103 ± 7.1	18 ± 1	27 ± 1.3
HEMBRAS						
<i>C</i>	92 ± 4.2 ^A	10 ± 1	19 ± 0.8 ^A	91 ± 3.5 ^A	15 ± 1	23 ± 1.2
<i>ECV</i>	70 ± 2.9*	10 ± 1	15 ± 0.7* ^A	77 ± 2.3 ^A	15 ± 1	24 ± 0.7
DPN 65						
MACHOS						
<i>C</i>	45 ± 4.4	6 ± 1	10 ± 1	92 ± 7.1	19 ± 2	25 ± 1.7
<i>ECV</i>	25 ± 3.8 ^t	4 ± 1 ^t	5 ± 0.8 ^t	118 ± 11.2 ^t	22 ± 2	28 ± 1.7

C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable; DPN: día post natal; t: tiempo; D: distancia; BA: brazos abiertos; BC: brazos cerrados; Ent: entradas. Los resultados están expresados en promedio ± esm y analizados por ANOVA de 2 vías para el DPN 51 y *t* de student para los machos del DPN65. La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ C vs ECV; ^A $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental

El conjunto de estos resultados sugiere que el estrés crónico variable durante la adolescencia afecta el comportamiento ansioso en hembras después de 2 semanas del periodo de estrés y en machos hasta las 4 semanas.

Efecto del ECV en las variables ponderantes y estado de los ejes HPA y HPT

El estrés crónico variable no afectó las variables ponderales de los animales de ambos sexos ni el peso de las grasas de las regiones evaluadas (Tabla 7).

En machos el ECV aumentó la expresión de *Gr* en PVN sin alterarse la de *Crh* y *Avp*, pero incrementó la concentración de corticosterona en suero (Tabla 7). En hembras la expresión de *Crh* y *Avp* en PVN fue menor que las ratas no estresadas y si bien, los niveles basales de corticosterona son superiores en las hembras que en los machos (Tabla 7) no hubo incremento por el estrés.

El ECV en machos disminuye la expresión de *Dio2* en el hipotálamo mediobasal (MBH), mientras que en hembras no se observaron diferencias por el estrés (Tabla 7). El ECV produjo cambios en la actividad basal del eje HPT en ambos sexos (Tabla 7). En machos y hembras

se observó una disminución de la expresión de *Trh* en PVN, aunque sólo en las hembras se observa un aumento en la concentración sérica de T3.

La reducción de consumo de alimento provocada por el ejercicio fue impuesta en los grupos sedentarios con alimentación pareada al ejercicio (PF) considerándolos controles experimentales; esta restricción de alimento provocó varios cambios que fueron comparados con los valores de los animales sedentarios con alimentación ad libitum tanto en grupo control como ECV. En los machos C-PF aumentó la concentración sérica de corticosterona y la expresión de *Npy* en el MBH; pero disminuyó la expresión de *Pomc* y *Trhde* y la concentración sérica de TSH. Para el caso de los machos ECV-PF disminuyó la expresión de *Crh* y *Avp* en el PVN, la de *Pomc* en MBH y la concentración sérica de TSH, pero aumentó la expresión de *Npy* y *Trhde* en MBH y la concentración sérica de corticosterona y T4. En las hembras C-PF se redujo la expresión de *Crh*, *Avp* y *Trh* en el PVN, pero aumentó la concentración sérica de T3; mientras que en las hembras ECV-PF se redujo la grasa total, la expresión de *Avp* en PVN, la de *Pomc* en MBH y la concentración sérica de TSH, pero aumentó la concentración sérica de corticosterona y la expresión de *Npy* en MBH (Tabla 7).

Tabla 7. Ganancia de peso corporal (GPC), consumo de alimento por día (CAD), peso de las grasas y estado de los ejes HPA y HPT en ratas C y ECV de ratas macho y hembra con alimentación ad libitum (N), con consumo de alimento pareado al ejercicio (PF) y ejercitados (Ex) después del periodo de ejercicio voluntario diario.

	C			ECV		
	N	PF	Ex	N	PF	Ex
Machos						
GPC (% de Peso inicial)	110±0.7	102±0.9*	99±2.9*	111±0.7	104±0.5*#	105±1.2*#
CAD (g)	26 ± 0.5	21 ± 0*	20 ± 1.4*	27 ± 1.0	22 ± 0*	22 ± 0.3*
Peso de grasa gonad (g)	6.5±0.5	6.5±1.0	4.8±0.8	5.9±0.8	7.1±0.6	5.0±0.5
Peso de grasa retro (g)	6.9±0.7	6.4±0.7	4.3±0.7	6.2±1.0	6.3±1.1	5.3±0.5
Peso de grasa interes (g)	1.1±0.2	1.4±0.3	1.0±0.3	1.2±0.2	1.1±0.1	0.9±0.2
<i>Crh</i> en PVN (%)	100±15	117±11	140±18	100±10	38±4.9*#	72±6.3#
<i>Ayp</i> en PVN (%)	100±10	106±8.7	76±8.2	85±9.3	34±5.6*#	80±12&
<i>Gr</i> en PVN (%)	100±13	135±11	78±17	151±12	160±13	125±14
Cort (ng/ml)	52±2.9	139±14*	25±4.0&	67±5.4	131±9.3*	120±6.2*#
<i>Pomc</i> en MBH (%)	100±4.3	86±2.4	137±7.5*#	96±5.6	64±7*	88±3.3#
<i>Npy</i> en MBH (%)	100±2.3	117±9	99±4.0	122±13	145±8.8#	164±4.2#
<i>Dio2</i> en MBH (%)	100±4.3	107±8.6	154±11*	76±7.5#	67±7.9#	64±8.0#
<i>Trhde</i> en MBH (%)	100±11	81±5.2	84±3.8	76±6.8	90±10	91±8.4
<i>Trh</i> en PVN (%)	100±9.4	86±11	124±20	61±6.6	34±8.5#	43±12#
TSH (ng/ml)	4.9±0.3	3.1±0.4*	2.7±0.3*	4.3±0.3	1.9±0.4*	2.9±0.5*
T4 (µg/dl)	3.6±0.1	3.2±0.6	3.9±0.2	3.5±0.3	5.4±0.2*#	4.5±0.2
T3 (ng/ml)	2.1±0.05	2.0±0.09	2.4±0.2	2.2±0.09	2.2±0.05	2.2±0.06
Hembras						
GPC (% de Peso inicial)	107±1.1 ^A	102±0.8*	101±0.7*	109±0.9	99±0.8*# ^A	96±1*# ^A
CAD (g)	21±0.7 ^A	14±0* ^A	14±0.5* ^A	20±0.6	15±0* ^A	14±1.3* ^A
Peso de grasa gonad (g)	4.2±0.3	3.5±0.6 ^A	2.1±0.4	4.5±0.3	3.3±0.4 ^A	3.2±0.6
Peso de grasa retro (g)	2.5±0.2 ^A	1.9±0.3 ^A	1.1±0.2 ^A	2.1±0.1 ^A	1.6±0.2 ^A	1.5±0.2 ^A
Peso de grasa interes (g)	1.1±0.2	1.3±0.3	0.5±0.1	1.3±0.2	1.1±0.1	1.1±0.2
<i>Crh</i> en PVN (%)	100±6.2	65±10*	97±13	56±9.2#	54±4.2	36±11 ^A
<i>Ayp</i> en PVN (%)	100±3.7	64±9.3 ^A	100±2.3	64±7.1#	43±3.7*	46±1.5#
<i>Gr</i> en PVN (%)	100±6.1	100±12	93±4.5	79±10 ^A	118±8.8	94±7.0
Cort (ng/ml)	210±8.2 ^A	451±11* ^A	103±7.3*#& ^A	194±5.2 ^A	547±6.3*# ^A	495±9.4*#& ^A
<i>Pomc</i> en MBH (%)	100±9.7	97±3.3	175±10*#&	102±4.6	84±4.4	90±8.5#
<i>Npy</i> en MBH (%)	100±6.7	106±6.2	112±12	89±4.3	137±7.7*	130±10
<i>Dio2</i> en MBH (%)	100±9.1	96±5.9	95±13 ^A	77±13	82±3.8	73±6.7
<i>Trhde</i> en MBH (%)	100±7.9	101±9.1	113±9.6	112±13	94±10	107±5.4
<i>Trh</i> en PVN (%)	100±4.6	53±2.4*	66±9.0 ^A	55±3.3	54±7.1	73±8.9
TSH (ng/ml)	2.2±0.2 ^A	1.9±0.2	1.3±0.1 ^A	1.8±0.2 ^A	1.0±0.2	1.8±0.2
T4 (µg/dl)	3.6±0.3	3.8±0.2	3.8±0.3	4.4±0.4	5.4±0.4	4.8±0.2
T3 (ng/ml)	2.1±0.06	2.4±0.07	2.1±0.09	2.5±0.08	2.4±0.02	2.3±0.07

Para los datos de expresión de genes, estos fueron calculados como porcentaje de los valores medios de C-N. Los resultados están expresados en promedio ± esm y analizados por ANOVA de 3 vías (Anexo 7A). La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ N vs PF o Ex. &: $P < 0.05$ PF vs Ex. #: $P < 0.05$ C vs ECV. ^A: $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental.

VARIABLES PONDERANTES Y ACTIVIDAD FÍSICA DURANTE EL PERIODO DE EJERCICIO

Similar a lo observado con los animales estresados por aislamiento, el ejercicio voluntario redujo el consumo de alimento de los animales control y ECV comparado a sus respectivos grupos con alimentación *ad libitum*, 25 % en los machos C-Ex, 18% en ECV-Ex; en las hembras la reducción fue del 26% en el grupo C-Ex y del 28% en el grupo ECV-Ex; esta reducción en el consumo de alimento produjo una menor ganancia de peso corporal en los animales CP (Tabla 7). El ECV indujo ganancia de peso corporal en los machos ECV-Ex, mientras que en los C-Ex hay una ligera pérdida (Tabla 7); en cambio, las hembras de ambos grupos ejercitados perdieron peso, inclusive las hembras ECV-CP (Tabla 7). Al igual que en el experimento de aislamiento, las hembras realizaron más ejercicio que los machos (Figura 20), sin cambios por el estrés en ninguno de los dos sexos.

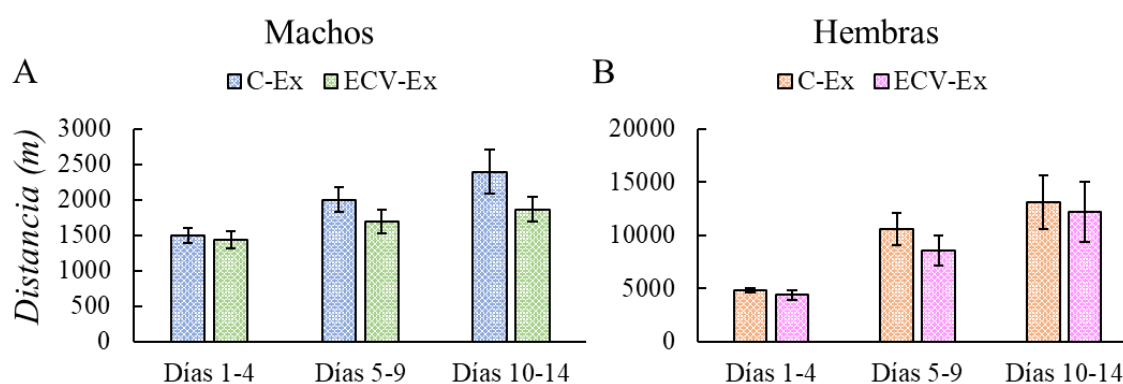


Figura 20. Efecto del ECV durante la adolescencia en la actividad física de ratas macho (A) y hembra (B). Los resultados están expresados en promedio \pm esm.

El ejercicio voluntario diario produjo una reducción de la grasa en los machos de ambos grupos experimentales, aunque este no fue significativo (Figura 21A). Se observó una correlación negativa entre el peso de la grasa gonadal y el ejercicio realizado en el grupo C-Ex, aunque no alcanzó significancia ($r = -0.804$, $P = 0.196$; Anexo 7); caso contrario en los machos ECV-Ex que muestran una correlación positiva entre el peso de la grasa gonadal con respecto al ejercicio realizado ($r = 0.953$, $P = 0.012$; Anexo 7). Las hembras tuvieron una disminución del peso de las grasas en el grupo C-Ex, siendo significativa en la grasa interescapular; sin embargo, en los animales ECV-Ex no se observó este efecto (Figura 21B).

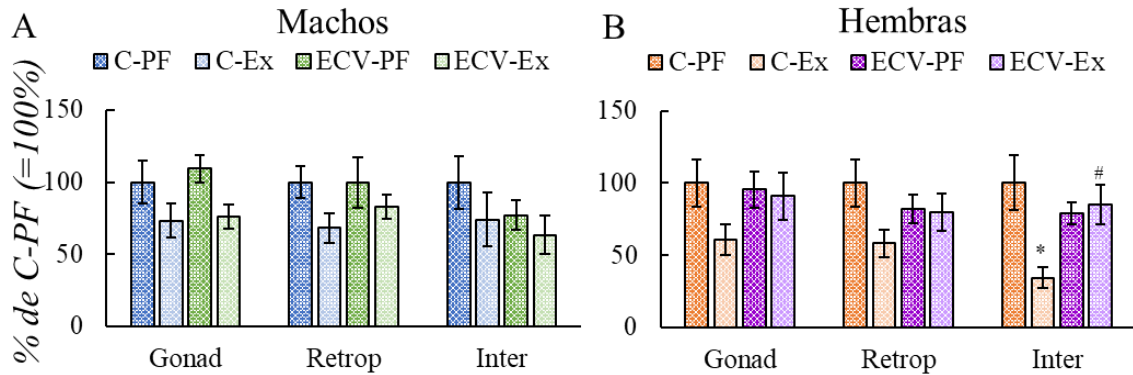


Figura 21. Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en el peso del tejido adiposo blanco de diferentes regiones de ratas macho (A) y hembra (B). Peso de la grasa gonadal (Gonad), retroperitoneal (Retrop), interescapular (Inter). Los resultados están expresados en promedio \pm esm (n=5-6) y analizados por ANOVA de 3 vías (Anexo 7B). La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ PF vs Ex. #: $P < 0.05$ C vs ECV. C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario diario.

Respuesta del eje HPA al ejercicio voluntario y al estrés crónico variable durante la adolescencia

El ejercicio voluntario diario produjo una disminución de la concentración sérica de corticosterona del grupo control en ambos sexos sin observarse cambios en el grupo sometido a estrés crónico variable, pero si se observan diferencias en la expresión de genes en PVN asociados a la actividad del eje HPA con respecto al ejercicio voluntario diario y al estrés. El estrés crónico variable disminuyó la expresión de *Crh* y *Avp* en los machos ECV-PF, mientras que el ejercicio voluntario incrementó la expresión de *Avp* en los machos ECV-Ex (Figura 22A). En las hembras C-Ex también aumentó la expresión *Avp*, pero no hubo cambios en el grupo ECV y no se observaron efectos por el ejercicio voluntario diario (Figura 21B).

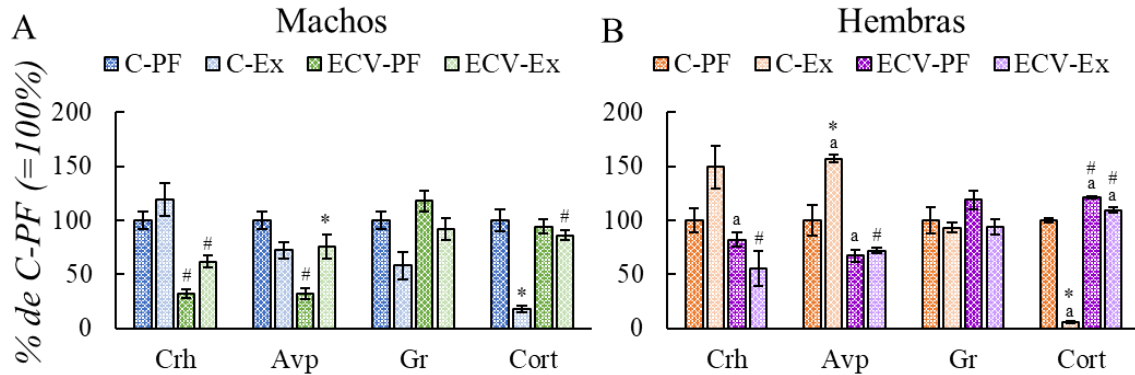


Figura 22. Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales de ratas macho (A) y hembra (B). Los resultados están expresados en promedio \pm esm (n=5-6) y analizados por ANOVA de 3 vías (Anexo 7B). La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ PF vs Ex. #: $P < 0.05$ C vs ECV. ^a: $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental. C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario diario.

Respuesta del eje HPT al ejercicio voluntario diario y al estrés crónico variable durante la adolescencia

La expresión de los elementos reguladores que se encuentran en el hipotálamo mediobasal se vio afectada por el estrés crónico variable y el ejercicio voluntario diario. La expresión de *Pomc* en los machos ejercitados de ambos grupos experimentales, aunque este incremento sólo fue significativo en los machos C-Ex; así mismo, sólo en este grupo incrementó la expresión de *Dio2*, mientras que el estrés disminuyó la expresión de este gen (Figura 23A). Se observó una correlación positiva entre la expresión de *Pomc* y el ejercicio realizado en las ratas ECV-Ex, aunque no es significativa ($r = 0.924$, $P = 0.076$; Anexo 7). En hembras, sólo la expresión de *Pomc* sólo incrementó en el grupo C-Ex (Figura 23B), pero se observó una correlación con tendencia positiva entre la expresión de *Dio2* y el ejercicio realizado en este mismo grupo ($r = 0.994$, $P = 0.072$; Anexo 7).

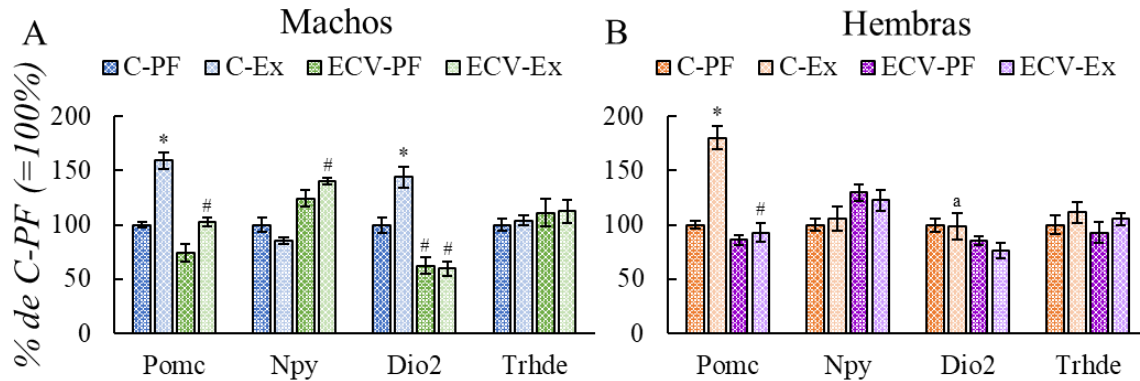


Figura 23. Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en los elementos reguladores del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides en el hipotálamo mediobasal de ratas macho (A) y hembra (B). Los resultados están expresados en promedio \pm esm (n=5-6) y analizados por ANOVA de 3 vías (Anexo 7B). La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ PF vs Ex. #: $P < 0.05$ C vs ECV. a: $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental. C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario diario.

El ejercicio aumentó la expresión de *Trh* en PVN (sin ser significativo) de machos C-Ex sin observarse cambios en la concentración sérica de TSH, T4 y T3, mientras que el estrés crónico variable disminuyó la expresión de *Trh* en PVN y aumentó la concentración sérica de T4 (Figura 24A). La concentración sérica de T4 de los animales ECV-Ex correlacionan positivamente con respecto al peso de la grasa gonadal ($r = 0.939$, $P = 0.018$; Anexo 7). En hembras no se observaron cambios en la actividad del eje HPT por parte del ejercicio voluntario diario y el estrés, aunque si hubo una disminución en la concentración sérica de TSH en las hembras ECV-PF (Figura 24B). El grupo ECV-Ex mostró una correlación positiva entre la concentración sérica de T3 y el peso de la grasa interescapular ($r = 0.947$, $P = 0.015$; Anexo 7), además la concentración sérica de T4 tiende a correlacionar negativamente con el ejercicio realizado ($r = -0.923$, $P = 0.077$; Anexo 7).

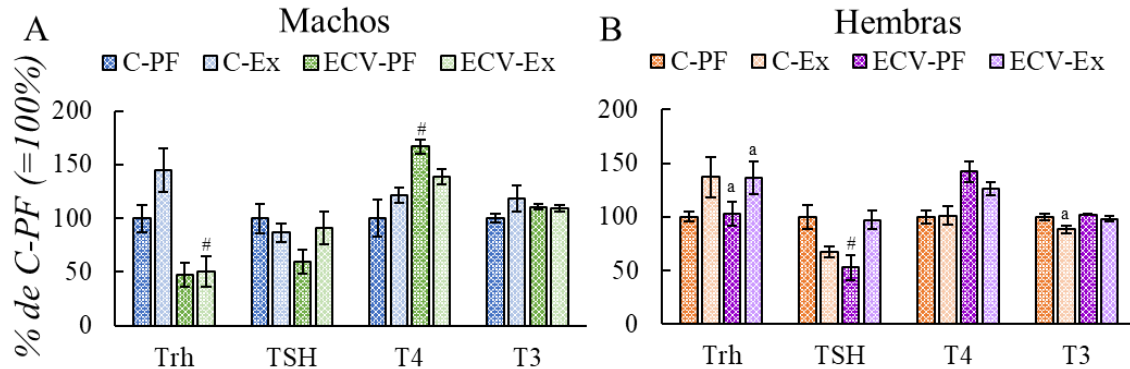


Figura 24. Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroidea de ratas macho (A) y hembra (B). Los resultados están expresados en promedio \pm esm (n=5-6) y analizados por ANOVA de 3 vías (Anexo 7B). La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ PF vs Ex. #: $P < 0.05$ C vs ECV. a: $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental. C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario diario.

En este experimento se procedió a determinar los niveles de expresión de *Dio2* y otros genes que regulan el metabolismo energético (*Pparg*, *Hsl*) y que son regulados a nivel transcripcional por hormonas tiroideas (*Adrb3*, *Pgc1a*, *Ucp1*) en tejido adiposo blanco, músculo esquelético y tejido adiposo pardo con la finalidad de tener una mayor interpretación del efecto del ejercicio en la actividad del eje tiroideo.

El tejido adiposo visceral es un tejido metabólicamente activo debido a su sensibilidad a la respuesta lipolítica de las catecolaminas (Ibrahim, 2010); el ejercicio promueve el pardeamiento de este tejido al inducir la biosíntesis de mitocondrias (Lehning et al., 2019). En machos, el ejercicio voluntario produjo un aumento en la expresión de *Adrb3*, *Dio2* y *Pparg* en ambos grupos experimentales, aunque este incremento fue menor en los machos ECV; por otra parte, el estrés crónico variable redujo la expresión de todos los genes evaluados en este tejido (Figura 25A). Las hembras ejercitadas de ambos grupos mostraron un comportamiento similar al de los machos (Figura 25B), excepto que hubo un incremento en la expresión de *Pparg* por parte de las hembras ECV-PF cuando se compara con el grupo C-PF.

