



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría en Ciencias Bioquímicas**

Efectos del aislamiento social a partir de la adolescencia en la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides en respuesta a la exposición al frío

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Diego Rodríguez Sarmiento

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy  
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Celina García Melendrez  
Instituto de Biotecnología

Dra. Leonor Perez Martinez  
Instituto de Biotecnología

Dra. Edith Sanchez-Jaramillo  
Instituto de Biotecnología

Dra. Denhi Schnabel Peraza  
Instituto de Biotecnología

Dra. Angélica Santana Calderón  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Cuernavaca, Morelos

octubre, 2018



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.

## **Agradecimientos**

A mi tutora, la Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy, le quiero agradecer su orientación y paciencia infinita en la elaboración de este proyecto.

También quiero agradecer a los miembros del laboratorio que proveyeron valiosos comentarios durante los seminarios del grupo de la Dra. Patricia Ileana Joseph y del Dr. Jean-Louis Charli y que me brindaron apoyo y orientación durante toda la maestría.

A la Química Fidelia Romero Arteaga le quiero agradecer su ayuda con la extracción de ARN de diversos tejidos, sus enseñanzas para los protocolos usados en el laboratorio y su trabajo en general para apoyar con este proyecto.

Al Q.F.B. Miguel Cisneros Ramírez quiero agradecerle por su apoyo para la elaboración de radioinmunoensayos y pruebas ELISA que fueron necesarios para este proyecto.

A Manuel Villa Herrera quiero agradecerle por su ayuda en el bioterio con el cuidado de los animales utilizados para los experimentos de este proyecto.

A mi mamá, que me ha apoyado durante toda mi educación y durante toda mi vida.

A mi novia, que ha estado a mi lado desde que nos conocimos y que aún me sigue soportando.

Finalmente, quiero agradecer al apoyo otorgado por la UNAM-DGAPA-PAPIIT IA201515 y IA200417.

## Índice general

<b>Índice de figuras y tablas</b> .....	<b>iii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>2</b>
El eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA).....	<b>3</b>
El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT).....	<b>5</b>
La termogénesis durante el frío.....	<b>8</b>
La adolescencia en ratas.....	<b>10</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>12</b>
El aislamiento social durante la adolescencia.....	<b>12</b>
Diferencias de los efectos del estrés dependientes del sexo del individuo.....	<b>13</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>14</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>15</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>15</b>
Objetivo general.....	<b>15</b>
Objetivos particulares.....	<b>16</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>16</b>
Animales.....	<b>16</b>
Estrés por aislamiento general.....	<b>16</b>
Estrés por exposición al frío.....	<b>17</b>
Extracción de ARN total por el método de tiocianato de guanidina.....	<b>19</b>
Medición de la expresión génica mediante RT-PCR de tiempo final.....	<b>20</b>
Oligonucleótidos complementarios para RT-PCR de punto final y condiciones de amplificación para cada gen.....	<b>20</b>

Cuantificación de la concentración sérica de hormonas por ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay).....	21
Medición de la concentración sérica de hormonas mediante Radioinmunoensayo (RIA).....	22
Medición de la actividad de la desyodasa 2 mediante ensayo radiométrico.....	22
Medición de la temperatura corporal.....	23
Análisis estadístico.....	23
<b>Resultados</b> .....	<b>24</b>
Efecto del aislamiento social sobre el peso corporal y el consumo de alimento.....	25
Efecto del aislamiento social y el frío sobre el peso del tejido adiposo, las glándulas adrenales y la concentración sérica de corticosterona.....	25
Efecto del aislamiento social y el frío sobre la actividad del eje HPT.....	29
Efecto del aislamiento social y el frío en el tejido adiposo pardo sobre la temperatura corporal y el tejido adiposo pardo.....	34
<b>Discusión</b> .....	<b>38</b>
Efecto del aislamiento social y el frío sobre el peso corporal y el tejido adiposo.....	39
Efecto del aislamiento social y el frío sobre las glándulas adrenales y la concentración sérica de corticosterona.....	40
Efecto del aislamiento social y el frío sobre la actividad del eje HPT.....	41
Efecto del aislamiento social y el frío en el tejido adiposo pardo.....	44
<b>Conclusiones</b> .....	<b>46</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>48</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>49</b>