El músculo esquelético participa activamente en el ejercicio (Hawley et al., 2014) y es uno de los principales órganos blanco de hormonas tiroideas (Mullur et al., 2014; Bloise et al., 2018). Se midió la expresión de los genes *Dio2* y *Pgc1a* en músculo gastrocnemius, ya que

contiene una combinación de fibras musculares de contracción rápida y contracción lenta, lo que permite el uso eficiente de los sustratos energéticos (Bloise et al., 2018). El ejercicio promovió la expresión de *Pgc1a* en los machos control, mientras que los machos ECV no se observaron diferencias (Figura 25C). De manera similar a los machos, en las hembras el ejercicio incrementó la expresión *Pgc1a* en las hembras control y ECV, aunque sólo fue significativo en el grupo control (Figura 25D).

La expresión de genes que responden a hormonas tiroideas en el tejido adiposo pardo fue alterada por el ejercicio en los animales control; en machos incrementó la expresión de *Ucp1* (Figura 25E), pero no en los ECV-Ex. En las hembras control también aumentó la expresión de *Adrb3* y de *Ucp1* (esta última no fue significativa), que en cambio el ECV-PF mostró un aumento en la expresión de *Adrb3* sin verse afectada la expresión de los otros genes evaluados; caso contrario en las hembras ECV-Ex donde aumentó la expresión de *Dio2*, sin cambios en la de *Adrb3* y *Ucp1*, aunque hay una correlación con tendencia positiva en la expresión de este último y el ejercicio realizado ($r= 0.994$. $P= 0.070$; Anexo 7).

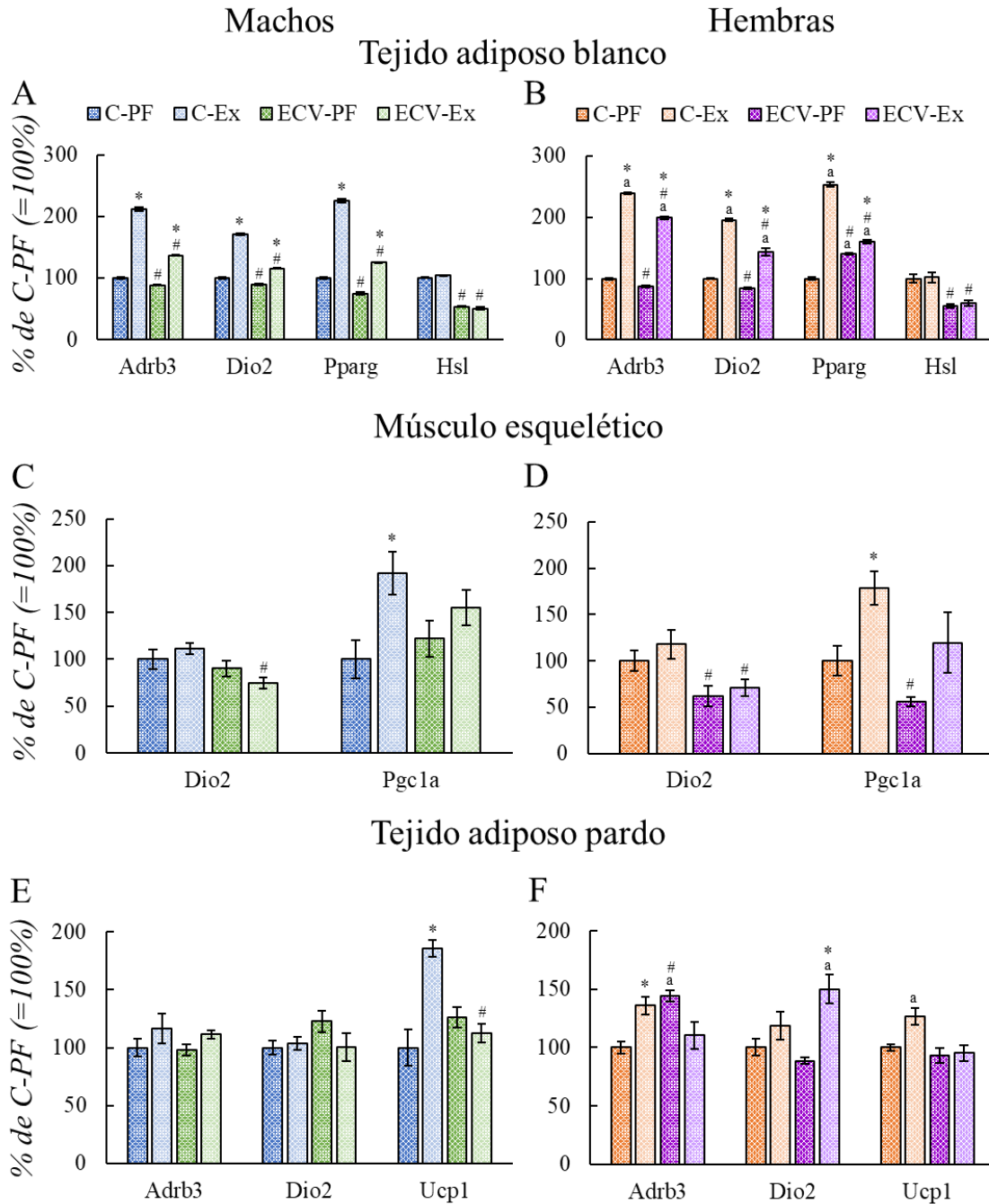


Figura 25. Efecto del ECV durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en la expresión de genes que responden a hormonas tiroideas en el tejido adiposo blanco de la región gonadal (A y B), músculo esquelético gastrocnemius (C y D) y tejido adiposo pardo interescapular (E y F) de ratas macho y hembra. Los resultados están expresados en promedio \pm esm (n=5-6) y analizados por ANOVA de 3 vías (Anexo 7B). La diferencia entre medias se evaluó mediante la prueba de Holm-Sidak ($\alpha = 0.05$). *: $P < 0.05$ PF vs Ex. #: $P < 0.05$ C vs ECV. ^a: $P < 0.05$ Machos vs Hembras del mismo grupo experimental. C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo sometido a ejercicio voluntario diario.

El conjunto de estos resultados apoya un efecto inhibitorio del estrés percibido durante la adolescencia sobre la actividad basal del eje y su respuesta al ejercicio voluntario cuya intensidad depende del sexo.

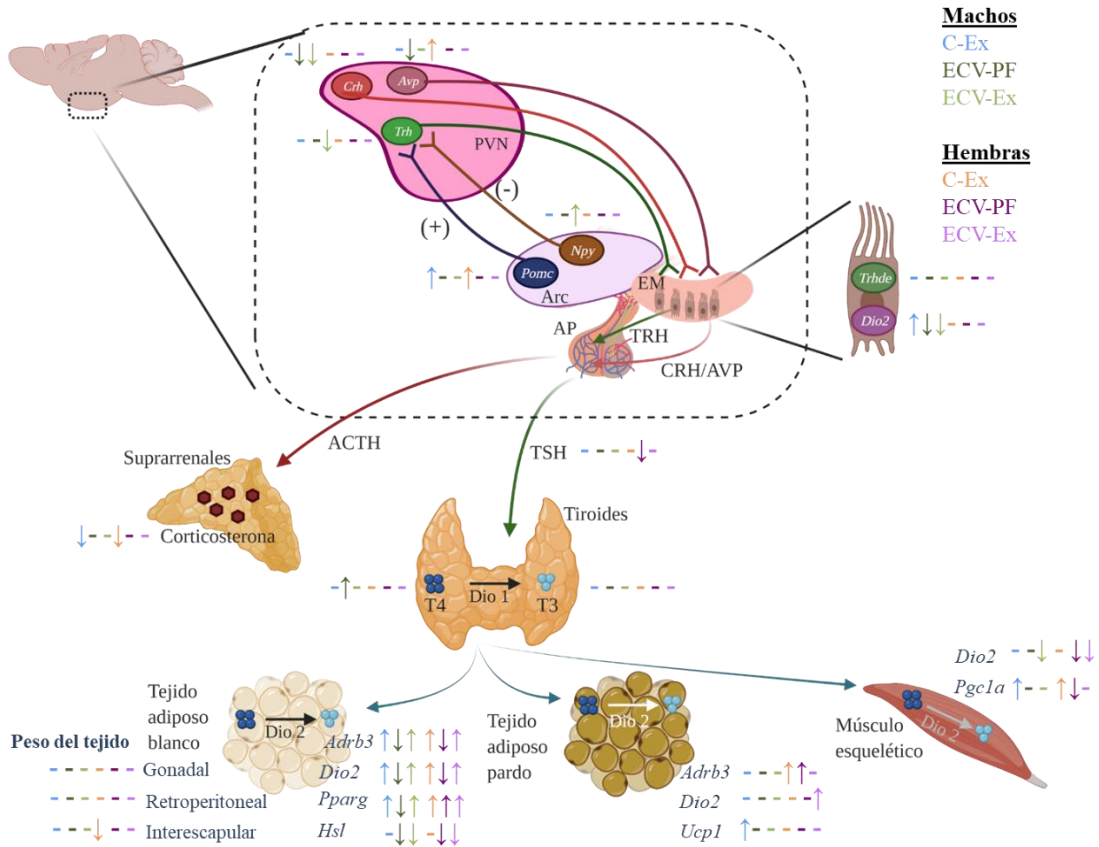


Figura 26. Esquema general de los efectos del estrés crónico variable durante la adolescencia y el ejercicio voluntario diario en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides y sus elementos reguladores. C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable durante la adolescencia; PF: grupo sedentario con alimentación pareada al ejercicio; Ex: grupo con ejercicio diario; PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo; Arc: núcleo arcuato; EM: eminencia media; AP: pituitaria anterior. Las flechas indican incremento o decremento, mientras que los guiones indican que no hay cambios en cada grupo experimental comparado con el grupo C-PF de cada sexo.

Discusión

El estado del desarrollo de los animales se ve influenciado por las respuestas fisiológicas, neurobiológicas y de comportamiento a un estresor. El estrés durante etapas críticas como la gestación, la lactancia o la adolescencia causa alteraciones que perduran hasta la etapa adulta e incluyen una reprogramación en la retroalimentación negativa del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA) y una respuesta inadecuada ante situaciones de estrés (Romeo et al., 2016). El objetivo de este trabajo fue evaluar si el estrés durante la adolescencia afectaba la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) a una demanda energética lo cual fue demostrado parcialmente en el paradigma de estrés crónico por aislamiento y ejercicio alternado (Protocolo 1; Anexo 5), pero con mayor precisión en el paradigma de estrés crónico variable y ejercicio diario (Protocolo 2).

El estrés crónico durante la adolescencia provoca cambios neurológicos en áreas involucradas en el comportamiento de los individuos (McCormick & Mathews, 2010; Hollis et al., 2013); las hembras son más propensas a tener depresión, comportamiento ansioso y problemas de aprendizaje (Bale & Epperson, 2015). La respuesta al estrés del animal adolescente difiere de la del adulto ya que se ha observado que, ante un estrés agudo, las ratas adolescentes presentan una respuesta del eje HPA exagerada y tardan más tiempo en regresar a los niveles basales de corticosterona que las adultas (Romeo et al., 2016); esto mismo ocurre cuando se aplica un nuevo estresor (exposición al frío) después de un periodo de estrés homotípico (restricción de movimiento) (Castillo-Campos et al., 2021), aunque la respuesta es similar entre adolescentes y adultos (Lui et al., 2012). El estrés heterotípico (como el estrés crónico variable), ampliamente estudiado en roedores adultos, no produce habituación, afecta múltiples conductas incluyendo reducción en el consumo de alimento, comportamiento ansioso y anhedonia (Willner, 2016; Castillo-Campos et al., 2021).

El aislamiento social es un modelo de estrés psicosocial que evita que los animales interactúen con sus semejantes por periodos prolongados (Fone & Porkess, 2008), en ratas adultas altera la respuesta del eje HPA que a su vez afecta las funciones neurológicas y el comportamiento (Cacioppo et al., 2015). Si el aislamiento se inicia desde la etapa adolescente disminuye la maduración de las conexiones límbicas y corticales que deben ocurrir durante esta etapa, lo que puede causar cambios en la conducta de los roedores y un mal

funcionamiento en el mecanismo de retroalimentación negativa por parte del sistema límbico, reflejado en una hiper-respuesta al estrés en la etapa adulta (McCormick et al., 2017).

El paradigma de estrés crónico variable (ECV) consiste en exponer a los animales a una serie de estresores una o dos veces al día, por un periodo de 10-24 días. En el presente trabajo, se comprobó la mayor susceptibilidad de las hembras que, tras dos semanas de estrés, presentaron un comportamiento ansioso en las distintas pruebas conductuales efectuadas, como campo abierto y laberinto elevado de cruz. Los machos en cambio presentaron comportamiento ansioso después de cuatro semanas. Estos resultados fueron similares a lo reportado en ratas macho y hembra expuestas a 12 días de estrés crónico variable entre los días postnatales 37 a 49, donde además las ratas hembra presentaron un menor consumo de sacarosa y un comportamiento depresivo (Bourke & Neigh, 2011). La habituación, una forma de aprendizaje no asociativo caracterizado por una disminución en la magnitud de la respuesta a un estímulo dado como resultado de la exposición repetida del mismo (McCarty, 2016), en roedores se puede evaluar a través de la exposición repetida a una prueba de ansiedad no condicionada como la prueba de campo abierto (Rojas-Carvajal & Brenes, 2020). El ECV provocó una mayor locomoción en las hembras cuando las ratas se sometieron a la prueba en la 4 semana de estrés, sugiriendo un efecto contrario a la habituación, denominado sensibilización (aumento en la respuesta). Según el tipo de estrés se puede afectar el aprendizaje no asociativo de las ratas adolescentes dependiendo del sexo, ratas macho aisladas durante la adolescencia (día postnatal, DPN 28 a 70) muestran sensibilización al campo abierto en comparación a los animales mantenidos en grupo (Brenes et al., 2009).

El estrés puede modificar el consumo de alimento de los individuos, aumentándolo o disminuyéndolo (Maniam & Morris, 2012; Schulz & Leassle, 2012). Ratas macho adultas sometidas a 14 días de restricción de movimiento o de ECV disminuyen la ingesta de alimento y la ganancia de peso corporal, pero no la proporción de grasa corporal (Uribe et al., 2014; Castillo-Campos et al., 2021). La adolescencia representa un periodo de crecimiento importante acompañado con un incremento de la ingesta de alimento, en este trabajo el aislamiento social no tuvo efectos en la conducta alimentaria, en cambio las hembras sometidas a ECV comieron más las últimas dos semanas del periodo de adolescencia, pero sin aumentar el peso corporal; mientras que los machos tuvieron una ligera disminución.

Como ha sido reportado (Uribe et al., 2014; Cavalcanti-de-Albuquerque & Donato, 2021), el ejercicio disminuye el consumo de alimento en aproximadamente 20% del consumo de los animales control con alimentación *ad libitum* en machos y alrededor de un 30% en hembras; el estrés afectó ligeramente a los machos disminuyendo su consumo alrededor del 16 al 18%, mientras que en hembras no se observaron efectos por el estrés. Al sacrificio, la restricción calórica impuesta a los animales con alimentación pareada al ejercicio causó una disminución en la ganancia de peso a los animales de ambos sexos, pero el ECV atenuó esta disminución en machos mientras que en las hembras esta pérdida fue mayor, aunque no se observó pérdida de grasa.

Como una medida de control se evaluaron los cambios hormonales y en la expresión génica del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales, estos fueron analizados al término del periodo de ejercicio en la etapa adulta. Para evaluar el grado de estrés percibido se cuantificaron los niveles de corticosterona en suero y de los RNAm de *Crh*, *Avp* y *Gr* en núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). La comparación entre los controles con alimentación *ad libitum* nos permite ver el efecto aislado del estrés o la dieta en estado basal. Como ha sido reportado por múltiples autores, la respuesta del eje HPA al estrés difirió entre machos y hembras (revisado en Heck & Handa, 2019), los machos presentaron un incremento en corticosterona sérica, mientras que las hembras mostraron una disminución en la expresión de *Crh* y de *Avp* en el PVN. El aumento en la concentración basal de corticosterona se ha visto en ratas macho y hembra cuando son sometidos a un protocolo de estrés por dos semanas al final de la adolescencia (machos: DPN 50 a 64; hembras: DPN 45 a 58) sin observarse diferencias en la expresión de *Crh* en PVN para ambos sexos (Jankord et al., 2011; Wulsin et al., 2016), pero si una disminución en la expresión de *Avp* en hembras, sugiriendo una disminución en la regulación central del eje (Wulsin et al., 2016), lo cual coincide con nuestros resultados. Aunque se han visto inconsistencias entre diferentes reportes (Cotella et al., 2020), nuestros animales fueron sometidos al paradigma de ejercicio dos semanas después de terminar el ECV lo que explicaría las pocas alteraciones encontradas entre los animales control y EVC sedentarios con alimentación *ad libitum* y apoya que los efectos encontrados son debidos al efecto duradero del estrés crónico en la respuesta a un nuevo estresor, como puede ser el ejercicio.

La restricción de alimento en el grupo pareado provocó el incremento esperado de la concentración sérica de corticosterona (Levy et al., 2010; Uribe et al., 2014) tanto en machos como en hembras; este aumento fue mayor por la restricción de alimento que por el estrés previo. Los machos C-PF no tuvieron cambios en la expresión de *Crh* y *Avp* en PVN, ni de *Pomc* en el núcleo arcuato, en contraste con las hembras que presentan expresión disminuida de *Crh* y *Avp* tanto por restricción calórica como por ECV. Algunos de los efectos producidos por la restricción de alimento fueron preservados en animales previamente estresados, pero otros como la expresión de *Avp* disminuyeron aún más. La disminución de la expresión de *Crh* en PVN por restricción de alimento ya ha sido reportada (Jaimes-Hoy et al., 2008; de Gortari et al., 2009); se sugiere que puede ser una respuesta fisiológica compensatoria ante la falta de alimento ya que CRH también se considera como un péptido anorexigénico (Brady et al., 1990), aunque también puede ser un efecto por el aumento de corticosterona circulante. Hasta el momento no se han encontrado trabajos donde relacionen la expresión de *Avp* y restricción de alimento.

Los otros elementos analizados que intervienen en la homeostasis energética como la expresión de péptidos en el hipotálamo mediobasal o los parámetros del eje HPT, respondieron como lo reportado en machos en condiciones de balance energético negativo: disminución en la expresión de *Pomc* y aumento en *Npy* (Brady et al., 1990), efectos aumentados en la combinación de ECV y restricción de alimento en los machos, mientras que en las hembras ECV-PF sólo se observó el aumento de la expresión de *Npy*. Consistente con observaciones previas, el estrés inhibió la expresión de *Trh* en machos, más aún con restricción de alimento, mientras que TSH disminuyó en el grupo PF; en hembras la expresión de *Trh* disminuyó tanto por restricción de alimento como por ECV con o sin restricción y TSH solo con ECV y PF. En ambos sexos se detectó un incremento en los niveles circulantes de T4 en los ECV-PF que pudiera explicarse por el efecto del estrés en la inhibición de la desiodasa impidiendo su transformación a T3 (Bianco et al., 1987).

En conjunto, los resultados apoyan una respuesta adecuada de los animales experimentales ya que se reproducen los cambios reportados causados por estrés o por restricción de alimento; algunas diferencias con reportes previos pueden deberse a la dinámica de las respuestas por los diferentes tiempos evaluados en la restricción de alimento. También es

importante enfatizar que en diversos trabajos utilizan machos y hembras considerando a la etapa adolescente igual en ambos sexos (desde el DPN 28 al 60) que, en la mayoría de los casos, los machos están en la mitad de la adolescencia (Schneider, 2013) causando confusión al momento de concluir.

Podemos afirmar que el estrés previo al periodo de ejercicio acentuó los cambios provocados por la restricción de alimento. Los resultados confirman lo reportado en ratas macho bajo restricción de alimento o estrés, ya que en hembras hay muy pocos estudios; también se reprodujo la mayor sensibilidad de hembras adolescentes al estrés. Confirman además lo reportado por nuestro grupo sobre la importancia de incluir al animal pareado para un buen análisis de los efectos del ejercicio voluntario en la actividad de las respuestas de los ejes (Uribe et al., 2014, Parra-Montes de Oca et al., 2019, Jaimes-Hoy et al., 2021).

Respuesta al ejercicio

La vida de los roedores de laboratorio, caracterizada por ambientes controlados, difiere de las condiciones naturales; estos ambientes son de espacios reducidos con poca posibilidad de actividad física, lo que provoca problemas metabólicos (Martin et al., 2010). El modelo de ejercicio voluntario en rueda es útil para estudio pues correr es un impulso natural de los roedores y permite comparar la fisiología de un animal sedentario con uno activo (Greenwood & Fleshner, 2019). El ejercicio voluntario puede considerarse como un estresor ya que aumenta los niveles séricos de glucocorticoides; sin embargo, este es mucho menos estresante que el ejercicio obligado de correr en banda o nadar (Chen et al., 2017). Aunque ocurra un aumento en los glucocorticoides, el ejercicio crónico produce efectos benéficos al aumentar la plasticidad funcional en el hipocampo y la corteza prefrontal, en contraste con el estrés crónico que causa reducción en la densidad dendrítica y en las espinas sinápticas (Wellman et al., 2020; Woo et al., 2021); además, el ejercicio favorece la liberación de dopamina en la corteza prefrontal media amortiguando los efectos adversos de los glucocorticoides (Chen et al., 2017).

El efecto más evidente de éxito del ejercicio es la disminución de grasa corporal, siendo la grasa subcutánea la que más se utiliza (Laurens et al., 2020). La lipólisis en el tejido adiposo blanco ocurre bajo la señalización del sistema adrenérgico y las hormonas tiroideas (Mullur et al., 2014, Zhu et al., 2019). El efecto lipolítico contrarresta el efecto lipogénico de los

glucocorticoides que prevalece cuando la exposición constante por estrés crónico activa la síntesis y acumulación de lípidos, particularmente en el área abdominal (de Kloet & Herman, 2018). Aunque las ratas con acceso a la rueda en días alternados corrieron una distancia similar a las ratas con acceso diario a la rueda, no se observó una pérdida significativa de grasa en las tres regiones evaluadas ni presentaron alguna alteración en el eje HPT; en contraste con los machos con ejercicio diario quienes tampoco se observó una pérdida significativa de las tres regiones de grasa evaluada, pero si hubo una correlación negativa del tejido adiposo gonadal y la cantidad de ejercicio realizado, similar a lo reportado (Uribe et al., 2014); caso contrario en los animales ECV en donde esta correlación fue positiva en los machos. Por estas razones y para facilitar la discusión y hacerla más fluida, discutiremos sólo los resultados de ECV, la discusión de los resultados de aislamiento se encuentra más detallada en la publicación anexa (Anexo 4).

El ejercicio incrementa los niveles de corticosterona en sangre sin afectar la expresión de *Crh* y *Gr* en el PVN (Stranahan et al, 2006; Chen et al., 2017); sin embargo, después de 14 días de ejercicio durante la fase activa de las ratas, los niveles basales de corticosterona disminuyen en comparación con sus controles sedentarios (Uribe et al., 2014). La actividad del eje HPA se afectó por el ECV disminuyendo la expresión *Crh* y *Avp* en el PVN de machos, pero aumentando la expresión de *Avp* en los machos ECV-Ex, caso contrario en las hembras donde se observó un ligero aumento en la expresión de *Crh* sólo en las C-Ex. Las diferencias sexuales en la respuesta del eje HPA coincide con la mayor respuesta de las hembras a diversos tipos de estrés; en las ratas hembra se ha observado una mayor expresión de *Crh* y *Avp* en PVN, en parte debido la menor presencia de GR responsable de la inhibición por retroalimentación negativa, además de que podrían intervenir otros mecanismos como los cambios por la presencia de esteroides sexuales (Heck & Handa, 2019).

La región que comprende el hipotálamo mediobasal engloba al núcleo arcuato del hipotálamo (Arc) y la eminencia media. En este trabajo se evaluó la expresión de algunos genes que regulan la actividad del eje HPT como *Pomc*, *Npy*, *Dio2* y *Trhde*. En el Arc existen diversos tipos de neuronas que expresan pro-opiomelanocortina (POMC) que se distinguen por diferencias en la coexpresión de receptores y otros neuromoduladores (Toda et al., 2017) lo que explica las distintas funciones que presentan los péptidos derivados de este precursor

liberados en otras regiones del hipotálamo. Entre las funciones reportadas están el de incrementar el gasto energético y reducir el consumo de alimento (Mineur et al., 2011). Esto último coincide con el aumento de expresión de *Pomc* por ejercicio diario en ratas normales (estos resultados y Jiaxu & Weiyi, 2000); notablemente, aún en los machos ECV se detectó incremento, aunque en menor proporción pese a que los animales ECV corrieron una distancia similar. La expresión del neuropéptido Y (NPY) incrementa en situaciones de déficit energético (Brady et al., 1990); durante el ejercicio se detectan incrementos después de varias semanas cuando el consumo de alimento también se incrementa (Bi et al., 2003); sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de *Npy* ni en los animales control o ECV de ambos sexos, por lo que 2 semanas de ejercicio en la fase activa no son suficientes para causar alteraciones en la expresión de este gen.

El eje HPT está sujeto a múltiples efectores metabólicos, hormonales y neuronales que regulan su actividad a múltiples niveles. Los cambios dinámicos de los parámetros del eje HPT depende del tipo de estímulo, como por ejemplo el frío, que puede provocar cambios rápidos y transitorios en la expresión de *Trh* en PVN (Zoeller et al., 1990; Uribe et al., 1993), así mismo, las vidas medias de TSH y T3 en suero son cortas (de minutos a horas) en comparación con T4 en suero (Chatzitomaritis et al., 2017). La concentración de T3 depende además de la actividad de las desiodasas en los tejidos y también está diferencialmente regulada, por lo que la concentración de las hormonas tiroideas circulantes no representa cabalmente la actividad del eje en determinados momentos (Adballa & Bianco, 2014). A nivel hipofisiario, la liberación de TSH no depende sólo de la actividad de la neurona TRHérgica ya que la cantidad de TRH liberado puede disminuir por la actividad de la enzima que lo degrada, presente en tanicitos (Rodríguez-Rodríguez et al., 2019). Además, si hay un aumento en la actividad de Dio2 en los tanicitos, puede inducir un aumento en la concentración de T3 hipotalámico lo que pudiera producir inhibición en la síntesis de TRH y de TSH por retroalimentación negativa (Fekete & Lechan, 2014), pero también un aumento en la expresión de *Trhde* en la eminencia media (Sánchez et al., 2009), aunque la dinámica es desconocida. En base a estos diferentes puntos de regulación, es necesario evaluar tantas variables como sea posible.

Sólo se observaron tendencias en los cambios de la actividad de los parámetros del eje HPT, como los niveles de mRNA de TRH en PVN o T4 en suero, en los machos C-Ex, aunque las correlaciones positivas entre los niveles de hormonas tiroideas y ejercicio realizado, o negativas entre el peso de las grasas, apoyan la participación de estas hormonas (Uribe et al., 2014; Jaimes-Hoy et al., 2021). En los animales ECV se observaron diferencias en cuanto a la actividad y respuesta del eje HPT, los machos ECV mostraron una disminución de la expresión de *Trh* en PVN, mientras que en las hembras no se observa este efecto, posiblemente podrían estar interviniendo otros mecanismos que regulen la expresión de *Trh* a nivel del PVN en las hembras que puedan compensar los efectos deletéreos del estrés. El ECV aumentó en la concentración sérica de TSH en los animales ejercitados principalmente en las hembras, esto podría ser por el aumento que se produjo en la expresión de *Trh* y por tanto pudo haber una mayor liberación de este péptido; sin embargo, no se observaron cambios en la concentración sérica de T3 y T4 en los animales ECV de ambos sexos, un aumento en la concentración sérica de TSH sin variación en la concentración sérica de T4 y T3 podría estar relacionado con el hipotiroidismo subclínico.

Como se mencionó anteriormente, un efecto que se le atribuyen a las hormonas tiroideas es que promueven la lipólisis en el tejido adiposo blanco de forma sinérgica con el sistema nervioso simpático (Mullur et al., 2014). Durante el ejercicio las reservas de grasa de las cuales se tiene mayor acceso son las subcutáneas (Stanford et al., 2015); sin embargo, en estado de reposo, las reservas viscerales son las que proveen energía al organismo cuando se encuentra en déficit energético (Ibrahim, 2010). Como los animales al ser sacrificados en un periodo aproximado de 3 horas después del cambio de luz, se decidió evaluar los efectos que tienen las hormonas tiroideas y algunos efectos metabólicos en el tejido adiposo blanco de la región gonadal. Además, los machos ECV-Ex mostraron una correlación positiva entre la concentración sérica de estas hormonas y el peso del tejido adiposo blanco, lo cual pudiera deberse a una menor expresión del receptor adrenérgico β_3 ($Adr\beta_3$). El efecto lipogénico de las hormonas tiroideas se observa principalmente en el hígado (Sinha et al., 2018), aunque también se ha visto que en el tejido adiposo blanco hay un balance entre la lipogénesis *de novo* y la lipólisis mediada por las hormonas tiroideas (Mullur et al., 2014), este balance pudiera verse influenciados por algunos factores del estrés, como el aumento de la

concentración intracelular de glucocorticoides (de Kloet & Herman, 2018), que pueden inhibir la función de las hormonas tiroideas.

Al analizar la expresión de genes que responden a hormonas tiroideas (*Adrb3*, *Dio2*) o que están involucrados en el metabolismo energético (*Pparg*, *Hsl*) en el tejido adiposo blanco de la región gonadal se observó que el ejercicio diario aumentó la expresión de *Adrb3* en el tejido adiposo blanco de la región gonadal de ambos sexos, aunque en los animales ECV esta respuesta fue menor coincidiendo con lo reportado (Farias-Silva et al., 2004). La expresión de *Dio2* tuvo un patrón similar a la de *Adrb3*, sugiriendo que el estrés atenúa la expresión de estos genes. El receptor γ activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ) es un factor de transcripción que promueve la adipogénesis y lipogénesis en tejido adiposo blanco, sin embargo, el aumento en la expresión de este factor podría dar pie a la promoción de la biosíntesis de mitocondrias ya que se puede asociar a su coactivador 1α (PGC- 1α) lo que pudiera promover el gasto energético (Medina-Gomez et al., 2007). La expresión de *Pparg* aumentó en los animales control por efecto del ejercicio, este mismo efecto se ha observado en ratas macho adolescentes (45 días de edad) que realizaron ejercicio entre por 12 y 8 semanas en cinta para correr (Sertie et al., 2013). En el caso de los animales ECV, esta respuesta se vio atenuada teniendo un mayor impacto en las hembras. En este sentido, un estudio realizado en ratas macho adultas sometidas a 4 semanas a un protocolo de estrés crónico variable reporta una disminución en la expresión de *Pparg* en tejido adiposo blanco visceral al término del periodo de estrés y después de 5 semanas de recuperación independientemente de los niveles de corticosterona circulante (Pereira et al., 2016). Con respecto al balance entre la lipogénesis de novo y la lipólisis, una de las enzimas que participan en la lipólisis es la lipasa sensible a hormonas (HSL), la actividad de esta enzima está regulada por la cascada de señalización activada por $Adrb3$ y TSH (Gagnon et al., 2010; Zhu et al., 2019). En situaciones de demanda energética, como la restricción de alimento y el ejercicio, se promueve la movilización de las reservas de grasa. Al comparar los animales ejercitados y los PF, no se observan diferencias entre estos dos grupos, con excepción de los machos C-Ex que muestran un ligero aumento en la expresión de *Hsl* en tejido adiposo al comparar C-PF, caso que no ocurre en los animales estresados, sugiriendo que el estrés inhibe la expresión de este gen lo que podría derivar en una disminución en la lipólisis.

En el músculo esquelético, la *Dio2* permite la activación de T3 a partir de T4 a nivel de tejido (Gereben et al., 2008), mientras que *PGC-1 α* es un factor que participa en la biogénesis de mitocondrias y responde a T3 (Bocco et al., 2016). El ejercicio produjo un aumento en la expresión de *Pgc1a* en el músculo esquelético de los animales control de ambos sexos; este mismo efecto se ha observado en ratas macho de 12 semanas de edad sometidas a ejercicio forzado (banda de correr) con un entrenamiento previo en donde además se observó un incremento en la expresión de *Dio2* en músculo soleus y gastrocnemius (Bocco et al., 2016). La respuesta ineficiente del músculo causada por el estrés se puede deber al aumento de glucocorticoides circulantes inhibiendo la biosíntesis de mitocondrias (Picard et al., 2014). Los cambios observados en músculo nos permiten afirmar que las hormonas tiroideas actuaron como esperado en su tejido blanco.

El tejido adiposo pardo se ha considerado como un órgano que promueve el gasto energético por su participación en la termogénesis facultativa (Morrison et al., 2014), esto deriva a una mayor expresión de receptores adrenérgicos β y la proteína desacopladora 1 (UCP-1), los cuales son blanco de hormonas tiroideas (Mullur et al., 2014). La respuesta del tejido adiposo pardo al ejercicio es variable de acuerdo con la intensidad y tiempo del ejercicio. En ratas macho adultas, la expresión de *Adrb3* y *Ucp1* no se ven modificadas después de 10 min de ejercicio intenso (De Matties et al., 2013), mientras que el entrenamiento por 8 semanas produce un aumento en la expresión de estos genes. El ejercicio voluntario promueve la expresión de *Dio2* y *Ucp1* después de un periodo de 14 días, mientras que la restricción alimentaria disminuye dicha expresión (Uribe et al., 2014). En los machos C-Ex sólo aumentó en la expresión de *Ucp1*, mientras que en las hembras C-Ex aumentó la expresión de *Adrb3* y *Ucp1* (este último sin ser significativo), sugiriendo que el ejercicio diario promueve la actividad de las hormonas tiroideas y el gasto energético en tejido adiposo pardo por medio de la termogénesis. El efecto inhibitorio observado en los animales estresados se puede deber a un aumento de glucocorticoides a nivel local provocando una inhibición en la transcripción de *Ucp1* estimulada por la respuesta adrenérgica (Soumano et al., 2000; Martínez-deMena et al., 2016).

Conclusiones

El aislamiento social reduce la actividad basal del eje HPT y altera su respuesta al ejercicio voluntario alternado en la etapa adulta de una menara dependiente del sexo, inhibiendo la pérdida de grasa blanca en ratas macho, pero promoviendo la termogénesis facultativa en ratas hembra.

El estrés crónico variable durante la adolescencia disminuye la actividad del eje HPT e inhibe su respuesta al ejercicio voluntario diario en la etapa adulta, lo que pudiera evitar la pérdida de grasa blanca, además de que atenúa la expresión de genes que responden a hormonas tiroideas en tejidos blanco.

La inhibición de la respuesta del eje HPT al ejercicio causada por estrés durante la adolescencia sugiere ser una causa que contribuye al desarrollo de obesidad en la etapa adulta.

Perspectivas

-Dilucidar los mecanismos que influyen en la respuesta inhibitoria ocasionada por el estrés durante la adolescencia en los tejidos blanco de hormonas tiroideas y que estén involucrados en la respuesta del ejercicio voluntario (tejido adiposo blanco, músculo esquelético).

-Utilizando transcriptómica, evaluar la expresión diferencial de genes que se ven afectados por el estrés durante la adolescencia y el ejercicio voluntario en las neuronas TRHérgicas hipofisiotróficas del núcleo paraventricular del hipotálamo.

-Dilucidar los mecanismos que regulan la expresión de *Trh* en el núcleo paraventricular que pudieran verse afectados por el estrés durante la adolescencia y el ejercicio voluntario.

Referencias

- Abdalla SM, Bianco AC. (2014) Defending plasma T3 is a biological priority. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 81(5):633-641.
- Arakawa H. (2018) Ethological approach to social isolation effects in behavioral studies of laboratory rodents. *Behav Brain Res*. 341:98-108.
- Arrojo E Drigo R, Fonseca TL, Werneck-de-Castro JP, Bianco AC. (2013) Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1830(7):3956-3964.
- Bale TL, Epperson CN. (2015) Sex differences and stress across the lifespan. *Nat Neurosci*. 18(10):1413-1420.
- Bi S, Robinson BM, Moran TH. (2003) Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285(5):R1030-R1036.
- Bianco AC, Nunes MT, Hell NS, Maciel RMB. (1987) The role of glucocorticoids in the stress-induced reduction of extrathyroidal 3,5,3'-triiodothyronine generation in rats. *Endocrinology*. 120(3):1033-1038.
- Bloise FF, Cordeiro A, Ortiga-Carvalho TM. (2018) Role of thyroid hormone in skeletal muscle physiology. *J Endocrinol*. 236(1):R57-R58.
- Bocco BMLC, Louzada RAN, Silvestre DHS, Santos MCS, Anne-Palmer E, Rangel IF, Abdala S, Ferreira AC, Ribeiro MO, Gereben B, Carvalho DP, Bianco AC, Werneck-de-Castro JP. (2016) Thyroid hormone activation by type 2 deiodinase mediates exercise-induced peroxisome proliferator-activated-receptor- γ coactivator-1 α expression in skeletal muscle. *J Physiol*. 594(18):5255-5269.
- Bourke CH, Neigh GN. (2011) Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. *Horm Behav*. 60(1):112-20.
- Brabant G, Schwieger S, Knoeller R, Tegtbur U. (2005) Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in moderate and intense exercise. *Horm Metab Res*. 37:559-562
- Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M. (1990) Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology*. 52(5):441-447.
- Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J. (2009) A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res*. 197(1):125-137.
- Burton DA, Stokes K, Hall GM. (2004). Physiological effects of exercise. *Cont Educ Anaesth Crit Care Pain Med*. 4(6):185-188.
- Cacioppo JT, Cacioppo S, Capitanio JP, Cole SW. (2015) The neuroendocrinology of social isolation. *Annu Rev Psychol*. 66:733-767.

- Carbone DL, Zuloaga DG, Lacagnina AF, McGivern RF, Handa RJ. (2012) Exposure to dexamethasone during late gestation causes female-specific decreases in core body temperature and prepro-thyrotropin-releasing hormone expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Physiol Behav.* 108:6-12.
- Carobrez AP, Bertoglio LJ. (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 29:1193–1205.
- Casey BJ, Jones RM, Hare TA. (2008) The adolescent brain *Ann NY Acad Sci.* 1124:111-126.
- Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. (1985) Physical activity, exercise and physical fitness: Definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 100(2):126-131.
- Castillo-Campos A, Gutiérrez-Mata A, Charli JL, Joseph-Bravo P. (2021) Chronic stress inhibits hypothalamus-pituitary-thyroid axis and brown adipose tissue responses to acute cold exposure in male rats. *J Endocrinol Invest.* 44(4):713-723.
- Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Donato J Jr. (2021) Rolling out physical exercise and energy homeostasis: Focus on hypothalamic circuitries. *Front Neuroendocrinol.* 63:100944.
- Chatzitomaris A, Hoermann R, Midgley JE, Hering S, Urban A, Dietrich B, Abood A, Klein HH, Dietrich JW. (2017) Thyroid Allostasis-Adaptive Responses of Thyrotropic Feedback Control to Conditions of Strain, Stress, and Developmental Programming. *Front Endocrinol (Lausanne).* 8:163.
- 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.
- 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):581-585.
- Ciavardelli D, Bellomo M, Crescimanno C, Vella V. (2014) Type 3 deiodinase: role in cancer growth, stemness, and metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 5:215.
- Cotella EM, Morano RL, Wulsin AC, Martelle SM, Lemen P, Fitzgerald M, Packard BA, Moloney RD, Herman JP. (2020) Lasting Impact of Chronic Adolescent Stress and Glucocorticoid Receptor Selective Modulation in Male and Female Rats. *Psychoneuroendocrinology.* 112:104490.
- Crews F, He J, Hodge C. (2007) Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 86(2):189-199.
- de Gortari P, Mancera K, Cote-Vélez A, Amaya MI, Martínez A, Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P. (2009) Involvement of CRH-R2 receptor in eating behavior and in

the response of the HPT axis in rats subjected to dehydration-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology*. 34(2):259-272.

- de Kloet AD, Herman JP. (2018) Fat-brain connections: Adipocyte glucocorticoid control of stress and metabolism. *Front Neuroendocrinol*. 48:50-57.
- De Matties R, Lucertini F, Guescini M, Polidori E, Zeppa S, Stocchi V, Cinti S, Cuppini R. (2013) exercise as new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. *Nutr Metab Cardiovas*. 23:582-590.
- Díaz-Gallardo MY, Cote-Vélez A, Carreón-Rodríguez A, Charli JL, Joseph-Bravo P. (2010) Phosphorylated cyclic-AMP-response element-binding protein and thyroid hormone receptor have independent response elements in the rat thyrotropin-releasing hormone promoter: an analysis in hypothalamic cells. *Neuroendocrinology*. 91(1):64-76.
- Dishman RK, Berthoud H-R, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Gandevia SC, Gomez-Panilla F, Greenwood BN, Hillman CH, Kramer AF, Levin BE, Moran TH, Russo-Neustadt AA, Salome JD, Van Hoomisen JD, Wade CE, York DA, Zigmond MJ. (2006) Neurobiology of exercise. *Obesity*. 14(3):345-356.
- Eiland L, Ramroop J, Hill MN, Manley J, McEwen BS. (2012) Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 37(1):39-47.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. (2004) The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrin*. 25:132-149.
- Farias-Silva E, dos Santos IN, Corezola do Amaral ME, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. (2004) Glucocorticoid receptor and Beta-adrenoceptor expression in epididymal adipose tissue from stressed rats. *Ann N Y Acad Sci*. 1018:328-332.
- Fekete C, Lechan RM. (2014) Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev*. 35(2):159-194.
- Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, Beck-Sickinger A, Lechan RM. (2002) Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*. 143(12):4513-4519.
- Fone KCF, Porkess MV. (2008) Behavioral and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Behav Rev*. 32:1087-1102.
- Fortunato RS, Ignácio DL, Padron AS, Peçanha R, Marassi MP, Rosenthal D, Werneck-de-Castro JPS, Carvalho DP. (2008) The effect of acute exercise session on thyroid hormone economy in rats. *J Endocr*. 198:347-353.

- Gagnon A, Antunes TT, Ly T, Pongsuwan P, Gavin C, Lochnan HA, Sorisky A. (2010) Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels in vivo. *Metabolism*. 59(4):547-53.
- Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang S A, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC. (2008) Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*. 29(7):898-938.
- Greenwood BN, Fleshner M. (2019) Voluntary Wheel Running: A Useful Rodent Model for Investigating the Mechanisms of Stress Robustness and Neural Circuits of Exercise Motivation. *Curr Opin Behav Sci*. 28:78-84.
- Gutiérrez-Mariscal M, Sánchez E, García-Vázquez A, Rebolledo-Solleiro D, Charli J-L, Joseph-Bravo P. (2012) Acute response of hypophysiotrophic thyrotropin releasing hormone neurons and thyrotropin release to behavioral paradigms producing varying intensities of stress and physical activity. *Regul Pept*. 179:61-70.
- Hackney A., Viru M. (2016) Sports Physiology and Endocrinology (Endurance vs. Resistance Exercise). En: Vaamonde D., du Plessis S., Agarwal A. (eds) Exercise and Human Reproduction. Springer, New York, NY.
- Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjørbaek C, Elmquist JK, Flier JS, Hollenberg AN. (2001) Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest*. 107(1):111-20.
- Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. (2014) Integrative biology of exercise. *Cell*. 159:738-749.
- Heck AL, Handa RJ. (2019) Sex differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis' response to stress: an important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology*. 44(1):45-58.
- Helmreich DL, Tylee D. (2011) Thyroid hormone regulation by stress and behavioral differences in adult male rats. *Horm Behav*. 60(3):284-291.
- Herman JP, 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.
- Hollenberg AN, Monden T, Wondisford FE. (1995) Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J Biol Chem*. 270(24):14274-14280.
- Hollenberg AN. (2008) The role of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuron as a metabolic sensor. *Thyroid*. 18(2):131-139.
- Hollis F, Isgor C, Kabbaj M. (2013) The consequences of adolescent chronic unpredictable stress exposure on brain and behavior. *Neuroscience*. 249:232-241.

- Ibrahim MM. (2010) Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 11(1):11-18.
- Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ. (2004) Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus.* 14(5):636-648.
- Jaimes-Hoy L, Gutiérrez-Mariscal M, Vargas Y, Pérez-Maldonado A, Romero F, Sánchez-Jaramillo E, Charli J-L, Joseph-Bravo P. (2016) Neonatal maternal separation alters, in a sex-specific manner, the expression of TRH, of TRH-degrading enzyme in the rat hypothalamus, and the response of the thyroid axis to starvation. *Endocrinology.* 157(8):3253-3265.
- Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, de Gortari P. (2008) Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. *Horm Behav.* 53:366-377.
- 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(8):bqab110.
- Jaimes-Hoy L, Romero F, Charli J-L, Joseph-Bravo P. (2019) Sex dimorphic responses of the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid axis to maternal separation and palatable diets. *Front Endocrinol.* 10(445):1-16.
- Janani C, Kumari RBD. (2015) PPAR gamma gene--a review. *Diabetes Metab Syndr.* 9(1):46-50.
- Jankord R, Solomon MB, Albetz J, Flak JN, Zhang R, Herman JP. (2011) Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Neuroendocrinology.* 152(2):629-638.
- Jiaxu C, Weiyi Y. (2000) Influence of acute and chronic treadmill exercise on rat brain POMC gene expression. *Med Sci Sports Exerc.* 32(5):954-957.
- Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Charli J-L. (2015a) Regulation of TRH neurons and energy homeostasis. Related signals under stress. *J Endocrinol.* 224(3):R139-R159.
- 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.
- Joseph-Bravo P, Lazcano I, Jaimes-Hoy L, Gutierrez-Mariscal M, Sanchez-Jaramillo E, Uribe RM, Charli JL. (2020) Sexually dimorphic dynamics of thyroid axis activity during fasting in rats. *Front Biosci (Landmark Ed).* 25:1305-1323.
- Joseph-Bravo P., Jaimes-Hoy L., Rodríguez-Rodríguez A., Parra-Montes de Oca M., Uribe R.M., Charli JL. (2021) Multifactorial Regulation of the Activity of Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone Neurons. En: Grinevich V.,

Dobolyi Á. (eds) Neuroanatomy of Neuroendocrine Systems. Masterclass in Neuroendocrinology, vol 12. Springer, Cham.