## Índice de figuras y tablas

<b>Ilustración 1.</b> Diagrama del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal.....	<b>4</b>
<b>Ilustración 2.</b> Diagrama del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides.....	<b>8</b>
<b>Ilustración 3.</b> Diagrama de la adaptación termogénica.....	<b>9</b>
<b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos complementarios para RT-PCR de punto final y condiciones de amplificación para cada gen.....	<b>20</b>
<b>Figura 1.</b> Peso corporal de los animales.....	<b>24</b>
<b>Figura 2.</b> Promedio de alimento consumido diariamente en la adolescencia y adultez.....	<b>25</b>
<b>Figura 3.</b> Peso de la grasa parda en machos.....	<b>25</b>
<b>Figura 4.</b> Peso de la grasa parda en hembras.....	<b>26</b>
<b>Figura 5.</b> Peso de las glándulas adrenales de machos.....	<b>27</b>
<b>Figura 6.</b> Peso de las glándulas adrenales de hembras.....	<b>27</b>
<b>Figura 7.</b> Concentración sérica de corticosterona en ratas machos.....	<b>28</b>
<b>Figura 8.</b> Concentración sérica de corticosterona en ratas hembras Exp. 1.....	<b>28</b>
<b>Figura 9.</b> Concentración sérica de corticosterona en ratas hembras Exp. 2.....	<b>29</b>
<b>Figura 10.</b> Cuantificación de hormonas y genes del eje HPT de ratas machos.....	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b> Cuantificación de genes asociados con la regulación del eje HPT en HMB de ratas machos ( <i>Trhde</i> y <i>Dio2</i> ).....	<b>31</b>
<b>Figura 12.</b> Cuantificación de genes asociados con la regulación del eje HPT en adenohipófisis de ratas machos ( <i>Tshb</i> , <i>Dio2</i> y <i>Trh-R1</i> ).....	<b>31</b>
<b>Figura 13.</b> Cuantificación de hormonas y genes del eje HPT de ratas hembras, Exp. 1.....	<b>32</b>
<b>Figura 14.</b> Cuantificación de hormonas y genes del eje HPT de ratas hembras, Exp. 2.....	<b>33</b>
<b>Figura 15.</b> Cuantificación de genes asociados con la regulación del eje HPT	

en HMB de ratas hembras del Exp. 1 ( <i>Trhde</i> y <i>Dio2</i> ).....	33
<b>Figura 16.</b> Cuantificación de genes asociados con la regulación del eje HPT en adenohipófisis de ratas hembras del Exp. 2 ( <i>Tshb</i> , <i>Dio2</i> y <i>Trh-R1</i> ).....	34
<b>Tabla 2.</b> Temperatura corporal de ratas machos y hembras.....	35
<b>Figura 17.</b> Cuantificación de genes asociados con la termogénesis en tejido adiposo pardo de ratas macho.....	35
<b>Figura 18.</b> Cuantificación de genes asociados con la termogénesis en tejido adiposo pardo de ratas hembra del Exp.1.....	36
<b>Figura 19.</b> Cuantificación de genes asociados con la termogénesis en tejido adiposo pardo en ratas hembra del Exp. 2.....	37
<b>Figura 20.</b> Actividad de D2 en tejido adiposo pardo de ratas macho.....	38
<b>Figura 21.</b> Actividad de D2 en tejido adiposo pardo de ratas hembra.....	38
<b>Tabla 3.</b> Resumen de resultados.....	45
<b>Ilustración 4.</b> Resumen de los efectos que tiene el aislamiento social sobre el eje HPT y la termogénesis en tejido adiposo pardo en ratas machos y hembras.....	47