- Juraska JM, Sisk CL, DonCarlos LL. (2013) Sexual differentiation of the adolescent rodent brain: hormonal influences and developmental mechanisms. *Horm Behav.* 64(2):203-210.
- Juraska JM, Willing J. (2017) Pubertal onset as a critical transition for neural development and cognition. *Brain Res.* 1654(Pt B):87-94.
- Kilburn-Watt E, Banati RB, Keay KA. (2010) Altered thyroid hormones and behavioural change in a sub-population of rats following chronic constriction injury. *J Neuroendocrinol.* 22(8):960-970.
- Kleinau G, Heyder NA, Tao YX, Scheerer P. (2020) Structural Complexity and Plasticity of Signaling Regulation at the Melanocortin-4 Receptor. *Int J Mol Sci.* 21(16):5728.
- Kvetnansky R, Lu X, Ziegler MG. (2013) Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems. *Adv Pharmacol.* 68:359-397.
- Larsen PR, Zavacki AM. (2012) The role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action. *Eur Thyroid J.* 1(4):232-242.
- Lee MJ, Pramyothin P, Karastergiou K, Fried SK. (2014) Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochim Biophys Acta.* 1842(3):473-481.
- Lehnig AC, Dewal RS, Baer LA, Kitching KM, Munoz VR, Arts PJ, Sindeldecker DA, May FJ, Lauritzen HPMM, Goodyear LJ, Stanford KI. (2019) Exercise Training Induces Depot-Specific Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. *iScience.* 11:425-439.
- Leussis MP, Andersen SL. (2008) Is adolescence a sensitive period for depression? Behavioral and neuroanatomical findings from a social stress model. *Synapse.* 62(1):22-30.
- Levay EA, Tammer AH, Penman J, Kent S, Paolini AG. (2010) Calorie restriction at increasing levels leads to augmented concentrations of corticosterone and decreasing concentrations of testosterone in rats. *Nutr Res.* 30(5):366-373.
- Liston C, Miller MM, Goldwater DS, Radley JJ, Rocher AB, Hof PR, Morrison JH, McEwen BS. (2006) Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci.* 26(30):7870-7874.
- Little AG. (2016) A review of the peripheral levels of regulation by thyroid hormone. *J Comp Physiol B.* 186:677-688.

- Liu YY, Schultz J, Brent G. (2003) A Thyroid Hormone Receptor α Gene Mutation (P398H) Is Associated with Visceral Adiposity and Impaired Catecholamine-stimulated Lipolysis in Mice. *J Biol Chem.* 278:(40), 3. 38913–38920.
- Lowry P. (2016) 60 YEARS OF POMC: Purification and biological characterisation of melanotrophins and corticotrophins. *J Mol Endocrinol.* 56(4):T1-T12.
- Lui P, Padow VA, Franco D, Hall BS, Park B, Klein ZA, Romeo RD. (2012) Divergent stress-induced neuroendocrine and behavioral responses prior to puberty. *Physiol Behav.* 107(1):104-111.
- Lukkes JL, Mokin MV, Scholl JL, Forster GL. (2009) Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Horm Behav.* 55(1):248-256.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 10(6):434-45.
- Maniam J, Morris MJ. (2012) The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology.* 63(1):97-110.
- Martin B, Ji S, Maudsley S, Mattson MP. (2010) "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(14):6127-33.
- Martínez-deMena R, Calvo RM, Garcia L, Obregon MJ. (2016) Effect of glucocorticoids on the activity, expression and proximal promoter of type II deiodinase in rat brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 428:58-67.
- Mastorakos G, Pavlatou M. (2005) Exercise as stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and hypothalamus-pituitary-thyroid axes. *Horm Metab Res.* 37:577-584.
- Maury E, Brichard SM. (2010) Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 314(1):1-16.
- McCarty R. (2016) Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. *Stress.* 19(5):449-475.
- McCormick CM, Green MR, Simone JJ. (2017) Translational relevance of rodents models of hypothalamic-pituitary-adrenal function and stressors in adolescence. *Neurobiol Stress.* 6:31-43.
- McCormick CM, Mathews IZ. (2010) Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 34:756-765.
- McEwen BS. (2017) Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. *Chronic Stress (Thousand Oaks).* 1:2470547017692328.

- Medina-Gomez G, Gray S, Vidal-Puig A. (2007) Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgammacoactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutr.* (10A):1132-7.
- Mineur YS, Abizaid A, Rao Y, Salas R, DiLeone RJ, Gündisch D, Diano S, De Biasi M, Horvath TL, Gao XB, Picciotto MR. (2011) Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. *Science.* 332(6035):1330-1332.
- Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. (2014) Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab.* 19(5):741-756.
- Mueller DT, Loft A, Eikelboom R. (1997) Alternate-day wheel access: effects on feeding, body weight, and running. *Physiol Behav.* 62(4):905-908.
- Mullur R, Liu Y-Y, Brent GA. (2014) Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 94:355-382.
- Nillni EA. (2010) Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Front Neuroendocrinol.* 31(2):134-156.
- 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.
- Padival MA, Blume SR, Vantrease JE, Rosenkranz JA. (2015) Qualitatively different effect of repeated stress during adolescence on principal neuron morphology across lateral and basal nuclei of the rat amygdala. *Neuroscience.* 291:128-145.
- Palanza P, Paterlini S, Brambilla MM, Ramundo G, Caviola G, Gioiosa L, Parmigiani S, Vom Saal FS, Ponzi D. (2021) Sex-biased impact of endocrine disrupting chemicals on behavioral development and vulnerability to disease: Of mice and children. *Neurosci Biobehav Rev.* 121:29-46.
- Palkovits M, Baffi JS, Pacak K. (1999) The role of ascending neuronal pathways in stress-induced release of noradrenaline in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats. *J Neuroendocrinol.* 11(7):529-539.
- Parra-Montes de Oca MA, Gutiérrez-Mariscal M, Salmerón-Jiménez MF, Jaimes-Hoy L, Charli J-L, Joseph-Bravo P. (2019) Voluntary exercise-induced activation of thyroid axis and reduction of white fat depots is attenuated by chronic stress in a sex dimorphic pattern in adult rats. *Front Endocrinol (Lausanne).* 10:418.
- Paxinos G, Watson C. (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th edition. Elsevier.
- Pereira VH, Marques F, Lages V, Pereira FG, Patchev A, Almeida OF, Almeida-Palha J, Sousa N, Cerqueira JJ. (2016) Glucose intolerance after chronic stress is related with downregulated PPAR- γ in adipose tissue. *Cardiovasc Diabetol.* 15(1):114.

- Perello M, Cakir I, Cyr NE, Romero A, Stuart RC, Chiappini F, Hollenberg AN, Nillni EA. (2010) Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299(6):E976-E989.
- 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.
- Picard M, Juster R-P, McEwen BS. (2014) Mitochondrial allostatic load puts the 'gluc' back in glucocorticoids. *Nat Rev Endocr.* 10:303-310.
- Rabasa C, Dickson SL. (2016) Impact of stress on metabolism and energy balance. *Curr Opin Behav Sci.* 9:71-77.
- Radley JJ, Sawchenko PE. (2015) Evidence for involvement of a limbic paraventricular hypothalamic inhibitory network in hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptations to repeated stress. *J Comp Neurol.* 523(18):2769-87.
- Rodríguez-Rodríguez A, Lazcano I, Sánchez-Jaramillo E, Uribe RM, Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, Charli JL. (2019) Tanycytes and the Control of Thyrotropin-Releasing Hormone Flux Into Portal Capillaries. *Front Endocrinol (Lausanne).* 10:401.
- Rojas-Carvajal M, Brenes JC. (2020) Acute stress differentially affects grooming subtypes and ultrasonic vocalisations in the open-field and home-cage test in rats. *Behav Processes.* 176:104140.
- Romeo R D. (2013) The teenage brain: The stress response and the adolescent brain. *Curr Dir Psychol Sci.* 22(2):140-145.
- Romeo RD, Patel R, Pham L, So VM. (2016) Adolescence and the ontogeny of the hormonal stress response in male and female rats and mice. *Neurosci Behav Rev.* 70:206-216.
- Romeo RD. (2010) Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Front Neuroendocrinol.* 31(2):232-240.
- Romeo RD. (2017) The impact of stress on the structure of the adolescent brain: Implications for adolescent mental health. *Brain Res.* 1654(Pt B):185-191.
- Rondeel JM, Heide R, de Greef WJ, van Toor H, van Haasteren GA, Klootwijk W, Visser TJ. (1992) Effect of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology.* 56(3):348-353.
- Sánchez E, Vargas MA, Singru PS, Pascual I, Romero F, Fekete C, Charli JL, Lechan RM. (2009) Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology.* 150(5):2283-2291.

- Sánchez-Delgado G, Martínez-Téllez B, Olza J, Aguilera CM, Gil A, Ruiz J R. (2015) Role of exercise in the activation of brown adipose tissue. *Ann Nutr Metab.* 67:21-32.
- Schneeberger M, Gomis R, Claret M. (2014) Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J Endocrinol.* 220(2):T25-46.
- Schneider M. (2013) Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res.* 354:99-106.
- Schulz S, Leassle RG. (2012) Stress-induced laboratory eating behavior in obese women with binge eating disorder. *Appetite.* 58:457-461.
- Sekulić MI. (2003) Pituitary thyrotropic cells are affected by steroid hormones. *Jug Med Biohem.* 22(3):185-200.
- Selye H. (1976) Stress without Distress. In: Serban G. (eds) *Psychopathology of Human Adaptation.* Springer, Boston, MA.
- Sertie RA, Andreotti S, Proença AR, Campana AB, Lima-Salgado TM, Batista ML Jr, Seelaender MC, Curi R, Oliveira AC, Lima FB. (2013) Cessation of physical exercise changes metabolism and modifies the adipocyte cellularity of the periepididymal white adipose tissue in rats. *J Appl Physiol (1985).* 115(3):394-402.
- Shupnik MA, Ridgway EC, Chin WW. (1989) Molecular biology of thyrotropin. *Endocr Rev.* 10(4):459-475.
- Sotelo-Rivera I, Cote-Vélez A, Uribe RM, Charli JL, Joseph-Bravo P. (2017) Glucocorticoids curtail stimuli-induced CREB phosphorylation in TRH neurons through interaction of the glucocorticoid receptor with the catalytic subunit of protein kinase A. *Endocrine.* 55(3):861-871.
- Sotelo-Rivera I, Jaimes-Hoy L, Cote-Vélez A, Espinoza-Ayala C, Charli J-L, Joseph-Bravo P. (2014) An acute injection of corticosterone increases thyrotrophin-releasing hormone in paraventricular nucleus of the hypothalamus but interferes with the rapid hypothalamus pituitary thyroid axis response to cold in male rats. *J Endocr.* 26:882-890.
- Soumano K, Desbiens S, Rabelo R, Bakopanos E, Camirand A, Silva JE. (2000) Glucocorticoids inhibit the transcriptional response of the uncoupling protein-1 gene to adrenergic stimulation in a brown adipose cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 165(1-2):7-15.
- Spear LP. (2000) Neurobehavioral Changes in Adolescence. *Curr Dir Psychol Sci.* 9(4):111-114.
- Spurway NC. (1992) Aerobic exercise, anaerobic exercise and the lactate threshold. *Br Med Bull.* 48(3):569-91.
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Goodyear LJ. (2015) Exercise effects on white adipose tissue: Being and metabolic adaptations. *Diabetes.* 64(7):2361-2368.

- Stranahan AM, Khalil D, Gould E. (2006) Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nat Neurosci.* 9(4):526-533.
- Sumiyoshi A, Nonaka H, Kawashima R. Sexual differentiation of the adolescent rat brain: A longitudinal voxel-based morphometry study. (2017) *Neurosci Lett.* 642:168-173.
- Toda C, Santoro A, Kim JD, Diano S. (2017) POMC Neurons: From Birth to Death. *Annu Rev Physiol.* 79:209-236.
- Toth E, Gersner R, Wilf-Yarkoni A, Raizel H, Dar DE, 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.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP. (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* 10(6):397-409.
- Uribe RM, Cisneros M, Vargas MA, Lezama L, Cote-Vélez A, Joseph-Bravo P, Charli J-L. (2011) The systemic inhibition of nitric oxide production rapidly regulates TRH mRNA concentration in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and serum TSH concentration. Studies in control and cold-stressed rats. *Brain Res.* 1367:188-197.
- Uribe RM, 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.
- Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P. (1993) Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology.* 58(1):140-145.
- van Haasteren GA, Linkels E, van Toor H, Klootwijk W, Kaptein E, de Jong FH, Reymond MJ, Visser TJ, de Greef WJ. (1996) Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *J Endocrinol.* 150(2):169-178.
- Verma P, Hellems KG, Choi FY, Yu W, Weinberg J. (2010) Circadian phase and sex effects on depressive/anxiety-like behaviors and HPA axis responses to acute stress. *Physiol Behav.* 99:276-85.
- Wellman CL, Bollinger JL, Moench KM. (2020) Effects of stress on the structure and function of the medial prefrontal cortex: Insights from animal models. *Int Rev Neurobiol.* 150:129-153.
- Willner P. (2016) The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress.* 6:78-93.
- Woo E, Sansing LH, Arnsten AFT, Datta D. (2021) Chronic Stress Weakens Connectivity in the Prefrontal Cortex: Architectural and Molecular Changes. *Chronic Stress (Thousand Oaks).* 5:24705470211029254.

- Wulsin AC, Wick-Carlson D, Packard BA, Morano R, Herman JP. (2016) Adolescent chronic stress causes hypothalamo-pituitary-adrenocortical hypo-responsiveness and depression-like behavior in adult female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 65:109-117.
- 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.
- Zoeller RT, Kabeer N, Albers HE. (1990) Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology*. 127(6):2955-62.
- Zoeller RT. (2007) Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences. *Thyroid*. 17(9):811-817.

Anexos

Anexo 1. Relación de ratas para ejercicio voluntario alternado

Ratas macho

C-Ex: Rata No. 2, 3, 6 9, 14, 15,22,27

Iso-Ex: Rata No. 5, 7,12,16,21,23,28, 29

Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
C	Iso	C	Iso	C	Iso	C	Iso
2	5	15	23	6	12	27	29
3	7	22	28	9	16	2	5
6	12	27	29	14	21	3	7
9	16	2	5	15	23	6	12
14	21	3	7	22	28	9	16
Día 5		Día 6		Día 7		Día 8	
C	Iso	C	Iso	C	Iso	C	Iso
14	21	3	7	22	28	9	16
15	23	6	12	27	29	14	21
22	28	9	16	2	5	15	23
27	29	14	21	3	7	22	28
2	5	15	23	6	12	27	29
Día 9		Día 10		Día 11		Día 12	
C	Iso	C	Iso	C	Iso	C	Iso
2	5	15	23	6	12	27	29
3	7	22	28	9	16	2	5
6	12	27	29	14	21	3	7
9	16	2	5	15	23	6	12
14	21	3	7	22	28	9	16
Día 13		Día 14		Día 15		Día 16	
C	Iso	C	Iso	C	Iso	C	Iso
14	21	3	7	22	28	9	16
15	23	6	12	27	29	14	21
22	28	9	16	2	5	15	23
27	29	14	21	3	7	22	28
2	5	15	23	6	12	27	29

Ratas hembra

C-Ex: Rata No. 4, 12, 17, 18, 22, 23,25, 31

Iso-Ex: Rata No. 3, 5, 6, 8, 16, 19, 20, 28

Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
C	Iso	C	Iso	C	Iso	C	Iso
4	3	23	19	17	6	31	28
12	5	25	20	18	8	4	3
17	6	31	28	22	16	12	5
18	8	4	3	23	19	17	6
22	16	12	5	25	20	18	8
Día 5		Día 6		Día 7		Día 8	
C	Iso	C	Iso	C	Iso	C	Iso
22	16	12	5	25	20	18	8
23	19	17	6	31	28	22	16
25	20	18	8	4	3	23	19
31	28	22	16	12	5	25	20
4	3	23	19	17	6	31	28
Día 9		Día 10		Día 11		Día 12	
C	Iso	C	Iso	C	Iso	C	Iso
4	3	23	19	17	6	31	28
12	5	25	20	18	8	4	3
17	6	31	28	22	16	12	5
18	8	4	3	23	19	17	6
22	16	12	5	25	20	18	8
Día 13		Día 14		Día 15		Día 16	
C	Iso	C	Iso	C	Iso	C	Iso
22	16	12	5	25	20	18	8
23	19	17	6	31	28	22	16
25	20	18	8	4	3	23	19
31	28	22	16	12	5	25	20
4	3	23	19	17	6	31	28

Anexo 2. Calendario de estrés crónico variable

Ratas hembra

	DPN 31	DPN 32	DPN 33	DPN 34	DPN 35	DPN 36	DPN 37
Mañana	Caja inclinada 3 h			Ruido blanco 3 h	Plataforma elevada 15 min		PAS
Tarde		Aislamiento 12 h	Luz encendida			Aislamiento 12 h	
	DPN 38	DPN 39	DPN 40	DPN 41	DPN 42	DPN 43	DPN 44
Mañana	Frío 1 h		Restricción de mov. 1h	Luz estrob. 3h		Ayuno 4 h	OFT
Tarde		Luz encendida			Aislamiento 12 h		
	DPN 45	DPN 46	DPN 47	DPN 48	DPN 49	DPN 50	DPN 51
Mañana			Plataforma elevada 15 min	Luz estrob. 3h	Restricción de mov. 1h	Caja inclinada 3h	EPM
Tarde	Luz encendida	Ayuno 12 h					
	DPN 52	DPN 53	DPN 54	DPN 55	DPN 56	DPN 57	DPN 58
Mañana	Ruido blanco 3h			Caja inclinada 3 h	Frío 1 h	Plataforma elevada 15 min	OFT
Tarde		Ayuno 12 h	Luz encendida				
	DPN 59	DPN 60					
Mañana		Fin del estrés					
Tarde	Aislamiento 12 h						

Ratas macho

	DPN 31	DPN 32	DPN 33	DPN 34	DPN 35	DPN 36	DPN 37
Mañana	Caja inclinada 3 h	Luz estrob. 3 h	Ruido blanco 3 h		Plataforma elevada 15 min	Ayuno 4 h	PAS
Tarde				Aislamiento 12 h			
	DPN 38	DPN 39	DPN 40	DPN 41	DPN 42	DPN 43	DPN 44
Mañana		Frío 1 h	Caja inclinada 3 h	Luz estrob. 3h		Ruido blanco 3 h	OFT
Tarde	Luz encendida				Aislamiento 12 h		
	DPN 45	DPN 46	DPN 47	DPN 48	DPN 49	DPN 50	DPN 51
Mañana	Ayuno 4h	Ruido blanco 3 h	Plataforma elevada 15 min		Restricción de mov. 1 h	Caja inclinada 3 h	EPM
Tarde				Luz encendida			
	DPN 52	DPN 53	DPN 54	DPN 55	DPN 56	DPN 57	DPN 58
Mañana	Frío 1 h	Luz estrob. 3 h	Plataforma elevada 15 min			Restricción de mov. 1 h	OFT
Tarde				Ayuno 12 h	Aislamiento 12 h		
	DPN 59	DPN 60	DPN 61	DPN 62	DPN 63	DPN 64	DPN 65
Mañana		Ruido blanco 3 h		Plataforma elevada 15 min		Caja inclinada 3 h	EPM
Tarde	Luz encendida		Aislamiento 12 h		Ayuno 12 h		
	DPN 66	DPN 67	DPN 68	DPN 69	DPN 70		
Mañana	Luz estrob. 3 h	Frío 1 h	Restricción de mov. 1 h		Fin del estrés		
Tarde				Aislamiento 12 h			

Anexo 3. Genes analizados y condiciones para PCR

Péptido/Proteína	Abreviatura del gen	Referencia/ID	Tamaño (bp)	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	cDNA (μl)	Tm (°C)	Ciclos
Proopiomelanocortina	<i>Pomc</i>	Leriche et al., 2007	678	GAGATTCTGCTACAGTCGCTC	TTGATGATGGCGTTCTTGAA	4	64	26
Neuropéptido Y	<i>Npy</i>	de Rijke et al., 2005	220	TATCCCTGCTCGTGTGTTG	GTTCTGGGGGCATTTTCTG	4	64	26
Desiodasa 2	<i>Dio2</i>	NM_031720.3	190	GATGCTCCCAATTCCAGTGT	AGGCTGGCAGTTGCCTAGTA	2	64	26
Enzima degradadora de TRH	<i>Trhde</i>	NM_001108991.1	450	CTGGATCGCATACAAAAA	GGACAGCCAAATAATTGCT	4	60	27
Receptor adrenérgico β3	<i>Adrb3</i>	NM_013108.2	351	TCTGTGCTGGCTGCCCTTCTT	CTTCTCCTCCCCCAACCCTCAA	4	64	27
Proteína desacopladora 1	<i>Ucp1</i>	NM_012682.2	396	GGATCAAACCCCGCTACTG	CAGGATCCGAGTCGCAGAAAA	2	64	18
Receptor γ activado por proliferador de peroxisoma (PPARγ)	<i>Pparg</i>	NM_013124.3		CCCTTTACCACGGTTGATTCTC	GCAGGCTCTACTTTGATCGCACT	4	64	26
Lipasa sensible a hormonas	<i>Hsl</i>	Caimari et al., 2008	169	TCACGCTACATAAAGGCTGCT	CCACCCGTAAAGAGGGAACT	3	58	27
Coactivador 1α de PPARγ	<i>Pgc1a</i>	NM_031347.1	459	ATGGAGTGACATAGAGTGTGC	GTGCTAAGACCGCTGCATTC	3	64	26



Voluntary Exercise-Induced Activation of Thyroid Axis and Reduction of White Fat Depots Is Attenuated by Chronic Stress in a Sex Dimorphic Pattern in Adult Rats

Marco Antonio Parra-Montes de Oca, Mariana Gutiérrez-Mariscal, Ma Félix Salmerón-Jiménez, Lorraine Jaimes-Hoy, Jean-Louis Charli and Patricia Joseph-Bravo*

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Lee E. Eiden,
National Institutes of Health (NIH),
United States

Reviewed by:

Gábor B. Makara,
Hungarian Academy of Sciences
(MTA), Hungary
Joao Pedro Werneck De Castro,
University of Miami, United States

*Correspondence:

Patricia Joseph-Bravo
joseph@ibt.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 22 March 2019

Accepted: 11 June 2019

Published: 26 June 2019

Citation:

Parra-Montes de Oca MA, Gutiérrez-Mariscal M, Salmerón-Jiménez MF, Jaimes-Hoy L, Charli J-L and Joseph-Bravo P (2019) Voluntary Exercise-Induced Activation of Thyroid Axis and Reduction of White Fat Depots Is Attenuated by Chronic Stress in a Sex Dimorphic Pattern in Adult Rats. *Front. Endocrinol.* 10:418. doi: 10.3389/fendo.2019.00418

The activity of the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis is inhibited by energy deficit, by acute or chronic stress, but activated by cold exposure or exercise. Because stress curtails acute cold induced activation of HPT, we evaluated the effect of chronic stress on HPT axis response to voluntary exercise, a persistent energy-demanding situation. Adult male and female Wistar rats were exposed to restraint stress, 30 min/day for 2 weeks, or to isolation (Iso) [post-natal day [PND] 30–63]. Exercise was performed (7 p.m.–7 a.m.) in a running wheel, sedentary controls stayed in individual cages (Sed); at 7 a.m. they were housed with their cage mate or individually (Iso); food intake by the exercised group was measured day and night to pair-fed Sed. At sacrifice, hormones, mRNA levels and tissue weights were quantified. Control or restrained adult rats had access to running wheel daily for 2 weeks. Compared to C, exercise decreased white adipose tissue (WAT) mass in females and males, increased hypothalamic paraventricular nucleus (PVN)-*Trh* expression in males proportionally to exercise performed, and increased TSH and T4 serum concentration in females. These changes were not detected in restrained groups. Starting at PND 63 control (2/cage) and isolated (1/cage) rats either exercised on 10 alternated nights or were sedentary. In control male animals, compared to Sed rats, exercise did not decrease WAT mass, nor changed HPT axis activity, but increased *Pomc* and deiodinase 2 (*Dio2*) expression in mediobasal hypothalamus (MBH), adrenergic receptor $\beta 3$ and uncoupling protein-1 in brown adipose tissue. In control female animals, exercise decreased WAT mass, increased *Pomc*, *Dio2*, and *Trhde* expression in MBH, and TSH serum concentration. Iso females had lower TSH and T4 serum concentration, *Dio2* and *Trhde* expression in MBH than controls. The stress response was higher in isolated males than females, but in males it did not alter the effects of exercise, in contrast to isolated females that had a blunted response to exercise compared to controls. In conclusion, chronic stress interferes with metabolic effects produced by exercise, such as loss of WAT mass, coincident with dampening of HPT activity.

Keywords: TRH, WAT, HPT axis, restraint, social isolation, exercise

INTRODUCTION

Physical activity and food intake are the two most important controllable variables in setting body weight. Energy expenditure is produced by basal metabolism and thermogenesis required for everyday living and physical activity. In concert with the sympathetic nervous system, thyroid hormones (TH) contribute to thermogenesis and basal metabolic rate, but they also participate in several aspects of exercise performance as they are directly involved in muscle activity, mitochondrial biogenesis, lipolysis, glycolysis, and gluconeogenesis, and mobilization of fuel to metabolically active tissues (1, 2). Patients with hypothyroidism, overt or subclinical, have reduced exercise tolerance, endurance, muscle strength, cardiovascular functions, deficient control of energy expenditure, fatigue, and poor quality of life (3–6).

Tissue levels of thyroid hormones are regulated by the activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis, and at target cells by transporters, deiodinases, and membrane or intracellular TH receptors, the latter acting as transcription factors (1, 7–9). The HPT axis is subject to multifactorial regulation, initiating with neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) that synthesize thyrotropin releasing hormone (TRH) and release it in the median eminence, in the vicinity of portal vessels and β 2-tanycytes. These neurons receive multiple afferents from the arcuate nucleus and other brain areas that convey information of environmental, nutritional and metabolic status (10, 11). Tanycytes express deiodinase-2 (*Dio2*) that transforms T4 to T3, TH transporters, and TRH-degrading enzyme (*Trhde*) that inactivates released TRH (10). Once in portal vessels, TRH is transported to the adenohypophysis where it controls synthesis and release of thyrotropin (TSH). TSH activates synthesis of T4 in thyroid; some T4 is deiodinated to T3 in thyroid but most in target tissues (1, 12, 13). T3 is the active hormone at transcriptional level and responsible for feedback inhibition on TRH and TSH synthesis (7, 14, 15).

Multiple factors modulate the activity of the HPT axis; it is inhibited in situations of energy deficit as fasting, food restriction or chronic illness, and stimulated in certain conditions of energy excess (10, 16). Situations of energy demands as cold exposure and some types of exercise increase HPT axis activity (17–20). Rats running in a treadmill have increased serum concentration of T3 at the beginning of exercise (21) but lower after 120 min. In humans, contradictory results relate to the intensity and duration of exercise, nutritional status, and timing of blood samples; increased TSH serum concentrations are detected at short times after an exercise bout, and of T4 in some conditions although dehydration may give false results (22); increased TSH and TH concentration is detected after endurance training if measured before exhaustion but inhibited if energy reserves are temporarily depleted, or in conditions of high release of corticosterone or interleukins, for example (23). Research in animals has produced also inconsistent results; among the confounding factors, exercise usually diminishes food intake (19, 24), which by itself drives inhibition of HPT axis; likewise, for stress imposed by certain types of exercise (21). Access to a wheel provides rodents with the opportunity to exercise in voluntary non-stressed conditions

(25). Using this paradigm we previously demonstrated that compared to sedentary animals exercised rats decrease their food intake and mass of white adipose tissue (WAT), and diminish the parameters that reflect HPT axis activity; however, if values are compared to a pair-fed group there is still a strong decrease in WAT mass, but PVN *Trh* expression, TSH and T3 serum concentrations are higher and proportional to the loss of WAT mass (19).

Another important regulator on HPT activity is stress, either acute or chronic, which may cause inhibition. Stress diminishes synthesis and release of TRH, TSH, and TH, and hepatic conversion of T4 into T3 (26–30); some effects are mimicked by acute or chronic corticosterone injections (31, 32). Not only basal HPT axis activity is affected by acute stress but also its response to an energy demanding situation as cold exposure; rats subjected to an acute stress or to corticosterone injection prior to cold exposure do not present the expected activation of HPT axis activity, and of a target organ as brown adipose tissue (BAT) (19, 32). The interference of glucocorticoids on neuronal activation of TRH neurons has been demonstrated at the level of *Trh* transcription in hypothalamic cells *in vitro* (33, 34); *in vivo*, corticosterone administration inhibits cold-induced CREB phosphorylation in TRH neurons (34). All these data pertain to male rodents as data on females are scarce.

Although chronic exposure to stress or to corticosterone inhibits PVN *Trh* expression and serum TSH concentration (31), the response of the HPT axis in chronically stressed animals exposed to energy demands is unknown. There are several models to induce chronic stress in rodents and depending on the type, the response of the HP-adrenal (HPA) axis (CRH:ACTH:glucocorticoids) can either subside (animals habituate) or intensify. Chronic stress induced by daily intermittent short periods of restraint (Res) is a model of psychological stress that produces habituation of the response of the HPA axis, but if rodents are submitted to a new stressor, response is enhanced (35, 36). After 30 min of acute restraint, PVN *Trh* expression and TSH serum concentration decrease but levels normalize after 14 daily sessions (19, 37). The cold-induced activation of the HPT axis is also curtailed in male rats submitted to 14 days of intermittent repeated restraint (unpublished). Another type of stressor is individual housing; isolation (Iso) constitutes a continuous chronic stress recognized as a strong psychosocial stressor that causes hyperactivation of the HPA axis, and the lack of social stimuli prevent habituation (38); animals isolated since puberty have behavioral and physiological malfunctions, as puberty and adolescence are critical developmental periods for circuit formation between limbic areas (39, 40).

As an adequate response of the HPT axis to exercise favors mobilization of energy reserves (19, 41), we hypothesized that chronic stress attenuates the response of the HPT axis to voluntary exercise and this contributes to long-term consequences in WAT depots. We selected these two paradigms to distinguish the effect of stress on animals that habituated (Res) and no longer have high basal corticosterone levels but may show an exaggerated response to a novel situation as exercise (35–37), compared to isolated animals that do not habituate and

show dysfunction of HPA axis (42). As an acute corticosterone increase blunts the increase in TRH synthesis induced by cold-induced neuronal stimulation (32–34), we may expect a different response if effects depend only in corticosterone variations or, if they depend on limbic circuitry (43). We studied the response of the HPT and HPA axes (the latter as control) and WAT depots to voluntary wheel running in male and female rats submitted to two types of chronic stress: (a) 2 weeks of intermittent restraint in adult animals, and (b) isolation caused by keeping rats in individual housing since puberty.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male and female Wistar rats were raised at the Institute's Animal Facility, as described in Sotelo-Rivera et al. (32). Breeding colony management and care was carried out only by two technicians to avoid additional stress. The breeding procedure followed: an outbred monogamous pair scheme in which the male is removed before the litter is born; litter is adjusted to 10 offspring at post-natal day 2 (PND 2) and culled if necessary. Animals are weaned at PND 21, placed by sex in groups of 2–4/cage and treated as described (44). Appropriate records assure non-inbreeding; colony breeders are renewed every 5 years. For these experiments, rats (PND 45–60) were placed in experimental independent rooms according to sex (2/cage). When males were near 350 g or 2.5 months, they were housed in groups of two per cage, in cages with a wire bar lid modified so that the rear 8.00" of lid is ~3.00" higher (total height of 11.00"), allowing rats to stand on their back legs (Y Corporation of America, INC.). Food (Teklad 2018SX, Envigo, USA) and water were offered *ad libitum* except where indicated otherwise. Maintenance and work with animals followed the Guide for the care and use of laboratory animals (8th ed.), as well as the Mexican norm NOM-062-ZOO-1999. These experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute, approval No. 273 and 318.

Experiment 1. Chronic Intermittent Restraint

Forty adult male rats at PND 86 (390 ± 6 g) were weighed and separated in five groups (eight rats per group). Two groups were taken to an empty room and introduced into a plexiglass tube (23.5×7 cm) with slots for ventilation and keeping tail out, in prone position during 30 min every day at 10:00 h for 2 weeks [restrained [Res] group]; two groups serving as experimental controls (C) were taken to a different room and placed in a small cage during 30 min (37). A group of 8 naïve (N) animals from the same cohort was kept undisturbed in the animal room to evaluate environmental conditions effect. Food intake was quantified by weight difference: A set measured amount of food was placed over the rack of the Res and N groups every 3 days, the amount left was weighted again after recovering small pieces from the bed. The mean of Res intake offered to controls (pair-fed).

At PND 101, rats of C and Res groups were divided; half of C (420 ± 13 g) and of Res (429 ± 14 g) animals were introduced every night (7:00 p.m.–7:00 a.m.), during 2 weeks, in a cage

with a running wheel of 25 cm diameter (AccuScan Instruments INC) for voluntary exercise (exercised: Ex), the other two halves of animals stayed in individual cages (sedentary: Sed) (19). All rats rejoined their cage mate in the morning. Food was offered during dark or light cycles and intake registered at every food change (between 7:00 a.m. and 9:00 a.m. in the morning and 5:00 p.m.–7:00 p.m. in the night). Sedentary rats were pair-fed to the intake of Ex rats.

The same paradigm was used to study female rats starting at PND 95 (before Res: 248 ± 4 g; after Res, before Ex: 253 ± 3 g).

Experiment 2. Social Isolation

At PND 30 male ($N = 32$; 110 ± 2 g) and female ($N = 32$; 100 ± 2 g) Wistar rats were separated in two groups that were housed, either in individual cages (Iso) ($N = 16$) or in groups of 2/cage (C) in the same room to expose isolated rats to visual, auditive, and olfactory cues of other rats (45). Rats were maintained as described (32), in separate rooms according to sex. Food and water were offered *ad libitum*, food intake (FI) was quantified every 3 days from PND 30 to PND 63 and body weight measured every week in the adolescence period. At PND 63 C (Males: 379 ± 8 g; Females: 223 ± 6 g) or Iso (Males: 363 ± 7 ; Females: 224 ± 5 g) rats of each sex were further separated in two groups, one was left undisturbed (Sed) and the other exposed to a running wheel (Ex) ($N = 8$ each) as described above and in Uribe et al. (19), with some modifications. Due to limited amount of running cages, rats had alternate access during 16 days for a total of 10 running days. At light change (7:00 a.m.), C animals were housed with their cage-mate or in an isolated cage (Iso group); food intake, and number of revolutions were recorded daily and body weight every 2 days. Sedentary rats received the amount of food consumed by the exercised group as described previously.

Sacrifice and Tissue Collection

On the last day of exercise, 3 h after lights on and cage change, animals were decapitated with a sharp guillotine by an experienced technician as described (19), in a separate laboratory near the animal rooms, taking one animal at a time, cleaning the guillotine in-between and with care of diminishing stress. Trunk blood was collected, serum separated and stored in aliquots. Adipose tissues (gonadal, retroperitoneal and interscapular) and adrenals were extracted and weighed in fresh; brain and BAT were placed in dry ice and stored at -70°C . Several experienced persons participated to limit time between initiation and termination of sacrifice to a maximum of 2 h. Dissection of hypothalamic regions is described in **Supplementary Figure 1**.

Hormone Assays

Radioimmunoassays were utilized for TSH (NIDDK reagents and protocols) and corticosterone (CORT; reagents from Merck-Millipore, PerkinElmer, and Sigma) quantification. Total T3 and T4 were quantified with ELISA kits (Diagnóstica Internacional Zapopan, JAL, México) adding to standard curves an aliquot of hypothyroid rat serum (46). All samples were measured in duplicate and the mean taken as one determination; intraassay and interassay coefficients of variation were $<10\%$.

Semi-quantification of mRNA

Total RNA was extracted from frozen tissues according to Chomzynsky et al. (47) with some modifications for BAT, for which a centrifugation (870 g, 4°C, and 10 min) and an extra chloroform wash were performed to remove fat. Relative mRNA levels were measured by RT-PCR according to reported conditions (19); for those not previously reported by our group, linearity was verified and optimized conditions described in **Supplementary Figure 2**.

Statistical Analysis

The mean of duplicate biochemical measurements was considered as one determination; results were calculated as percent of each experiment's control group mean. Two-way ANOVA was performed to analyze the effect of chronic stress and sex before exercise, and to analyze the effect of chronic stress and physical activity on the different variables. Three-way ANOVA was performed to analyze effects of chronic stress, physical activity and sex, and interaction between these variables. All data were analyzed by Sigma plot 11.0 (Systat Software, Inc.) and GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.). Results of statistical analysis are described in **Supplementary Tables 1, 2**. *Post-hoc* comparisons were carried out with either Bonferroni or Holm-Sidak tests, and difference considered to be significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Experiment 1. Effect of Chronic Restraint Stress on the Response to Voluntary Exercise

Chronic Restraint Decreased Food Intake and Body Weight Gain

During the period of intermittent restraint, there was no difference in the total food intake or body weight gain (BWg) of restrained male rats compared to naïve (**Table 1**). Res females ate 10% less than the naïve group and as controls were pair fed to Res, they ate all that was offered (**Table 1**). BWg was lowest in the pair-fed, followed by Res and highest by N. Restraint diminished voluntary food intake, pair-fed were probably stressed by hunger causing highest weight lost. Females ate less absolute food than males (**Table 1**) but ate more relatively to body weight, thus their food efficiency was lower (**Supplementary Table 3A**).

Chronic Restraint Diminished Motivation for Running Only in Males

Res males performed less exercise than controls (**Figure 1A**) whereas females were not affected as both groups gradually increased the total distance ran which were considerably higher than those ran by males (**Figure 1B**). As previously published (19), exercise diminished food intake more in C-Ex than in Res-Ex; body weight gain in Sed or Ex, C or Res was 5% lower than N but differences between C or Res groups were non-significant (**Table 2**). Compared to N, exercise decreased food intake in C or Res females but BWg was not significantly different (**Table 2** and **Supplementary Table 4A**).

TABLE 1 | Food intake (FI) and body weight gain (BWg) during restraint stress period of naïve (N) pair fed controls (C) and restraint (R) male and female rats.

	N	C	Res
MALES			
FI (g/day)	26.6 ± 9.4	27.2 ± 0.6	26.4 ± 0.8
BWg (g)	31.6 ± 3.5	27.4 ± 3.5	25.3 ± 2.4
FEMALES			
FI (g/day)	20.7 ± 0.11 ^A	18.41 ± 0.26 ^{°A}	18.1 ± 0.2 ^{°A}
BWg (g)	10.25 ± 3.9 ^A	-4 ± 2.12 ^{°A}	5.5 ± 1.5 ^{°A}

Male and female Wistar adult rats were restrained (R) or kept in single cage for 30 min/day for 14 consecutive days in two independent rooms, food intake of restrained group was pair-fed to control group (C). Results are expressed in mean ± SEM. Significant ANOVAs (**Supplementary Table 1A**) followed by post-hoc: ^{*} $P < 0.05$ vs. C group; [°] $P < 0.05$ vs. Sex; [°] $P < 0.05$ vs. N.

Chronic Restraint Blunted Exercise-Induced Loss of Fat Mass and Activation of HPT Axis in a Sex-Dependent Manner

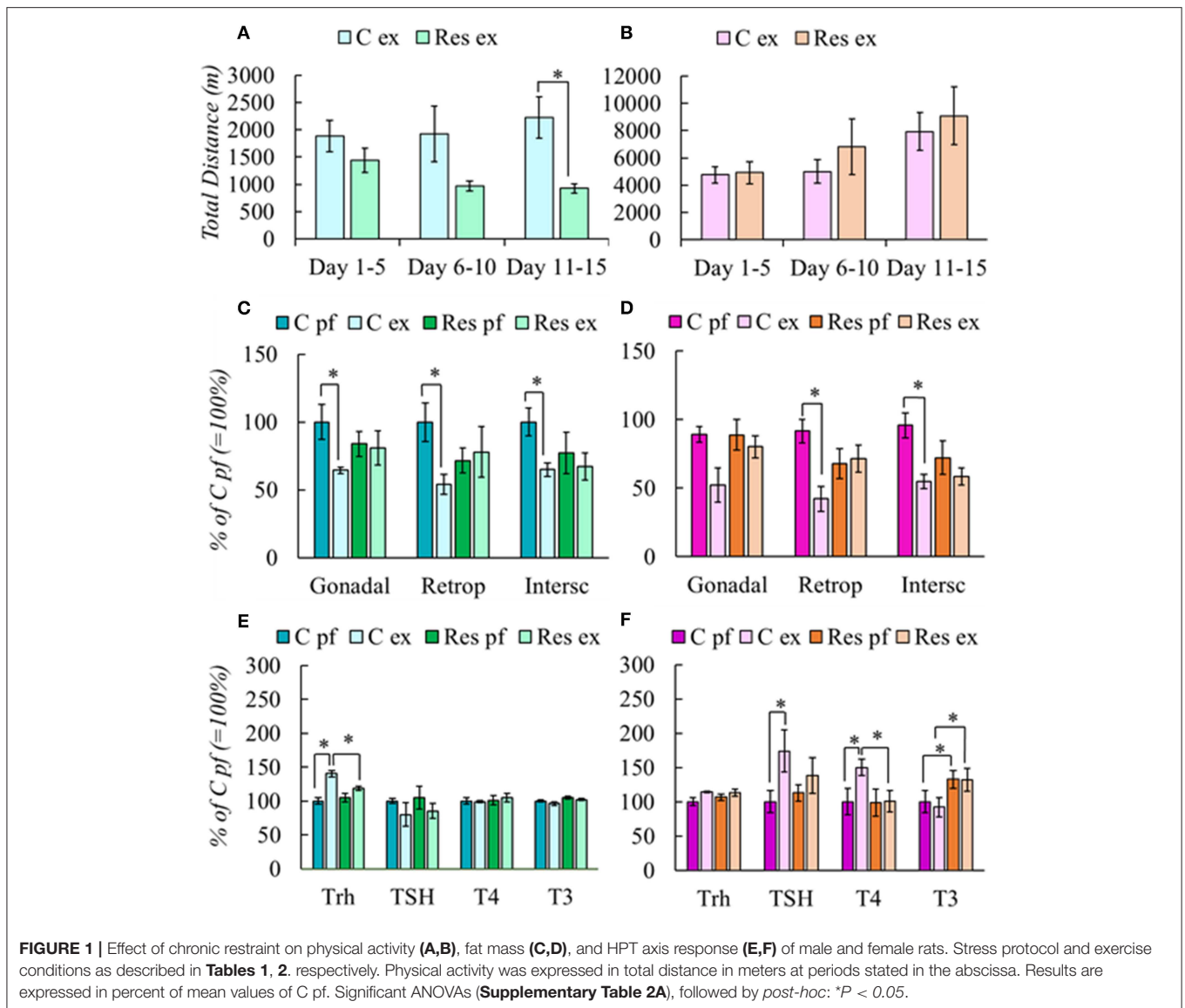
Exercise induces WAT mass loss even if it is not evident in body weight (19, 48). C males reduced gonadal, retroperitoneal, and interscapular fat depots after exercise, but Res group did not (**Figure 1C**). C-Ex females also reduced them, although gonadal WAT loss was not significant; as in males, Res females did not lose WAT after exercise (**Figure 1D**).

Because chronic stress affects the HPA response to new stressors and exercise has been considered either to increase or diminish HPA activity (19, 49), we measured gene expression profile of *Crh* and *Gr* in PVN, and corticosterone in serum. There were no significant differences in any of these variables in groups of either sex (not shown), except for an increase in right-adrenal weight of Res males (N, 27 ± 3; C-Ex 31 ± 1; Res 31 ± 3; Res-Ex 39 ± 2^{**} mg, ^{*} $P = 0.007$ vs. N; ^{*} $P = 0.02$ vs. C-Ex) suggesting chronic stress (50). Females had higher basal corticosterone serum concentration (181 ± 7 ng/ml) than males (65 ± 4 ng/ml); but in contrast, values were increased similarly in all experimental groups compared to naïve (C-Sed 396 ± 56, C-ex 332 ± 19, Res-Sed 354 ± 30, Res-Ex 303 ± 16).

Trh expression was stimulated in C-Ex (**Figure 1E**) and values correlated negatively with WAT retroperitoneal mass ($r = -0.832$; $P = 0.003$). No other parameters of HPT axis varied among male groups. In females, *Trh* expression was not significantly different between C-Ex and C-Sed or between Res groups. In contrast to males, TSH serum concentration increased in C-Ex females as well as T4 (**Figure 1F**). In both sexes, activation of the HPT axis coincides with WAT mass decrease only in controls, but not in those previously stressed by daily restraint.

Experiment 2. Effect of Individual Housing on the Response to Voluntary Exercise Social Isolation Did Not Affect Food Intake and Body Weight Gain During Adolescence

We chose to analyze social isolation since adolescence because this stressor prevents proper development of brain, causing behavioral and physiological alterations that can remain until



adult stage (43, 51, 52). Social isolation in adulthood delays exercised-induced hippocampal neurogenesis in male and female rats, affecting more in males than in females (47, 53).

Rats were isolated at PND 30, as expected males grew faster than females; no difference was observed in body weight gain between C or Iso groups; by PND 60, body weight of C or Iso groups were similar so as their food intake (**Table 3** and **Supplementary Table 3B**). The lack of effect of social isolation since weaning on ponderal variables during the growing phase has been previously reported (54, 55).

Ponderal Changes and HPA Responses to Exercise Were Affected by Social Isolation Dependent on Sex

Exercise reduced their food intake 19% in C and 18% in Iso groups compared to average intake before exercise in both sexes (**Tables 3, 4**), but Iso-Ex ate more than exercised controls (**Table 4**), sedentary group were pair-fed accordingly.

After exercise, Iso gained more weight than controls (**Table 4**). If food intake was calculated in relation to body weight, females ate more and their food efficiency was lower than males (**Supplementary Table 4B**). Isolation did not diminish the amount of running in males or females compared to group-housed controls (**Figures 2A,B**), and as in the previous experiments, females ran more than males (**Table 4**). Total distance ran by C males in this experiment was similar to controls of experiment 1, whereas females ran more, even though they had access to the wheel only in alternate days for a total of 10 nights, instead of 14 daily nights in the previous experiment (**Supplementary Figure 3**); probably be due to the lighter weight of the latter (56), and/or the form of exercise, on alternate days in Iso that avoided habituation (25) compared to every day in Res.

C males had less gonadal and retroperitoneal WAT mass compared with Iso group, but there was no lost of any fat type by exercised (**Figure 2C**). C-Ex females lost gonadal and

TABLE 2 | Food intake (FI), Body weight gain (BWg) and distance per day (DPD) after exercise period of male and female rats.