## Resumen

Estresores sociales como el aislamiento social o la separación materna pueden tener efectos a largo plazo en el desarrollo neuroendócrino de las ratas. Los efectos de estos estresores dependen de diversos factores, incluyendo la edad y el sexo del individuo, la duración del estresor y otros factores externos. La actividad del eje hipotálamo-pituitaria-tiroideas (HPT) es susceptible a varias formas de estrés. El objetivo del estudio fue determinar si el aislamiento social a partir del destete altera la actividad del eje HPT y su respuesta a un estresor ambiental, como el frío, en ratas macho y hembra adultas. También es de interés determinar si los efectos a largo plazo dependen del sexo del animal. Típicamente, la respuesta aguda a la exposición al frío incluye un aumento de la actividad del eje HPT, el cual comienza con un aumento de la expresión del gen de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV). Acompañando al aumento de expresión, también hay un aumento en la liberación de esta hormona de la eminencia media del hipotálamo. La TRH después estimula la síntesis y liberación de la tirotrópina (TSH) en la pituitaria anterior, la cual estimula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (HT) en la glándula tiroideas.

En este trabajo ratas Wistar macho y hembra se mantuvieron en aislamiento a partir del destete en el día postnatal (DP) 23 o se mantuvieron alojadas en compañía de otras ratas. Las ratas continuaron aisladas hasta la etapa adulta (DP 60). En el DP 60, la mitad de las ratas machos y hembras fueron expuestas a un ambiente frío (4°C) durante una hora, la otra mitad se mantuvo a temperatura ambiente (T. A.) sin perturbar. Todos los animales fueron sacrificados inmediatamente después de la hora de permanecer en el frío o T.A. Los niveles de ARNm de la *Trh* en el NPV; del *Trhr1*, *Tsh $\beta$*  y *Dio2* en la adenohipófisis y de genes asociados con la termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT) (*Adr $\beta$ 3*, *Pgc1a*, *Dio2* y *Ucp1*) fueron semi-cuantificados mediante RT-PCR de punto final. Las hormonas séricas (TSH, HT y corticosterona) fueron cuantificadas por radioinmunoensayos o ELISA. Encontramos que el aislamiento social provoca una reducción significativa de la concentración sérica de corticosterona en ratas hembras. El aislamiento social también provocó una disminución en la expresión de *Trhde* (el ARNm de PPII) y *Dio2* en el hipotálamo mediobasal (HMB) de ratas machos. En ratas machos aisladas socialmente expuestas a frío, disminuyó la concentración sérica de la TSH comparado con el grupo control. En las ratas hembras aisladas

y expuestas a frío no se observó esta disminución de la concentración sérica de TSH. En la adenohipofisis, no se detectaron diferencias en la expresión de genes entre los grupos. En BAT detectamos un aumento de la expresión de *Dio2* en ratas machos (el cual es uno de los genes relacionados a la termogénesis) cuando las ratas fueron expuestas a frío, y no vimos cambios que dependieran del aislamiento en ratas machos ni hembras. En conclusión, el aislamiento social induce diferencias en la actividad de la tiroides dependiendo del sexo del animal. El aislamiento social provoca que en las ratas machos se inhibiera parcialmente la activación del eje HPT en respuesta a la exposición al frío.