	N	C pf	C ex	Res pf	Res ex
MALES					
FI (g/day)	25.15 ± 0.97	18.5 ± 0.9°	17.8 ± 1.1°	21.5 ± 1.9°	20.9 ± 1.2°
BWg (g)	19.8 ± 10.2	-6.5 ± 3.6°	-12.75 ± 2.9°	2.4 ± 4.7°	-9.2 ± 13.4°
DPD (m)	-	-	402 ± 78	-	280 ± 64
FEMALES					
FI (g/day)	23.27 ± 0.54	15.39 ± 1.58°	15.55 ± 1.52°	16.12 ± 1.35° ^A	16.28 ± 1.35° ^A
BWg (g)	15.3 ± 5.46	5.0 ± 4.0 ^A	7.6 ± 2.2 ^A	15.6 ± 3.8 ^A	15.8 ± 2.8 ^A
DPD (m)	-	-	1179 ± 186 ^A	-	1599 ± 248 ^A

Effect of restraint.

Restrained or control rats were either exposed to a running wheel (C ex and Res ex) or left individually in a cage (C pf and Res pf) overnight for 14 days. Food intake of exercised animals was pair-fed to control groups. Significant ANOVAs (**Supplementary Table 2A**) followed by post-hoc: ^A*P* < 0.05 vs. Sex; °*P* < 0.05 vs. N.

TABLE 3 | Food intake (FI) and body weight gain (BWg) during adolescence-adulthood period of group-housed (C) and isolated (Iso) male and female rats.

	C	Iso
MALES		
FI (g/day)	27.58 ± 0.37	27.14 ± 0.64
BWg (g)	232.63 ± 5.48	220.00 ± 4.34
FEMALES		
FI (g/day)	19.55 ± 0.23 ^A	19.81 ± 0.53 ^A
BWg (g)	104.94 ± 3.57 ^A	104.19 ± 3.06 ^A

Male and female Wistar rats were kept isolated (Iso) or in 2/cage (Controls, C) from PND 30 to PND 63. Results are expressed in mean ± SEM. Significant ANOVAs (**Supplementary Table 1B**) followed by post-hoc: ^A*P* < 0.001 vs. Sex.

TABLE 4 | Food intake (FI), body weight gain (BWg) and distance per day (DPD) after exercise period of group-housed (C) and isolated (Iso) male and female rats.

	C-Sed	C-Ex	Iso-Sed	Iso-Ex
MALES				
FI (g/day)	24.74 ± 0.02	25.24 ± 0.84	26.05 ± 0.04*	26.30 ± 0.92*
BWg (g)	16.67 ± 1.20	15.00 ± 3.84	30.83 ± 2.27*	25.50 ± 2.53* ^{&}
DPD (m)	-	542 ± 36	-	570 ± 74
FEMALES				
FI (g/day)	16.99 ± 0.01 ^A	17.07 ± 0.34 ^A	18.16 ± 0.02* ^A	18.00 ± 0.46* ^A
BWg (g)	10.86 ± 2.98 ^A	7.17 ± 3.63 ^A	14.00 ± 1.41* ^A	13.14 ± 1.98* ^A
DPD (m)	-	3,061 ± 597 ^A	-	3,753 ± 522 ^A

At PND 63, group-housed (C) and isolated (Iso) rats were separated in two groups, one was left undisturbed (Sedentary, Sed) and the other was exposed to a running wheel in alternated days during the dark period. Sed group received the amount of food that Ex group. Results are expressed in mean ± SEM. Significant ANOVAs (**Supplementary Table 2B**) followed by post-hoc: **P* < 0.05 vs. C group; [&]*P* < 0.05 vs. Sed group; ^A*P* < 0.05 vs. Sex.

subcutaneous WAT mass albeit only subcutaneous in the Iso-Ex group (**Figure 2D**).

HPA response differed between groups. Isolation increased PVN *Crh* expression whether or not they exercised; there was a tendency to increase PVN *Gr* expression and Cort serum concentration in C-Ex but did not achieve significance

(**Figure 2E**). Females in contrast, had lower PVN *Crh* expression and serum Cort concentration in Iso than C groups. PVN *Gr* mRNA levels increased although significant only in Iso-Sed (**Figure 2F**). Higher expression of *Gr* may contribute to overcome the reduced levels of corticosterone to lower *Crh* expression (57).

Social Isolation Altered the HPT Response to Voluntary Exercise in a Sex-Dependent Manner

Two important regions that regulate HPT axis activity reside in mediobasal hypothalamus (MBH), the arcuate nucleus and the median eminence. In the arcuate nucleus, neuronal populations that express anorexigenic (POMC/CART) and orexigenic (NPY/AgRP) peptides stimulate or inhibit *Trh* expression in PVN, respectively (10). Tanycytes in median eminence inhibit TRH expression through deiodinase 2 activity increasing T3 levels in the hypothalamus, and the activity of TRH-degrading enzyme controls TSH secretion (58). In the MBH, the expression of arcuate peptides varied due to rearing condition or exercise. *Pomc* expression increased in C-Ex males compared with C-Sed and Iso-Ex, and *Npy* expression decreased in Iso (**Figure 3A**). The pattern of *Pomc* expression was similar in female MBH, however *Npy* mRNA levels were higher in Iso than C groups (**Figure 3B**). *Dio2* expression was higher in C-Ex than C-sed in males but *Trhde* was not modified (**Figure 3A**). In females, *Dio2* was higher in C than in Iso; *Trhde* increased by exercise in C and slightly in Iso (**Figure 3B**).

HPT axis was not stimulated by exercise in C-males. In contrast, isolated males had diminished TSH serum concentration after exercise; that of T4 augmented but in both Iso groups compared to their controls (**Figure 3C**). Negative correlation was observed between T4 and WAT retroperitoneal mass in C-Ex group ($r = -0.856$; $P = 0.030$) whereas positive, in Iso-Ex ($r = 0.879$; $P = 0.009$). In females, *Trh* mRNA levels were lower in C-Ex than in C-Sed, TSH serum concentration increased by exercise in C, and T4 decreased compared to Iso-sed, while T3 concentration increase in both exercised groups (**Figure 3D**). T4:T3 ratio was higher in Iso than C, and was higher in females than males (**Supplementary Table 5**).

Brown adipose tissue (BAT) is a target of thyroid hormones that in concert with the adrenergic system is responsible for

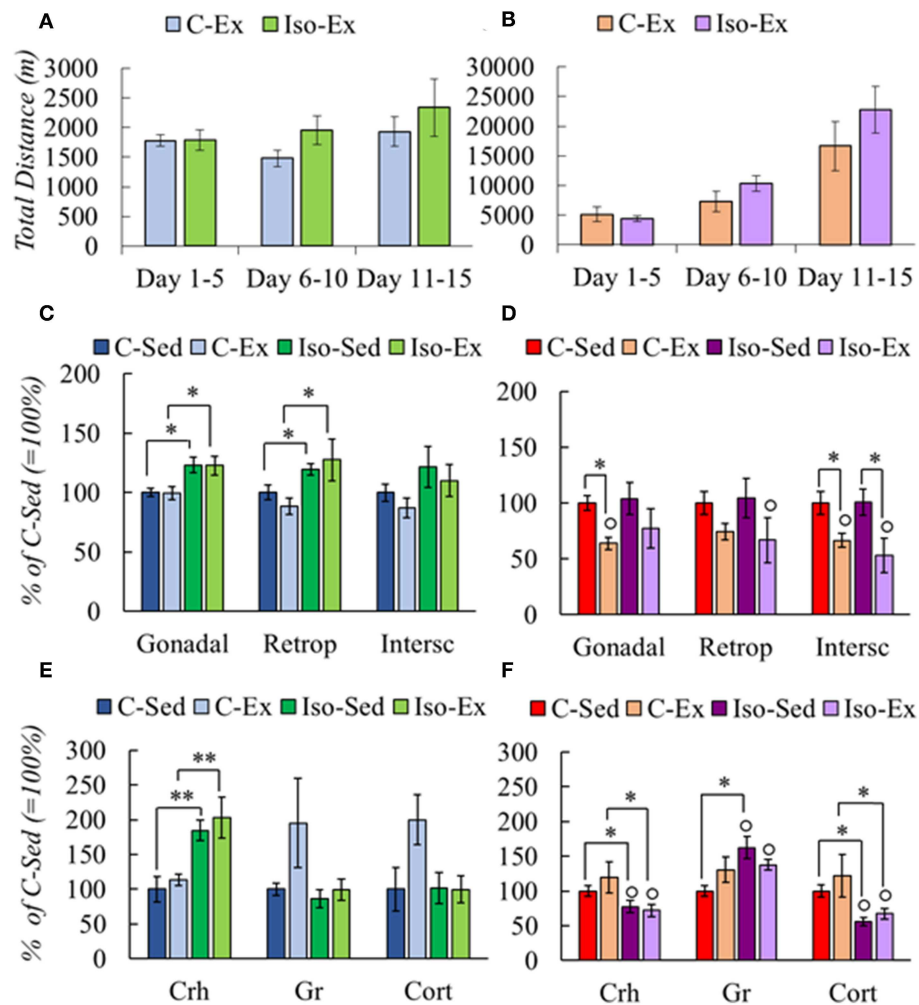


FIGURE 2 | Effect of social isolation on physical activity (A,B), fat mass (C,D), and HPA axis response (E,F) of male and female rats. Rearing and exercise conditions described in tables 3 and 4, respectively. Significant ANOVAs (Supplementary Table 2B) followed by *post-hoc*: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; ° $P < 0.05$ vs. Males of the same group.

thermogenesis, activity that contributes to energy expenditure (19, 59). Noradrenergic signaling stimulates *Dio2* expression, rising T3 concentration in the tissue (60) and, in turn, stimulates the transcription of β -adrenergic receptors (β -AR) and UCP-1 (2, 61). We thus measured the expression of these molecules; mRNA levels of *Adrb3* or *Ucp1* were lower in Iso groups of males than C but increased in both by exercise, those of *Dio2* were not changed (Figure 3E). Females showed no changes in *Adrb3* expression, decreased that of *Ucp1* in Iso-Sed compared to C-Sed while increased, as *Dio2*, in Iso-Ex (Figure 3F).

DISCUSSION

Life of laboratory rodents, in controlled environments, is very distant from that in natural conditions. Experimental rats have little stimuli and space for physical activity, and usually become obese (62). Although distinct from training exercise, voluntary running for short bouts provides many benefits for animals'

health (63), and allows comparing the physiology of a sedentary animal with an active one. In just 2 weeks of daily running during their active phase, male rats lose WAT mass proportionally to their physical activity and to the levels of serum thyroid hormones or PVN *Trh* expression (19). Stress inhibits the response of the HPT axis to the short-term energy needs of an acute exposure to cold [(32, 34) and unpublished], but its effect on long-term energy demands was not known. We considered voluntary running a suitable model of energy demand, to study the effects of two types of chronic stress on the responses of the HPT axis to exercise in both male and female rats, given the sex dimorphism in metabolic and stress responses. A short time of exercise was selected to avoid allostatic adjustments that could make it difficult to validate results with previously reported results (19).

The chronic stressors chosen were intermittent restraint at adulthood, and isolation from puberty to adulthood. Restraint is a well-studied model of psychological homotypic stress that

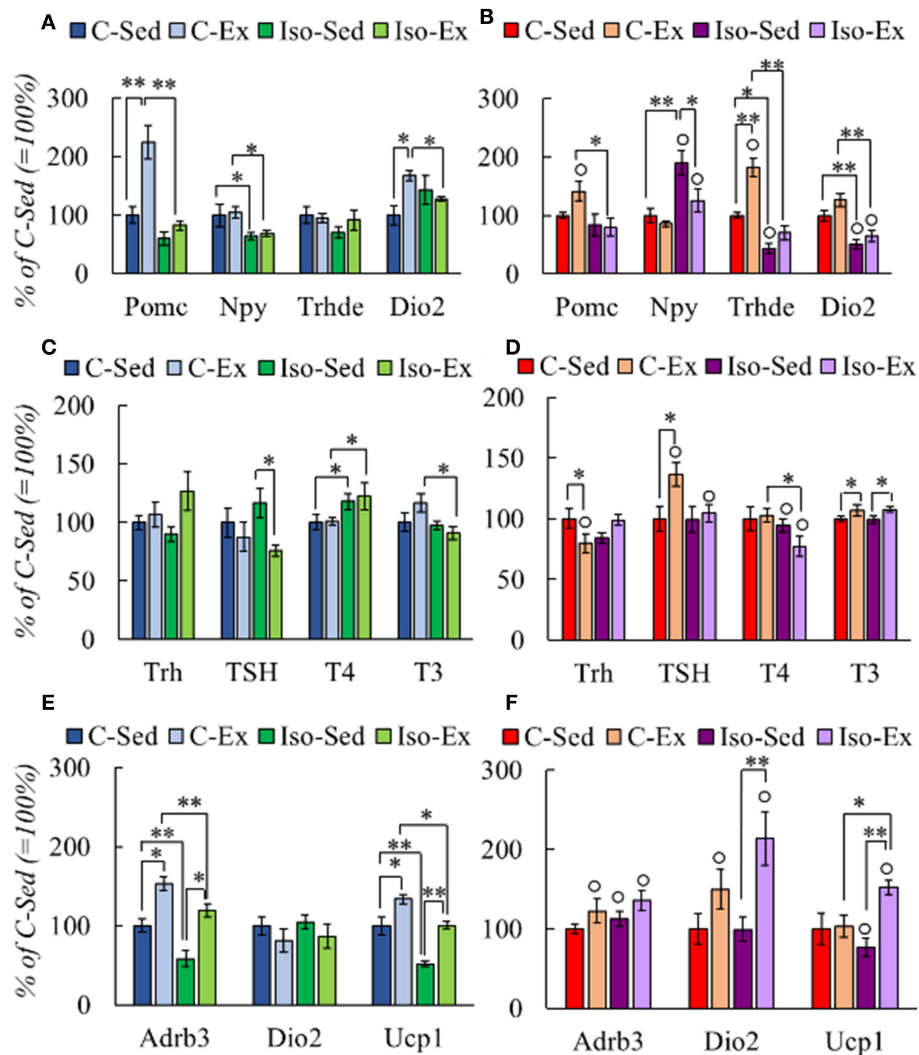
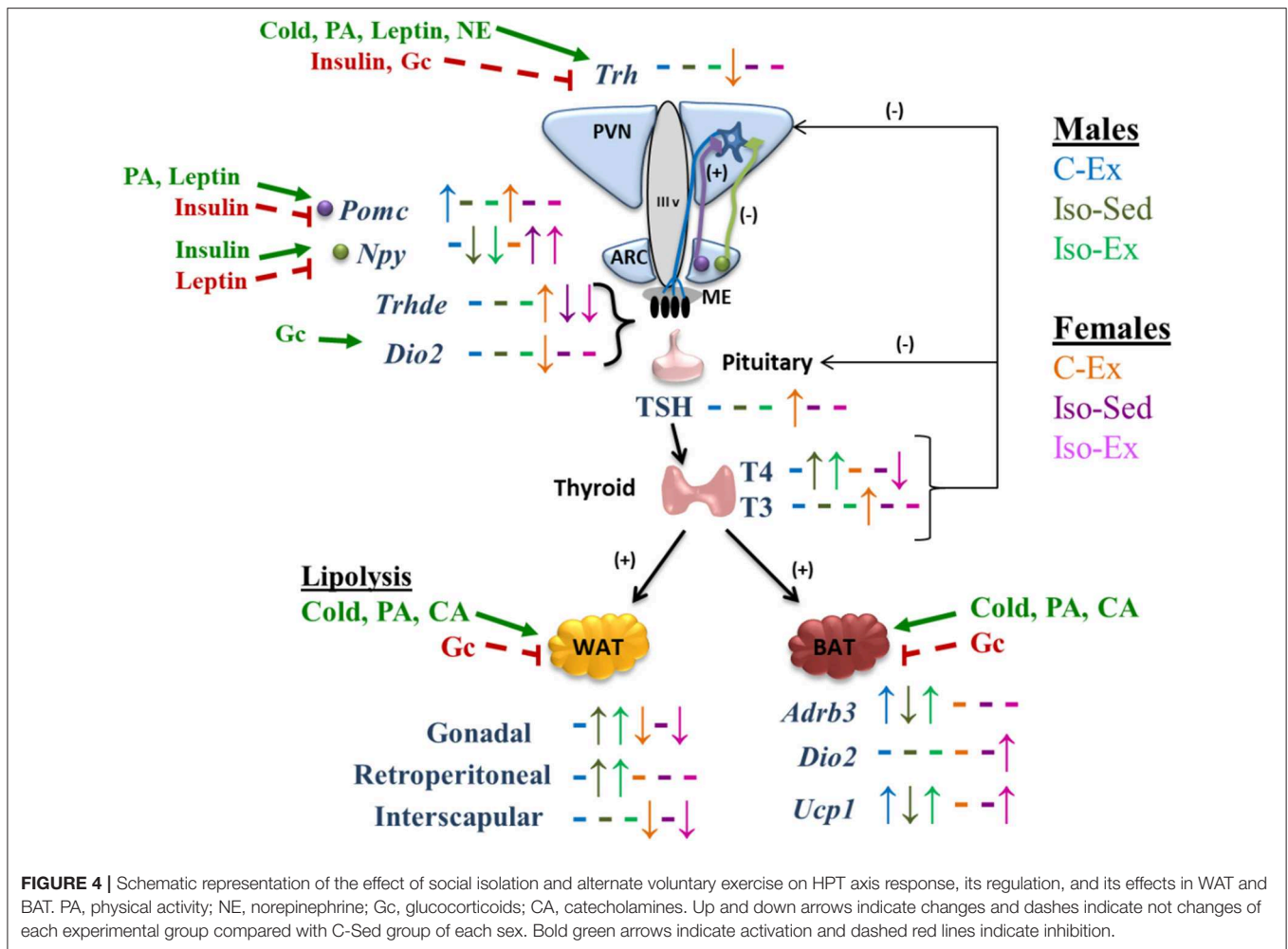


FIGURE 3 | Effect of social isolation and alternate exercise on the expression of HPT status-related genes (A,B), HPT axis response (C,D), and genes that respond to thyroid hormones in BAT (E,F) of male and female rats. Rearing and exercise conditions described in tables 3 and 4, respectively. Results are expressed in percent of mean values of C-Sed. Significant ANOVAs (Supplementary Table 2B) followed by *post-hoc*: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; * $P < 0.05$ vs. Males of the same group.

causes habituation (35) as well as neurological changes that cause a hyper-reactive response to a new stressor, persistence of oxidative stress, modifications in immune responses, to name a few (64). In contrast, social isolation is a model of psychosocial stress that alters glucocorticoid feedback through changes in neurochemical functions of limbic and cortical systems, affecting the maturation of some of these circuits leading to long lasting alterations that induce depression and anxiety in adult rodents (38, 65, 66); isolation during adolescence produces HPA axis malfunction at adult stage, decreasing basal levels of serum corticosterone and producing a hyper-reactive response to acute stress (67–69). Voluntary exercise attenuates various deleterious effects produced by stress, and although it may cause increases in serum corticosterone concentration it is not considered a strong stressor, in contrast to forced training or exhaustive exercise (70, 71). The exercise paradigm utilized was not considered a new

stressor since variables of HPA axis were not different in exercised to those of sedentary rats. In our experiments, both types of stress affected feeding and exercise task; Res males exercised less and ate more, whereas Iso animals, especially females, increased food intake and body weight gain, suggesting stress-induced imbalances in eating behavior. Decreased fat mass was expected in exercised rats (19, 72, 73), and was detected in adult males and females that exercised every night (experiment 1). However, animals that exercised alternately (experiment 2) did not reduce food intake as did those running every night (this experiment, and 19). In males, lipolysis induced by daily exercise appeared to reduce hunger; signals required for this and for losing WAT mass might not be enough if exercise is not done daily. Conversely, female controls of both experiments did lose WAT mass in response to voluntary exercise but also ran considerably more than males, as is generally recognized in rodents (74, 75).



They lost subcutaneous WAT (interscapular) and only one of the abdominal types (gonadal or retroperitoneal) of WAT depending on the experiment. Previous Res-stress reduced the amount of exercise performed only in males that showed no WAT mass loss; less exercise may account for the lack of fat mass lost however, stressed females that ran the same amount as controls did not lose WAT mass either, despite not differing in food intake. In isolated females, exercise induced similar tendencies in WAT mass reduction, which was significant only in subcutaneous type. These results point for a negative effect of chronic stress on the adequate WAT-metabolic response to exercise.

Voluntary and forced exercise increase basal corticosterone serum concentration (47, 69, 76) without affecting the expression of *Crh* and *Gr* in PVN (77, 78). Adult control animals of both experiments showed no exercise-induced variations in any of the HPA axis parameters, and neither those that had been previously restrained. Isolation induced HPA malfunction differently in males and females; males had increased PVN *Crh* expression but no changes in serum corticosterone concentration, whereas females had decreased serum corticosterone concentration and *Crh* mRNA levels, suggesting hypoactivity of the axis (79). These findings agree with a higher susceptibility of females to stress

(80), isolation (81) and depression (82, 83), the latter usually coincident with hypoactivity of HPA (79); this might be due to the effect of stress at adolescent stage (84), and exercise could reverse the deleterious effects of stress (53, 71).

Exercise promotes the expression of *Pomc* in arcuate nucleus (ARC) (85), in agreement with what we found in C male and female rats, albeit it was not according to the amount of exercise performed, as Iso males ran similar distances and their response was blunted. Isolation and not wheel running increased ARC *Npy* expression in females, coincident with higher food intake and some reports (86, 87).

The HPT axis is subject to multiple metabolic, hormonal and neuronal effectors that regulate its activity at multiple levels (8, 11, 56). Elements of the HPT axis showed a sex-dimorphic regulation (Figure 4). Change-dynamics of HPT axis parameters depend on the type of stimulus; PVN *Trh* expression changes can be rapid and transient (17, 18), half-lives of serum TSH and T3 are short (min to h) compared to that of serum T4 (8). Furthermore, since the activity of tissue deiodinases is also regulated, circulating thyroid hormones (TH) concentrations are difficult to interpret (12), making it necessary to evaluate as many variables as possible, if only one time point is studied.

Exercise increased *Dio2* expression in median eminence (ME) in C males, possibly because of increased serum corticosterone concentration (88). If DIO2 activity was indeed increased, it should have augmented local T3 concentration which in turn, would be expected to stimulate ME *Trhde* expression (58) or inhibit PVN *Trh* expression (10), albeit with unknown dynamics. None of these changes were found in males; since animals were sacrificed 3 h after switching to a wheel-free cage, and time since the last exercise boot was not recorded, it is possible that the time-point was inadequate. However, exercise did increase ME *Trhde* expression in C females, with only a slight non-significant tendency for *Dio2* expression, and diminished PVN *Trh* expression. In females, isolation decreased ME *Dio2* and *Trhde* expression, coincident only with decreased corticosterone serum concentration, which stimulates *Dio2* expression (88); parallel changes in *Dio2* and *Trhde* reflect the dependence of DIO2 activity to set the levels of T3 in tanycytes, which activate *Trhde* expression (58). However, despite increased *Trhde* expression in ME, TSH serum concentration was increased, most probably by an exercise-induced effect that could either increase TRH release in spite of not finding a higher expression or, increased TSH release due to higher expression of TRH-R1 or in response to events distinct from TRH.

Thyroid hormones regulate the activity of adipose tissue genes which constitute additional markers of HPT axis activity. BAT can promote energy expenditure through facultative thermogenesis induced by sympathetic nervous system activity (89). The impact of exercise on BAT is still not well-understood (90) since *Adrb3* and *Ucp1* regulation in BAT by exercise depends on species and training time; in mice, treadmill training increases *Ucp1* expression but *Adrb3* expression does not change (91), while in rat *Ucp1* and *Adrb3* mRNA levels do not change after one session of treadmill exercise (92), in contrast to an increase during progressive treadmill (93). The increase in the expression of *Adrb3* and *Ucp1* in Iso-Ex males, and of *Dio2* and *Ucp1* in Iso-Ex females, suggests that voluntary exercise promotes the effect of thyroid hormones on BAT, promoting energy expenditure as heat instead of muscle work, and being able to revert the effects of social isolation.

To conclude, present results demonstrate that a history of chronic stress curtails the adequate metabolic response to voluntary exercise characterized by loss of WAT depots, in male and female rats. Females ran much more than males, which allowed them to lose fat independent of schedule (daily or alternate days). Restraint stress reduced exercise in males, either due to fatigue or lack of motivation. Some changes in the HPT

axis (PVN *Trh* expression or serum concentrations of TSH or TH) were related to WAT loss, but only in controls and not in stressed groups. We propose that in control animals the HPT axis is activated transiently at each exercise boot contributing to lipolysis, event inhibited by previous chronic stress, leading to problems with fuel availability.

DATA AVAILABILITY

The raw data generated are available on request to corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute, approval No. 273 and 318.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MP-M, MG-M, and MS-J performed the experiments. MP-M, LJ-H, and PJ-B analyzed the data. MP-M and PJ-B wrote the manuscript draft. LJ-H and J-LC helped with manuscript edition. MP-M is a doctorate student and main contributor. PJ-B is principal investigator of grant and project director. J-LC and PJ-B are co-directors of the Neuroendocrinology group.

FUNDING

This work was supported by DGAPA IN204316 (PJ-B) and IA200417 (LJ-H); CONACYT 0284883 (PJ-B). MP-M is recipient of CONACYT 273496 post-graduate scholarship.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors express their gratitude to technicians QFB, Miguel Cisneros and Q. Fidelia Romero for their aid in experimental work, and to Roberto Rodríguez Bahena, Shirley Ainsworth, David Santiago Castañeda, and Eugenio López Bustos for providing reagents and computer assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00418/full#supplementary-material>

REFERENCES

- McAninch EA, Bianco A. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* (2014) 1311:77–87. doi: 10.1111/nyas.12374
- Mullur R, Liu Y-Y, Brent GA. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev.* (2014) 94:355–82. doi: 10.1152/physrev.00030.2013
- Gonçalves A, Resende ES, Fernandes MLMP, da Costa AM. Effect of thyroid hormones on cardiovascular and muscle systems on exercise tolerance: a brief review. *Arq Bras Cardiol.* (2006) 86:e42–4. doi: 10.1590/s0066-782x2006001600033
- Louwerens M, Appelhof BC, Verloop H, Medici M, Peeters RP, Visser TJ, et al. Fatigue and fatigue-related symptoms in patients treated for different causes of hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* (2012) 167:809–15. doi: 10.1530/EJE-12-0501
- Lankhaar JAC, de Vries WR, Jansen JACG, Zelissen PMJ, Backx FJG. Impact of overt and subclinical hypothyroidism on exercise tolerance: a systematic review. *Res Q Exer Sport.* (2014) 85:365–89. doi: 10.1080/02701367.2014.930405

6. Tanriverdi A, Ozcan Kahraman B, Ozsoy I, Bayraktar F, Ozgen Saydam B, Acar S, et al. Physical activity in women with subclinical hypothyroidism. *J Endocrinol Invest.* (2018) 1–7. doi: 10.1007/s40618-018-0981-2
7. Mendoza A, Hollenberg AN. New insight into thyroid hormone action. *Pharmacol Ther.* (2017) 173:135–45. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.012
8. Chatzitomaris A, Hoermann R, Midgley JE, Hering S, Urban A, Dietrich B, et al. Thyroid allostasis-adaptative responses of thyrotropic feedback control to conditions of strain, stress, and developmental programming. *Front Endocrinol.* (2017) 8:1–28. doi: 10.3389/fendo.2017.00163
9. Visser WE, Friesema EC, Visser TJ. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol.* (2011) 25:1–14. doi: 10.1210/me.2010-0095
10. Fekete C, Lechan RM. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev.* (2014) 35:159–94. doi: 10.1210/er.2013-1087
11. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Charli J-L. Advances in TRH signaling. *Rev Endocr Metab Disord.* (2016) 17:545–58. doi: 10.1007/s11154-016-9375-y
12. Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* (2006) 116:2571–9. doi: 10.1172/JCI29812
13. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, et al. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev.* (2008) 29:898–938. doi: 10.1210/er.2008-0019
14. Dyess EM, Segerson TP, Liposits Z, Paull WK, Kaplan MM, Wu P, et al. Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* (1988) 123:2291–7. doi: 10.1210/endo-123-5-2291
15. Chiamolera MI, Wondisford FE. Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology.* (2009) 150:1091–6. doi: 10.1210/en.2008-1795
16. Fliers E, Kalsbeek A, Boelen A. Mechanisms in endocrinology: beyond the fixed setpoint of the hypothalamus–pituitary–thyroid axis. *Eur J Endocrinol.* (2014) 171: R197–208. doi: 10.1530/EJE-14-0285
17. Zoeller RT, Kabber N, Albers E. Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology.* (1990) 127:2955–62. doi: 10.1210/endo-127-6-2955
18. Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology.* (1993) 58:140–45. doi: 10.1159/000126523
19. Uribe RM, Jaimes-Hoy L, Ramirez-Martinez C, García-Vázquez A, Romero F, Cisneros M, et al. Voluntary exercise adapts the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male rats. *Endocrinology.* (2014) 155:2020–30. doi: 10.1210/en.2013-1724
20. Arkader R, Rosa MR, Moretti G. Physiological changes of exercise of thermogenesis, thyroid homeostasis and inflammation. *Endocrinol Metab Int J.* (2016) 3:85–8. doi: 10.15406/emij.2016.03.00055
21. Fortunato RS, Ignácio DL, Padron AS, Peçanha R, Marassi M P, Rosenthal D, et al. The effect of acute exercise session on thyroid hormone economy in rats. *J Endocr.* (2008) 198:347–53. doi: 10.1677/JOE-08-0174
22. Hackney AC, Dodbridge JD. Thyroid hormone and the interrelationship of cortisol and prolactin: influence of prolonged, exhaustive exercise. *Pol J Endocrinol.* (2009) 60:252–7.
23. Leal LG, Lopes MA, Batista ML Jr. Physical exercise-induced myokines and muscle-adipose tissue crosstalk: a review of current knowledge and the implications for health and metabolic diseases. *Front Physiol.* (2018) 9:1–17. doi: 10.3389/fphys.2018.01307
24. Afonso VM, Eikelboom R. Relationship between wheel running, feeding, drinking, and body weight in male rats. *Physiol Behav.* (2003) 80:19–26. doi: 10.1016/S0031-9384(03)00216-6
25. Basso JC, Morrell JI. Using wheel availability to shape running behavior of the rats towards improved behavioral and neurobiological outcomes. *J Neurosci Methods.* (2017) 290:13–23. doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.07.009
26. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Uribe RM, Charli JL. TRH, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *J Endocrinol.* (2015) 226:T85–100. doi: 10.1530/JOE-15-0124
27. Olivares EL, Silva-Almeida C, Pestana FM, Sonoda-Cortes R, Araujo IG, Rodrigue NC, et al. Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. *Neuropharmacology.* (2012) 62:446–56. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.035
28. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Charli JL. Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress. *J Endocrinol.* (2015) 224:R139–59. doi: 10.1530/JOE-14-0593
29. Moog NK, Entringer S, Heim C, Wadhwa PD, Kathmann N, Buss C. Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development. *Neuroscience.* (2017) 342:68–100. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.070
30. Bianco AC, Nunes MT, Hell NS, Maciel RMB. The role of glucocorticoids in the stress-induced reduction of extrathyroidal 3,5,3'-triiodothyronine generation in rats. *Endocrinology.* (1987) 120:1033–8. doi: 10.1210/endo-120-3-1033
31. Kakucska I, Qi Y, Lechan RM. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* (1995) 136:2795–802. doi: 10.1210/endo.136.7.7789304
32. Sotelo-Rivera I, Jaimes-Hoy L, Cote-Vélez A, Espinoza-Ayala C, Charli J-L, Joseph-Bravo P. An acute injection of corticosterone increases thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus of the hypothalamus but interferes with the rapid hypothalamus pituitary thyroid axis response to cold in male rats. *J Endocr.* (2014) 26:882–90. doi: 10.1111/jne.12224
33. Díaz-Gallardo MY, Cote-Vélez A, Charli JL, Joseph-Bravo P. A rapid interference between glucocorticoids and cAMP-activated signaling in hypothalamic neurons prevents binding of phosphorylated cAMP response element binding protein and glucocorticoid receptor at the CRE-like and composite GRE sites of thyrotropin-releasing hormone gene promoter. *J Neuroendocrinol.* (2010) 22:282–93. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.01966.x
34. Sotelo-Rivera I, Cote-Vélez A, Uribe RM, Charli JL, Joseph-Bravo P. Glucocorticoids curtail stimuli-induced CREB phosphorylation in TRH neurons through interaction of the glucocorticoid receptor with the catalytic subunit of protein kinase A. *Endocrine.* (2017) 55:861–71. doi: 10.1007/s12020-016-1223-z
35. Bhatnagar S, Dallman M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience.* (1998) 84:1025–39. doi: 10.1016/S0306-4522(97)00577-0
36. Herman JP, Tasker JG. Paraventricular hypothalamic mechanism of chronic stress adaptation. *Front Endocrinol.* (2014) 7:1–10. doi: 10.3389/fendo.2016.00137
37. Gutiérrez-Mariscal M, Sánchez E, García-Vázquez A, Rebolledo-Solleiro D, Charli JL, Joseph-Bravo P. Acute response of hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone neurons and thyrotropin release to behavioral paradigms producing varying intensities of stress and physical activity. *Regul Pept.* (2012) 179:61–70. doi: 10.1016/j.regpep.2012.08.010
38. Filipović D, Todorovic N, Bernardi RE, Gass P. Oxidative and nitrosative stress pathways in the brain of socially isolated adult male rats demonstrating depressive- and anxiety-like symptoms. *Brain Struct Funct.* (2017) 222:1–20. doi: 10.1007/s00429-016-1218-9
39. Romeo RD, Patel R, Pham L, So VM. Adolescence and the ontogeny of the hormonal stress response in male and female rats and mice. *Neurosci Biobehav Rev.* (2016) 70:206–16. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.05.020
40. Burke AR, McCormick CM, Pellis SM, Lukkes JL. Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses. *Neurosci Biobehav Rev.* (2017) 76:280–300. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.01.018
41. Ciloglu F, Peker I, Pehlivan A, Karacabey K, Ilan N, Saygin O, et al. Exercise intensity and its effects on thyroid hormones. *Neuroendocrinol Lett.* (2005) 26:830–4.
42. McCormick CM, Green MR, Simone JJ. Translational relevance of rodents models of hypothalamic-pituitary-adrenal function and stressors in adolescence. *Neurobiol Stress.* (2017) 6:31–43. doi: 10.1016/j.ynstr.2016.08.003
43. Radley JJ, Sawchenko PE. Evidence of involvement of a limbic paraventricular hypothalamic inhibitory network in hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptations to repeated stress. *J Comp Neurol.* (2015) 523:2769–87. doi: 10.1002/cne.23815
44. Jaimes-Hoy L, Gutiérrez-Mariscal M, Vargas Y, Pérez-Maldonado A, Romero F, Sánchez-Jaramillo E, et al. Neonatal maternal separation alters, in a sex-specific manner, the expression of TRH, TRH-degrading ectoenzyme in

- the rat hypothalamus, and the response of the thyroid axis to starvation. *Endocrinology*. (2016) 157:3253–5. doi: 10.1210/en.2016-1239
45. Fone KCF, Porkess MV. Behavioral and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Behav Rev*. (2008) 32:1087–102. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.003
 46. Bianco AC, Anderson G, Forrest D, Galton VA, Gereben V, Kim BW, et al. American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. *Thyroid*. (2014) 24:88–168. doi: 10.1089/thy.2013.0109
 47. Chomzynsky P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. (1987) 162:156–9. doi: 10.1006/abio.1987.9999
 48. Horowitz JF. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends Endocrinol Metab*. (2003) 14:386–92. doi: 10.1016/S1043-2760(03)00143-7
 49. Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nat Neurosci*. (2006) 9:526–33. doi: 10.1038/nn1668
 50. Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engelan WC, Herman JP. Chronic stress induced adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocr Metab*. (2006) 291:E965–73. doi: 10.1152/ajpendo.00070.2006
 51. Lukkes JD, Watt MJ, Lowry CA, Forster GL. Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. *Front Behav Neurosci*. (2009) 3:1–12. doi: 10.3389/neuro.08.018.2009
 52. Arakawa H. Ethological approach to social isolation effects in behavioral studies of laboratory rodents. *Behav Brain Res*. (2018) 341:98–108. doi: 10.1016/j.bbr.2017.12.022
 53. Leasure JL, Decker L. Social isolation prevents exercise-induced proliferation of hippocampal progenitor cells in female rats. *Hippocampus*. (2009) 19:907–12. doi: 10.1002/hipo.20563
 54. Krolow R, Noschang C, Arcego DM, Huffell AP, Marcolin ML, Benitz AN, et al. Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism*. (2013) 62:1268–78. doi: 10.1016/j.metabol.2013.04.009
 55. Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Noschang C, Ferreira AGK, Scherer E, et al. Isolation during the pubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipids profile and liver oxidative stress. *Physiol Behav*. (2014) 124:23–32. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.10.029
 56. Soch A, Bradburn S, Sominsky L, De Luca SN, Murgatroyd C, Spencer SJ. Effects of exercise on adolescent and adult hypothalamic and hippocampal neuroinflammation. *Hippocampus*. (2016) 26:1435–46. doi: 10.1002/hipo.22620
 57. Jeanneteau FD, Lambert WM, Ismaili N, Bath KG, Lee FS, Garabedian MJ, et al. BDNF and glucocorticoids regulate corticotrophin releasing hormone (CRH) homeostasis in the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2012) 109:1305–10. doi: 10.1073/pnas.1114122109
 58. Sánchez E, Vargas MA, Singru PF, Pascual I, Romero F, Fekete C, et al. Tanycyte pyroglutamate II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology*. (2009) 150:2283–91. doi: 10.1210/en.2008-1643
 59. Sánchez-Delgado G, Martínez-Téllez B, Olza J, Aguilera CM, Gil A, Ruiz JR. Role of exercise in the activation of brown adipose tissue. *Ann Nutr Metab*. (2015) 67:21–32. doi: 10.1159/000437173
 60. Arrojo e Drigo R, Fonseca TL, Werneck-de-Castro JPS, Bianco AC. Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. (2013) 1083:3956–64. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.08.019
 61. Rubio A, Raasmaja A, Silv JE. Thyroid hormone and norepinephrine signaling in Brown adipose tissue. II. Differential effects of thyroid hormone on beta 3-adrenergic receptors in brown and white adipose tissue. *Endocrinology*. (1995) 136:3277–84. doi: 10.1210/en.136.8.3277
 62. Martin B, Ji S, Maudsley S, Mattson MP. “Control” laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2010) 107:6127–33. doi: 10.1073/pnas.0912955107
 63. Novak CM, Burghardt PR, Levine JA. The use of a running wheel to measure activity in rodents: relationship to energy balance, general activity, and reward. *Neurosci Biobehav Rev*. (2012) 36:1001–14. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.12.012
 64. Buynitsky T, Mostofsky DI. Restrain stress in behavioral research: recent developments. *Neurosci Behav Rev*. (2009) 33:1089–98. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.05.004
 65. Cacioppo JT, Cacioppo S, Capotanio JP, Cole SW. The neuroendocrinology of social isolation. *Annu Rev Psychol*. (2015) 66:733–67. doi: 10.1146/annurev-psych-010814-015240
 66. Mumtaz F, Khan MI, Zubair M, Dehpour AR. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. (2018) 105:1205–22. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.086
 67. Biggio F, Pisu MG, Garau A, Boero G, Locci V, Mostallino MC, et al. Maternal separation attenuates the effect of adolescent social isolation on HPA axis responsiveness in adult rats. *Eur Neuropsychopharm*. (2014) 24:1152–61. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.03.009
 68. Butler TR, Ariwodola OJ, Weiner JL. The impact of social isolation on HPA axis function, anxiety-like behavior, and ethanol drinking. *Front Interg Neurosci*. (2014) 7:102. doi: 10.3389/fnint.2013.00102
 69. Pisu MG, Garau A, Boero G, Biggio F, Pibiri V, Dore R, et al. Sex differences in the outcome of juvenile social isolation on HPA axis function in rats. *Neuroscience*. (2016) 320:172–82. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.02.009
 70. Stranahan AM, Lee K, Mattson MP. Central mechanisms of HPA axis regulation by voluntary exercise. *Neuromolecular Med*. (2008) 10:118–27. doi: 10.1007/s12017-008-8027-0
 71. Chen C, Nakagawa S, An Y, Ito K, Kitaichi Y, Kusumi I. The exercise-glucocorticoid paradox: how exercise is beneficial to cognition, mood, and the brain while increasing glucocorticoid levels. *Front Neuroendocrinol*. (2017) 44:83–102. doi: 10.1016/j.yfrne.2016.12.001
 72. Gollisch KSC, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. (2009) 297:E495–504. doi: 10.1152/ajpendo.90424.2008
 73. Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise regulation of adipose tissue. *Adipocyte*. (2016) 5:153–62. doi: 10.1080/21623945.2016.1191307
 74. Blizard DA. Sex differences in running-wheel behaviour in the rat: the inductive and activational effects of gonadal hormones. *Anim Behav*. (1983) 31:378–84. doi: 10.1016/S0003-3472(83)80056-6
 75. Jones LC, Bellingham WP, Ward LC. Sex differences in voluntary locomotor activity of food-restricted and *ad libitum*-fed rats. Implications for the maintenance of a body weight set-point. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. (1990) 96:287–90. doi: 10.1016/0300-9629(90)90694-N
 76. Branyan KW, DeVallance ER, Lemaster KA, Skinner RC, Bryner RW, Olfert IM, et al. Role of chronic stress and exercise on microvascular function in metabolic syndrome. *Med Sci Sports*. (2018) 50:957–66. doi: 10.1249/MSS.0000000000001531
 77. Kawashima H, Saito T, Yoshizato H, Fujikawa T, Sato Y, McEwen BS, et al. Endurance treadmill training in rats alters CRH activity in the hypothalamic paraventricular nucleus at rest and during acute running according to its period. *Life Sci*. (2004) 76:763–74. doi: 10.1016/j.lfs.2004.09.014
 78. Droste SK, Chandromohan Y, Hill LE, Linthorst ACE, Reul JMHM. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level. *Neuroendocrinology*. (2007) 86:26–37. doi: 10.1159/000104770
 79. Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Richtand NM, Herman JP. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology*. (2006) 147:2008–17. doi: 10.1210/en.2005-1041
 80. Heck AL, Handa RJ. Sex differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis’ response to stress: an important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology*. (2019) 44:45–58. doi: 10.1038/s41386-018-0167-9
 81. Beery AK, Kaufner D. Stress, social behavior and resilience: insights for rodents. *Neurobiol Stress*. (2015) 1:116–27. doi: 10.1016/j.ynstr.2014.10.004
 82. Weintraub A, Singaravelu J, Bhatnagar S. Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. *Brain Res*. (2010) 1343:83–92. doi: 10.1016/j.brainres.2010.04.068

83. Janhg JW, Yoo SB, Ryu V, Lee J-H. Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats. *Int J Dev Neurosci.* (2012) 30:47–53. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2011.10.001
84. Bale TL, Epperson CN. Sex differences and stress across the lifespan. *Nat Neurosci.* (2015) 18:1413–20. doi: 10.1038/nn.4112
85. Jiayu C, Weiyi Y. Influence of acute and chronic treadmill exercise on rat brain POMC gene expression. *Med Sci Sport Exerc.* (2000) 32:954–7. doi: 10.1097/00005768-200005000-00012
86. Bi S, Scott KA, Hyun J, Ladenheim EE, Moran TH. Running wheel activity prevents hyperphagia and obesity in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats: role of hypothalamic signaling. *Endocrinology.* (2005) 146:1676–85. doi: 10.1210/en.2004-1441
87. Chen J-X, Zhao X, Yue G-X, Wang Z-F. Influence of acute and chronic treadmill exercise on rat plasma lactate and brain NPY, L-ENK, DYN A1-13. *Cell Mol Neurobiol.* (2007) 27:1–10. doi: 10.1007/s10571-006-9110-4
88. Coppola A, Meli R, Diano S. Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology.* (2005) 146:2827–33. doi: 10.1210/en.2004-1361
89. Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab.* (2014) 19:741–56. doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.007
90. Dewal RS, Stanford KI. Effects of exercise on brown and beige adipocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* (2019) 1864:71–8. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.04.013
91. Slocum N, Durrant JR, Bailey D, Yoon L, Jordan H, Barton J. Responses of brown adipose tissue to diet-induced obesity, exercise, dietary restriction and ephedrine treatment. *Exp Toxicol Pathol.* (2013) 65:549–57. doi: 10.1016/j.etp.2012.04.001
92. De Matties R, Lucertini F, Guescini M, Polidori E, Zeppa S, Stocchi V, et al. Exercise as new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* (2013) 23:582–90. doi: 10.1016/j.numecd.2012.01.013
93. Barbosa de Queiroz K, Rodovalho GV, Guimaraes JB, Carvalho de Lima D, Coimbra CC, Evangelista EA, et al. Endurance training blocks uncoupling protein 1 up-regulation in brown adipose tissue while increasing uncoupling protein 3 in the muscle tissue of rats fed with high-sugar diet. *Nutr Res.* (2012) 32:709–17. doi: 10.1016/j.nutres.2012.06.020

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Parra-Montes de Oca, Gutiérrez-Mariscal, Salmerón-Jiménez, Jaimes-Hoy, Charli and Joseph-Bravo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Anexo 5. Resultados de las ANOVA del protocolo de aislamiento social y ejercicio voluntario alternado (Gráficas)