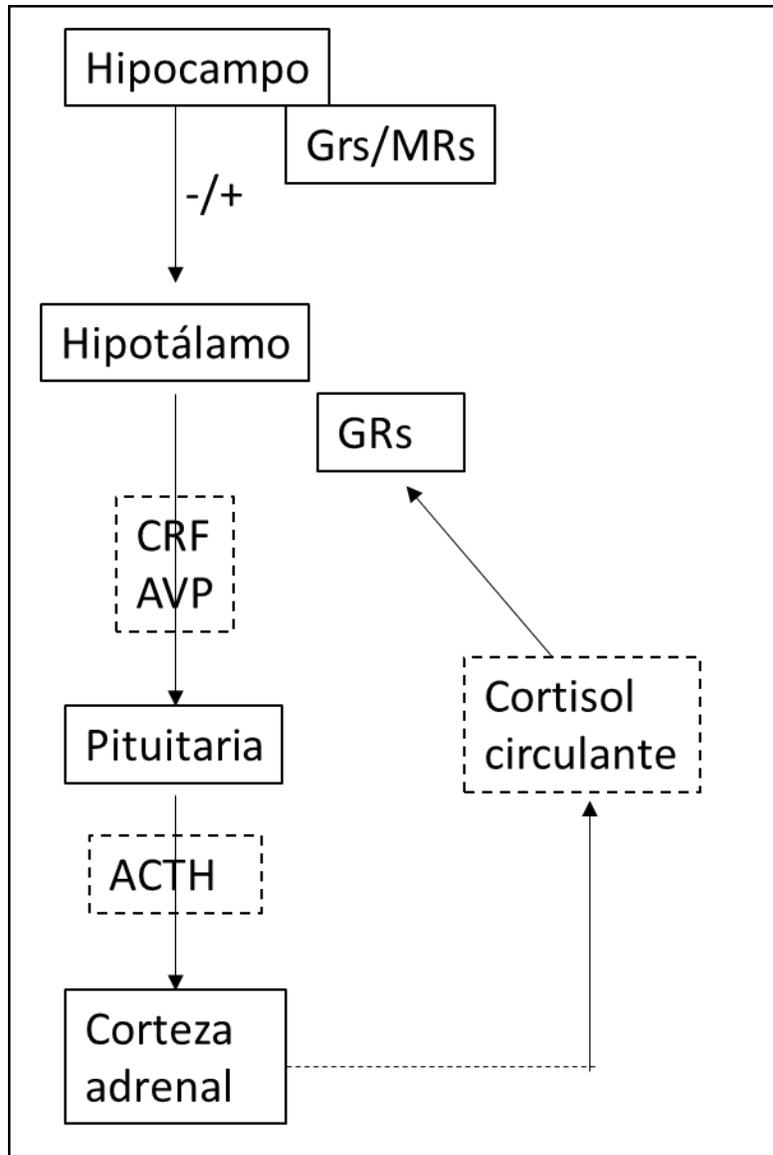
## 1. Introducción

Todos los días tenemos que lidiar con el estrés en alguna forma y esto impacta en la salud de cada individuo [Bolger, et al, 1989]. Desde que Hans Selye empezó a estudiar el estrés, los científicos han estado debatiendo acerca de la definición precisa de esta palabra [Koolhaas, et al, 2011]. En 1950, Selye describió que la reacción al estrés en todos los organismos tiene elementos comunes, y denominó a esta respuesta el síndrome de adaptación general [Selye, 1950]. Basado en esta observación, definió al estrés como “la respuesta no específica del cuerpo a un estímulo dañino”. En los siguientes años, para ayudar a refinar el concepto, empezó a usar la palabra estresor para referirse al estímulo que produce la amenaza a la homeostasis [Koolhaas, et al, 2011]. La homeostasis se define como la estabilidad de las condiciones que son esenciales para la vida, como el pH o la temperatura corporal [McEwen & Wingfield, 2003]. Debido a que las condiciones a las que los organismos están sujetos no son estables, frecuentemente se necesitan modificar varios sistemas para conservar la homeostasis. El cambio en estos sistemas fue denominado alostasis. Los procesos alostáticos no sólo mantienen la homeostasis en respuesta a cambios inmediatos, sino que pueden modificar aspectos más amplios de la supervivencia, como el comportamiento o la respuesta inmune. [McEwen & Wingfield, 2003]. La respuesta a los cambios en el ambiente puede llegar a ser inadecuada o demasiado prolongada. Esto ocasiona que el costo de mantener la homeostasis sea demasiado alto, lo que se conoce como carga alostática [Kloet, et al, 2005]. En algunos casos, los cambios a los que los sujetos están sometidos presentan una naturaleza cíclica (como el ciclo día-noche), por lo que los organismos forman ritmos biológicos, lo que permite que los mecanismos endógenos de los individuos se adapten a demandas del