	Sexo		Estrés		Actividad		Sexo*Estrés		Sexo*Actividad		Estrés* Actividad		Sexo*Estrés*Actividad	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
TAB gonad (%)	F _{1,46} 6.333	0.015	F _{1,46} 9.435	0.004	F _{1,46} 2.287	0.137	F _{1,46} 0.006	0.937	F _{1,46} 2.128	0.151	F _{1,46} 0.949	0.335	F _{1,46} 0.957	0.333
TAB retro (%)	F _{1,45} 3.929	0.054	F _{1,45} 5.291	0.026	F _{1,45} 1.421	0.239	F _{1,45} 1.060	0.309	F _{1,45} 0.987	0.326	F _{1,45} 0.651	0.424	F _{1,45} 0.091	0.764
TAB inter (%)	F _{1,48} 7.579	0.008	F _{1,48} 6.621	0.112	F _{1,48} 4.173	0.047	F _{1,48} 1.654	0.205	F _{1,48} 0.651	0.437	F _{1,48} 0.266	0.609	F _{1,48} 0.041	0.841
PVN: <i>Crh</i> mRNA (%)	F _{1,39} 17.034	<0.001	F _{1,39} 3.004	0.091	F _{1,39} 0.530	0.471	F _{1,39} 18.919	<0.001	F _{1,39} 0.161	0.691	F _{1,39} 0.183	0.671	F _{1,39} 0.388	0.537
PVN: <i>Gr</i> mRNA (%)	F _{1,43} 0.457	0.503	F _{1,43} 0.293	0.591	F _{1,43} 2.303	0.136	F _{1,43} 5.759	0.021	F _{1,43} 1.856	0.180	F _{1,43} 3.381	0.073	F _{1,43} 0.131	0.720
Cort (%)	F _{1,43} 4.758	0.035	F _{1,43} 7.733	0.008	F _{1,43} 3.899	0.055	F _{1,43} 0.0006	0.980	F _{1,43} 0.633	0.431	F _{1,43} 2.156	0.149	F _{1,43} 1.992	0.165
MBH: <i>Pomc</i> mRNA (%)	F _{1,28} 4.876	0.036	F _{1,28} 18.240	<0.001	F _{1,28} 15.031	<0.001	F _{1,28} 0.0004	0.983	F _{1,28} 12.028	0.002	F _{1,28} 1.461	0.237	F _{1,28} 1.534	0.226
MBH: <i>Npy</i> mRNA (%)	F _{1,45} 0.626	0.433	F _{1,45} 8.649	0.005	F _{1,45} 2.136	0.151	F _{1,45} 16.537	<0.001	F _{1,45} 17.292	<0.001	F _{1,45} 25.590	<0.001	F _{1,45} 0.799	0.382
MBH: <i>Dio2</i> mRNA (%)	F _{1,40} 1.795	0.188	F _{1,40} 0.001	0.972	F _{1,40} 0.065	0.800	F _{1,40} 0.165	0.687	F _{1,40} 10.612	0.002	F _{1,40} 0.054	0.817	F _{1,40} 17.56	<0.001
MBH: <i>Trhde</i> mRNA (%)	F _{1,24} 0.819	0.374	F _{1,24} 21.963	<0.001	F _{1,24} 8.594	0.007	F _{1,24} 10.072	0.004	F _{1,24} 4.697	0.040	F _{1,24} 0.473	0.498	F _{1,24} 3.654	0.068
PVN: <i>Trh</i> mRNA (%)	F _{1,43} 4.853	0.033	F _{1,43} 0.245	0.623	F _{1,43} 1.880	0.177	F _{1,43} 0.066	0.798	F _{1,43} 3.203	0.081	F _{1,43} 5.648	0.022	F _{1,43} 0.024	0.877
TSH (%)	F _{1,52} 3.350	0.073	F _{1,52} 1.207	0.277	F _{1,52} 0.040	0.842	F _{1,52} 1.946	0.169	F _{1,52} 10.789	0.002	F _{1,52} 3.240	0.078	F _{1,52} 0.004	0.953
T3 (%)	F _{1,55} 0.538	0.538	F _{1,55} 3.756	0.058	F _{1,55} 3.047	0.086	F _{1,55} 4.872	0.034	F _{1,55} 0.110	0.741	F _{1,55} 2.059	0.157	F _{1,55} 2.823	0.099
T4 (%)	F _{1,54} 10.783	0.002	F _{1,54} 0.026	0.873	F _{1,54} 0.037	0.847	F _{1,54} 11.938	0.001	F _{1,54} 0.460	0.500	F _{1,54} 0.258	0.614	F _{1,54} 0.722	0.399
TAP: <i>Adrb3</i> mRNA (%)	F _{1,27} 0.905	0.350	F _{1,27} 1.410	0.245	F _{1,27} 14.664	<0.001	F _{1,27} 5.918	0.022	F _{1,27} 2.728	0.110	F _{1,27} 0.042	0.840	F _{1,27} 0.029	0.866
TAP: <i>Dio2</i> mRNA (%)	F _{1,29} 8.747	0.006	F _{1,29} 1.308	0.262	F _{1,29} 3.913	0.057	F _{1,29} 0.665	0.421	F _{1,29} 9.867	0.004	F _{1,29} 1.035	0.317	F _{1,29} 0.999	0.326
TAP: <i>Ucp1</i> mRNA (%)	F _{1,31} 3.353	0.077	F _{1,31} 1.446	0.238	F _{1,31} 19.155	<0.001	F _{1,31} 13.447	<0.001	F _{1,31} 0.329	0.570	F _{1,31} 4.736	0.037	F _{1,31} 1.593	0.216

Anexo 6. Efecto del estrés crónico variable durante la adolescencia en el aprendizaje no asociativo en la prueba de campo abierto en ratas macho y hembra.

	D Cen (m)	D Per (m)	D Total (m)
MACHOS			
<i>C</i>			
DPN 44	2 ± 0.3	71 ± 3	73 ± 3
DPN 58	2 ± 0.4	65 ± 5	67 ± 5
<i>ECV</i>			
DPN 44	2 ± 0.4	70 ± 4	72 ± 4
DPN 58	3 ± 0.6	70 ± 3	73 ± 4
HEMBRAS			
<i>C</i>			
DPN 44	8 ± 0.8	77 ± 2	85 ± 2
DPN 58	10 ± 0.8	81 ± 2.2	91 ± 2.3
<i>ECV</i>			
DPN 44	6 ± 0.7	73 ± 2.2	79 ± 2.6
DPN 58	6 ± 0.7	82 ± 2.3**	88 ± 2.6*

C: grupo control; ECV: grupo sometido a estrés crónico variable; DPN: día postnatal; D: distancia recorrida; Cen: zona centro; Per: zona periférica. Los resultados están expresados en promedio ± esm de dos experimentos independientes y analizados por *t* de student ($\alpha=0.05$). *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ C vs. ECV.

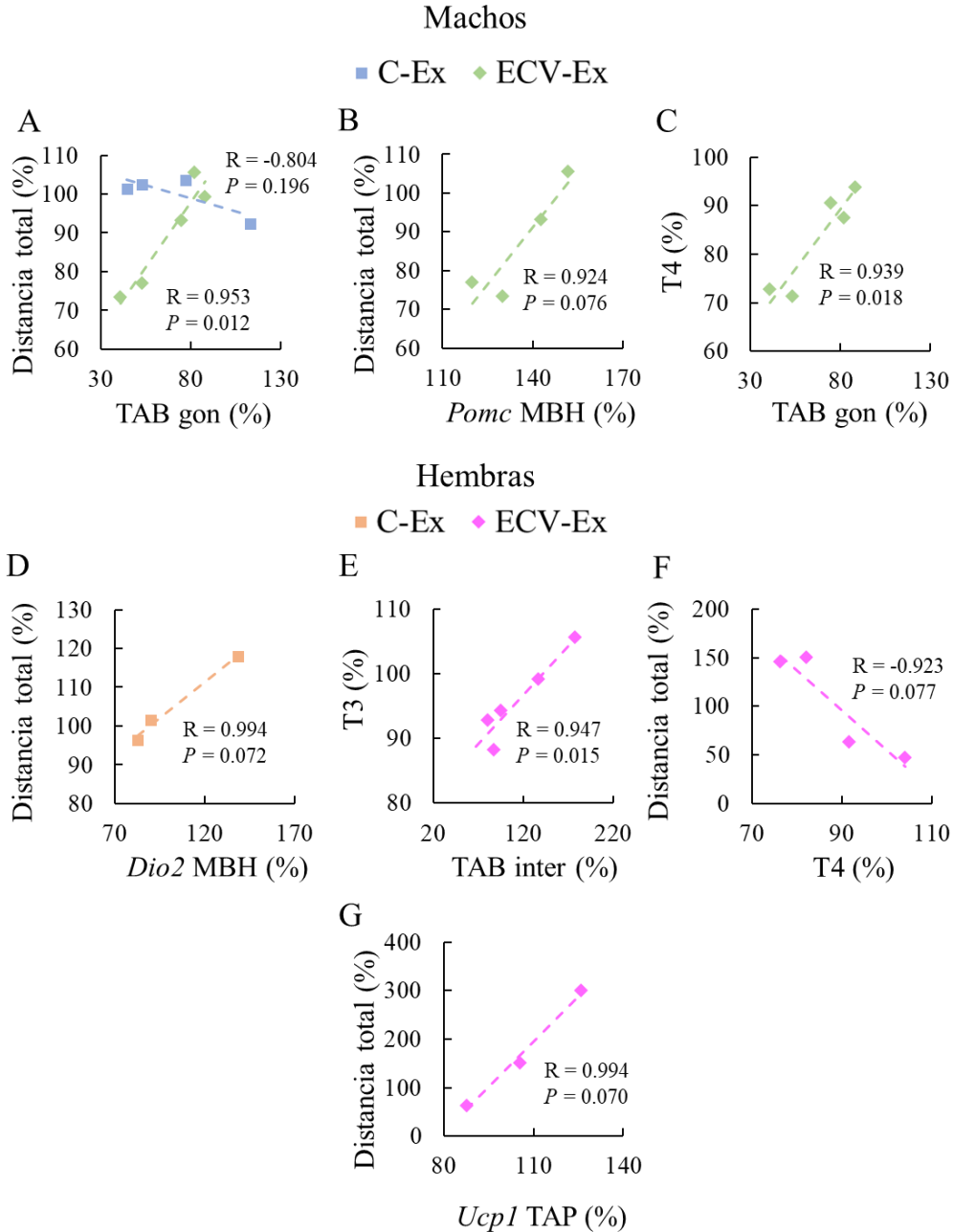
Anexo 7A. Resultados de las ANOVA del protocolo de estrés crónico variable durante la adolescencia y ejercicio voluntario diario (Tabla 7)

	Sexo		Estrés		Actividad		Sexo*Estrés		Sexo*Actividad		Estrés*Actividad		Sexo*Estrés*Actividad	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
GPC (% de Peso inicial)	F _{1,57} 30.09	<0.0001	F _{1,57} 0.456	0.502	F _{2,57} 68.10	<0.0001	F _{1,57} 3.339	0.073	F _{2,57} 1.702	0.191	F _{2,57} 3.997	0.024	F _{2,57} 1.503	0.231
CAD (g)	F _{1,56} 292.0	<0.0001	F _{1,56} 3.757	0.058	F _{2,56} 90.04	<0.0001	F _{1,56} 2.529	0.117	F _{2,56} 1.080	0.346	F _{2,56} 0.950	0.393	F _{2,56} 0.020	0.980
TAB gonad (g)	F _{1,57} 55.13	<0.0001	F _{1,57} 0.520	0.474	F _{2,57} 7.875	0.001	F _{1,57} 0.247	0.621	F _{2,57} 2.008	0.144	F _{2,57} 0.398	0.673	F _{2,57} 0.648	0.527
TAB retro (g)	F _{1,57} 139.7	<0.0001	F _{1,57} 0.006	0.940	F _{2,57} 5.418	0.007	F _{1,57} 0.056	0.814	F _{2,57} 0.864	0.427	F _{2,57} 1.094	0.342	F _{2,57} 0.143	0.867
TAB inter (g)	F _{1,50} 0.075	0.786	F _{1,50} 0.061	0.806	F _{2,50} 3.271	0.046	F _{1,50} 2.101	0.154	F _{2,50} 0.281	0.756	F _{2,50} 2.009	0.145	F _{2,50} 1.020	0.368
PVN: <i>Crh</i> mRNA (%)	F _{1,51} 18.03	<0.0001	F _{1,51} 49.11	<0.0001	F _{2,51} 3.998	0.024	F _{1,51} 0.601	0.442	F _{2,51} 1.059	0.354	F _{2,51} 4.184	0.021	F _{2,51} 6.575	0.003
PVN: <i>Avp</i> mRNA (%)	F _{1,55} 5.847	0.019	F _{1,55} 51.09	<0.0001	F _{2,55} 11.25	<0.0001	F _{1,55} 1.005	0.320	F _{2,55} 0.509	0.604	F _{2,55} 2.468	0.094	F _{2,55} 12.53	<0.0001
PVN: <i>Gr</i> mRNA (%)	F _{1,52} 17.47	0.0001	F _{1,52} 9.271	0.004	F _{2,52} 7.602	0.001	F _{1,52} 9.560	0.003	F _{2,52} 1.978	0.149	F _{2,52} 0.153	0.858	F _{2,52} 2.317	0.109
Cort (ng/ml)	F _{1,53} 2744	<0.0001	F _{1,53} 419.0	<0.0001	F _{2,53} 573.8	<0.0001	F _{1,53} 173.9	<0.0001	F _{2,53} 195.4	<0.0001	F _{2,53} 253.1	<0.0001	F _{2,53} 102.0	<0.0001
MBH: <i>Pomc</i> mRNA (%)	F _{1,50} 11.28	0.002	F _{1,50} 56.14	<0.0001	F _{2,50} 34.50	<0.0001	F _{1,50} 0.867	0.356	F _{2,50} 1.738	0.186	F _{2,50} 24.94	<0.0001	F _{2,50} 3.369	0.042
MBH: <i>Npy</i> mRNA (%)	F _{1,46} 5.724	0.021	F _{1,46} 24.57	<0.0001	F _{2,46} 9.985	0.0003	F _{1,46} 6.077	0.018	F _{2,46} 0.173	0.841	F _{2,46} 4.344	0.019	F _{2,46} 1.992	0.148
MBH: <i>Dio2</i> mRNA (%)	F _{1,53} 2.173	0.146	F _{1,53} 52.86	<0.0001	F _{2,53} 1.194	0.311	F _{1,53} 10.68	0.002	F _{2,53} 2.993	0.056	F _{2,53} 4.083	0.022	F _{2,53} 3.888	0.027
MBH: <i>Trhde</i> mRNA (%)	F _{1,53} 10.50	0.002	F _{1,53} 0.093	0.761	F _{2,53} 0.638	0.532	F _{1,53} 0.041	0.840	F _{2,53} 0.269	0.765	F _{2,53} 0.180	0.836	F _{2,53} 2.571	0.086
PVN: <i>Trh</i> mRNA (%)	F _{1,45} 2.046	0.159	F _{1,45} 40.10	<0.0001	F _{2,45} 6.747	0.003	F _{1,45} 16.86	0.0002	F _{2,45} 0.337	0.716	F _{2,45} 0.867	0.427	F _{2,45} 6.419	0.004
TSH (ng/ml)	F _{1,48} 89.85	<0.0001	F _{1,48} 5.285	0.026	F _{2,48} 24.38	<0.0001	F _{1,48} 0.820	0.370	F _{2,48} 7.712	0.001	F _{2,48} 5.384	0.008	F _{2,48} 0.065	0.938
T4 (µg/dl)	F _{1,50} 1.890	0.175	F _{1,50} 27.67	<0.0001	F _{2,50} 4.263	0.019	F _{1,50} 0.362	0.550	F _{2,50} 0.334	0.718	F _{2,50} 5.880	0.005	F _{2,50} 1.286	0.285
T3 (ng/ml)	F _{1,49} 14.81	0.0003	F _{1,49} 1.801	0.186	F _{2,49} 1.037	0.362	F _{1,49} 0.134	0.716	F _{2,49} 6.435	0.003	F _{2,49} 0.333	0.718	F _{2,49} 2.976	0.061

Anexo 7B. Resultados de las ANOVA del protocolo de estrés crónico variable durante la adolescencia y ejercicio voluntario diario (Gráficas)

	Sexo		Estrés		Actividad		Sexo*Estrés		Sexo*Actividad		Estrés* Actividad		Sexo*Estrés*Actividad	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
TAB gonad (%)	F _{1,37} 0.102	0.751	F _{1,37} 1.060	0.310	F _{1,37} 7.850	0.0081	F _{1,37} 0.136	0.715	F _{1,37} 0.171	0.681	F _{1,37} 0.595	0.446	F _{1,37} 1.210	0.278
TAB retro (%)	F _{1,37} 0.739	0.395	F _{1,37} 0.244	0.624	F _{1,37} 6.626	0.0142	F _{1,37} 0.089	0.309	F _{1,37} 0.0123	0.912	F _{1,37} 2.292	0.138	F _{1,37} 0.453	0.505
TAB inter (%)	F _{1,33} 0.147	0.704	F _{1,33} 0.008	0.929	F _{1,33} 5.587	0.0241	F _{1,33} 2.285	0.140	F _{1,33} 0.240	0.627	F _{1,33} 3.967	0.055	F _{1,33} 1.973	0.169
PVN: <i>Crh</i> mRNA (%)	F _{1,32} 4.190	0.049	F _{1,32} 43.84	<0.0001	F _{1,32} 3.977	0.055	F _{1,32} 0.141	0.709	F _{1,32} 0.530	0.472	F _{1,32} 3.405	0.074	F _{1,32} 5.756	0.022
PVN: <i>Avp</i> mRNA (%)	F _{1,36} 22.06	<0.0001	F _{1,36} 54.41	<0.0001	F _{1,36} 9.882	0.003	F _{1,36} 4.760	0.036	F _{1,36} 3.420	0.073	F _{1,36} 0.589	0.448	F _{1,36} 25.29	<0.0001
PVN: <i>Gr</i> mRNA (%)	F _{1,34} 1.883	0.179	F _{1,34} 6.787	0.013	F _{1,34} 12.89	0.001	F _{1,34} 1.349	0.254	F _{1,34} 1.700	0.201	F _{1,34} 0.003	0.959	F _{1,34} 1.512	0.227
Cort (%)	F _{1,35} 7.922	0.008	F _{1,35} 186.1	<0.0001	F _{1,35} 203.6	<0.0001	F _{1,35} 20.63	<0.0001	F _{1,35} 1.236	0.274	F _{1,35} 129.9	<0.0001	F _{1,35} 0.378	0.542
MBH: <i>Pomc</i> mRNA (%)	F _{1,32} 1.231	0.275	F _{1,32} 79.04	<0.0001	F _{1,32} 70.73	<0.0001	F _{1,32} 0.856	0.362	F _{1,32} 0.001	0.974	F _{1,32} 25.83	<0.0001	F _{1,32} 4.277	0.047
MBH: <i>Npy</i> mRNA (%)	F _{1,28} 0.121	0.731	F _{1,28} 28.28	<0.0001	F _{1,28} 0.0001	0.992	F _{1,28} 1.909	0.178	F _{1,28} 0.009	0.923	F _{1,28} 0.588	0.450	F _{1,28} 3.334	0.079
MBH: <i>Dio2</i> mRNA (%)	F _{1,33} 0.075	0.786	F _{1,33} 51.16	<0.0001	F _{1,33} 1.885	0.179	F _{1,33} 14.44	0.0006	F _{1,33} 5.367	0.027	F _{1,33} 5.939	0.020	F _{1,33} 3.086	0.088
MBH: <i>Trh</i> mRNA (%)	F _{1,33} 0.418	0.522	F _{1,33} 0.049	0.827	F _{1,33} 1.113	0.299	F _{1,33} 1.376	0.249	F _{1,33} 0.447	0.508	F _{1,33} 0.004	0.953	F _{1,33} 0.020	0.888
PVN: <i>Trh</i> mRNA (%)	F _{1,32} 10.61	0.003	F _{1,32} 12.48	0.001	F _{1,32} 8.390	0.007	F _{1,32} 13.27	0.0009	F _{1,32} 0.297	0.590	F _{1,32} 1.218	0.278	F _{1,32} 0.863	0.360
TSH (%)	F _{1,30} 0.350	0.558	F _{1,30} 2.479	0.126	F _{1,30} 0.780	0.384	F _{1,30} 0.287	0.596	F _{1,30} 0.041	0.840	F _{1,30} 12.79	0.001	F _{1,30} 0.855	0.362
T4 (%)	F _{1,31} 4.352	0.045	F _{1,31} 30.28	<0.0001	F _{1,31} 0.643	0.429	F _{1,31} 0.388	0.538	F _{1,31} 0.091	0.765	F _{1,31} 5.827	0.022	F _{1,31} 1.351	0.254
T3 (%)	F _{1,32} 13.05	0.001	F _{1,32} 0.908	0.348	F _{1,32} 0.007	0.935	F _{1,32} 0.592	0.448	F _{1,32} 5.567	0.025	F _{1,32} 0.827	0.370	F _{1,32} 4.091	0.052
TAB: <i>Adrb3</i> mRNA (%)	F _{1,33} 250.8	<0.0001	F _{1,33} 637.4	<0.0001	F _{1,33} 5493	<0.0001	F _{1,33} 39.27	<0.0001	F _{1,33} 259.3	<0.0001	F _{1,33} 268.5	<0.0001	F _{1,33} 42.69	<0.0001
TAB: <i>Dio2</i> mRNA (%)	F _{1,34} 48.95	<0.0001	F _{1,34} 411.6	<0.0001	F _{1,34} 1448	<0.0001	F _{1,34} 0.139	0.712	F _{1,34} 76.38	<0.0001	F _{1,34} 148.5	<0.0001	F _{1,34} 1.877	0.180
TAB: <i>Pparg</i> mRNA (%)	F _{1,30} 325.3	<0.0001	F _{1,30} 646.0	<0.0001	F _{1,30} 2473	<0.0001	F _{1,30} 103.9	<0.0001	F _{1,30} 0.187	0.669	F _{1,30} 871.8	<0.0001	F _{1,30} 68.50	<0.0001
TAB: <i>Hsl</i> mRNA (%)	F _{1,35} 0.466	0.499	F _{1,35} 245.7	<0.0001	F _{1,35} 0.279	0.601	F _{1,35} 1.046	0.314	F _{1,35} 0.166	0.686	F _{1,35} 0.162	0.690	F _{1,35} 0.559	0.460
ME: <i>Dio2</i> mRNA (%)	F _{1,32} 0.684	0.414	F _{1,32} 18.13	0.0002	F _{1,32} 0.532	0.471	F _{1,32} 1.627	0.211	F _{1,32} 1.065	0.310	F _{1,32} 1.322	0.259	F _{1,32} 0.341	0.564
ME: <i>Pgc1a</i> mRNA (%)	F _{1,32} 3.140	0.086	F _{1,32} 3.263	0.080	F _{1,32} 16.69	0.0003	F _{1,32} 1.781	0.191	F _{1,32} 0.059	0.810	F _{1,32} 1.282	0.266	F _{1,32} 0.462	0.502
TAP: <i>Adrb3</i> mRNA (%)	F _{1,34} 8.641	0.006	F _{1,34} 0.292	0.592	F _{1,34} 2.096	0.157	F _{1,34} 1.316	0.259	F _{1,34} 1.526	0.225	F _{1,34} 10.84	0.002	F _{1,34} 9.168	0.005
TAP: <i>Dio2</i> mRNA (%)	F _{1,31} 1.079	0.307	F _{1,31} 1.894	0.179	F _{1,31} 4.548	0.041	F _{1,31} 0.0004	0.984	F _{1,31} 11.69	0.002	F _{1,31} 0.354	0.556	F _{1,31} 5.758	0.023
TAP: <i>Ucp1</i> mRNA (%)	F _{1,31} 18.85	0.0001	F _{1,31} 11.65	0.002	F _{1,31} 16.31	0.0003	F _{1,31} 0.126	0.725	F _{1,31} 2.995	0.094	F _{1,31} 24.74	<0.0001	F _{1,31} 8.795	0.006

Anexo 8.



Correlaciones observadas en los grupos ejercitados de ratas macho y hembra. **A:** Correlación entre el peso del tejido adiposo blanco (TAB) gonadal y la distancia total recorrida en machos C-Ex y ECV-Ex. **B:** Correlación entre la expresión de *Pomc* en hipotálamo medio-basal (MBH) y la distancia total recorrida en machos ECV-Ex. **C:** Correlación entre el peso del TAB gonadal y la concentración sérica de T4 en machos ECV-Ex. **D:** Correlación entre la expresión de *Dio2* en MBH y la distancia total recorrida en hembras C-Ex. **E:** Correlación entre el peso del TAB interescapular y la concentración sérica de T3 en hembras ECV-Ex. **F:** Correlación entre la concentración sérica de T4 y la distancia total recorrida en hembras ECV-Ex. **G:** Correlación entre la expresión de *Ucp1* en tejido adiposo pardo (TAB) y la distancia total recorrida.