ambiente desde antes de que se presenten [Arellanes-Licea & Díaz-Muñoz, 2012]. Un ejemplo de este tipo de adaptaciones se puede observar en los camellos. Éstos permiten que su temperatura corporal descienda durante la noche, ya que durante el día su temperatura aumenta mucho, y estar fríos retrasa este aumento. Los camellos sólo recurren a este método cuando están deshidratados, ya que no pueden utilizar la evaporación del agua para reducir su temperatura corporal durante el día [Mrosovsky, 1990]. Otro ejemplo en ratas podría ser el uso de cromóforos. Para poder percibir luz, los cromóforos de los fotorreceptores deben ser reemplazados luego de haber sido expuestos a luz muy brillante. Después de haber sido excitados por luz, los fotorreceptores de ratas gastan más cromóforos durante el día que durante la noche. Esto permite que la adaptación a la oscuridad de los fotorreceptores de las ratas sea más veloz durante la noche [Xue, et al, 2015]. Este concepto está íntimamente relacionado con la reostasis, la cual es una noción que se refiere a “los procesos fisiológicos encargados de adaptar las funciones orgánicas a los cambios en las necesidades del organismo” [Arellanes-Licea & Díaz-Muñoz, 2012]. Recientemente la definición de estrés ha sido puesta a revisión, proponiendo que éste se refiera sólo a condiciones donde la demanda exceda la capacidad regulativa natural del organismo [Koolhaas, et al, 2011].

### **1.1 El eje hipotálamo-pituitaria-adrenal**

El principal órgano encargado de regular la respuesta al estrés es el cerebro, donde empieza la coordinación de los dos sistemas principales encargados de controlar la respuesta al estrés: el sistema nervioso simpático (SNS) y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) [Koolhaas, et al, 2011]. Esta respuesta activa los mecanismos alostáticos necesarios para mantener la homeostasis. Como mencionamos anteriormente, estos mecanismos están sujetos a efectos a largo plazo que pueden modificar el funcionamiento del eje HPA [Frodl & O’Keane, 2013]. La regulación del eje HPA está caracterizada por la síntesis de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), la cual es liberada de la eminencia media hacia el sistema portahipofisario en respuesta a estímulos somáticos o a un estrés psicológico percibido. Esta hormona es transportada a las células corticotrópicas en la pituitaria anterior, donde activa la síntesis y liberación de la corticotropina (ACTH), la cual, a su vez, promueve la síntesis y liberación de glucocorticoides (principalmente cortisol en humanos y corticosterona en ratas) de las glán-



**Ilustración 1.** Diagrama del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal. Cuando (la presencia o acción de) un estresor es percibido, el hipotálamo libera hormona liberadora de corticotropina (CRH o CRF), que se sintetiza en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Los glucocorticoides pueden activar o inhibir al eje uniéndose a sus receptores en el hipocampo. El CRH promueve la síntesis y liberación de la corticotropina (ACTH) en la pituitaria. La corticotropina promueve la síntesis y liberación de los glucocorticoides en la corteza de la glándula adrenal. Los glucocorticoides causan cambios metabólicos en los tejidos blanco. Además, los glucocorticoides ejercen una retroalimentación negativa sobre la síntesis y liberación de la corticotropina y la hormona liberadora de corticotropina en la pituitaria y el núcleo paraventricular, respectivamente. Inflamación o traumas en edades tempranas pueden provocar que se altere la actividad del eje HPA. Obtenido de Pariante & Lightman, 2008

dulas adrenales. Los glucocorticoides ejercen una retroalimentación negativa sobre la síntesis y liberación de CRH y ACTH en el NPV y la pituitaria, respectivamente, regulando de esta forma su propia secreción [Myers, et al, 2014; Frodl & O’Keane, 2013]. En la ilustración 1

se puede observar el funcionamiento del eje HPA, el cual recibe señales regulatorias activadoras e inhibitoras del hipocampo. Ya liberado, el cortisol afecta el metabolismo de hueso y grasa [Fried, et al, 1998], la respuesta cardiovascular, la función inmune (la cual suprime) [Frodl & O'Keane, 2013], mantenimiento de la presión arterial [Ulrich-Lai, et al, 2006] y puede movilizar reservas energéticas para contender con la demanda que esté ejerciendo el estresor [Kloet, et al, 2005]. En animales sociales como ratas y humanos, el eje HPA contribuye a mecanismos que contribuyen a la supervivencia del grupo. En estas especies, el aislamiento social es considerado un potente estresor y puede provocar que el animal se vuelva más responsivo ante distintos estresores [Hawkley, et al, 2012], como el estrés por inmovilización o la exposición a frío [Dronjak, et al, 2004]. Afecciones del eje HPA pueden tener consecuencias negativas para el individuo, como se puede apreciar en pacientes con hipercortisolismo, los cuales muestran desarrollo prematuro de atrofia cerebral [Simmons, et al, 2000] y niveles elevados de ácidos grasos en la circulación [Xu, et al, 2009].

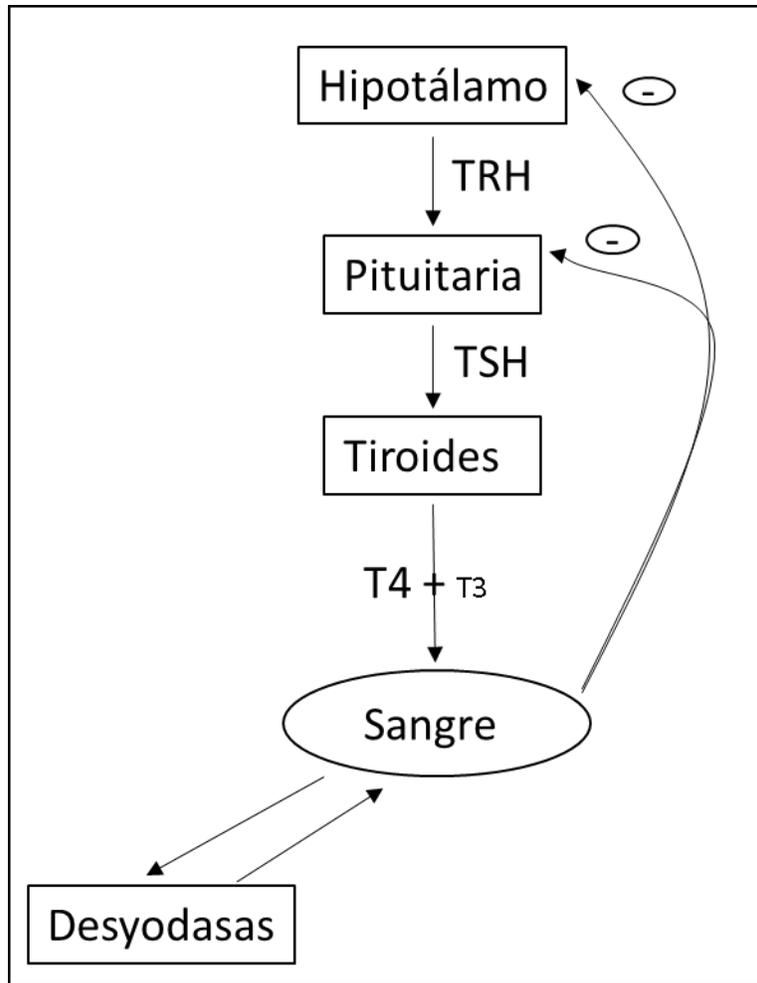
## **1.2 El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides**

Diversos estímulos ambientales pueden representar un estrés psicológico y/o físico, alterando la homeostasis energética del organismo [Maniam & Morris, 2012]. El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) es un importante regulador de esta homeostasis, y las hormonas tiroideas (HT) tienen un papel crucial en la regulación del metabolismo energético. El eje HPT es regulado por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la cual es sintetizada por neuronas hipofisiotrópicas del NPV. Los axones de estas neuronas tienen proyecciones hacia la eminencia media, donde las terminales sinápticas liberan a la TRH hacia el sistema portahipofisiario, que transporta la TRH hasta la pituitaria anterior. En la base del tercer ventrículo se encuentran células modificadas de origen glial, llamadas tanicitos que expresan a la piroglutamil peptidasa II (PPII o *Trhde*) en la membrana [Heuer, et al, 1998; Charli, et al, 1998] enzima que reconoce y degrada específicamente a la TRH liberada en la eminencia media [Sanchez, et al, 2009], pero no en la pituitaria anterior [Cruz, et al, 2008]. En la pituitaria anterior, la TRH se une a su receptor (TRH-R1) y controla la síntesis y liberación de la tirotrópina (TSH) [Fekete & Lechan, 2014]. Esta hormona, a su vez, activa la síntesis y

liberación de las hormonas tiroideas (HT) en la glándula tiroides [Fekete & Lechan, 2014]. Es mediante estas hormonas, que el eje HPT regula varias funciones biológicas en sus tejidos blanco (ej. hígado, músculo, tejido adiposo, corazón). La tetrayodotironina (T4) constituye la mayor parte de las HT sintetizadas en la glándula tiroides, aunque después es convertida a triyodotironina (T3) mediante la actividad de las desyodasas tipo 1 y 2 (D1 y D2). A pesar de que ambas hormonas son reconocidas por receptores en diversos tejidos, es T3 la que presenta mayor actividad biológica [Larsen, 1972]. La actividad de estas desyodasas varía entre tejidos [Joseph-Bravo, et al, 2015]. Es importante resaltar que las HT ejercen una retroalimentación negativa rigurosa sobre la síntesis y liberación tanto de TRH en el hipotálamo como de TSH en la pituitaria [Fekete & Lechan, 2014]. En la ilustración 2 se puede observar el funcionamiento de este eje. El balance energético negativo, como el ayuno o la restricción alimenticia, inhiben al eje tiroideo, disminuyendo la síntesis y liberación de TRH y por lo tanto de TSH y HT. Por el contrario, las demandas energéticas, como el ejercicio o la exposición al frío, activan al eje HPT, promoviendo un aumento de la síntesis y liberación de TRH, TSH y HT en el NPV, la pituitaria y la glándula tiroides, respectivamente [Joseph-Bravo, et al, 2015]. El eje HPT y el eje HPA guardan una estrecha relación, más allá de compartir el NPV y la pituitaria como partes integrales de su funcionamiento, por ejemplo, niveles circulantes de corticosterona pueden inhibir la actividad del eje HPT [Ahlquist, et al, 1989]. Congruentemente con esta observación, los choques eléctricos en las patas de ratas, que causan un aumento en la concentración sérica de corticosterona, provocan que se inhiba la actividad del eje HPT [Helmreich, et al, 2005]. En condiciones basales, se ha observado que hay una relación inversa entre la expresión de *Trh* en el NPV y los niveles en suero de HT [Fliers, et al, 2014]. Esta regulación dio origen al concepto de un punto de ajuste del eje HPT. El punto de ajuste del eje HPT es una relación fija entre TRH, TSH y HT. Cuando el punto de ajuste es modificado, cambia la relación entre estas hormonas. En pacientes hipotiroideos, frecuentemente se observa una concentración elevada de TSH en suero, mientras que en pacientes hipertiroideos se observan bajas concentraciones. Como resultado del punto de ajuste, en condiciones normales hay poca variación intra-individuos en los niveles basales de HT [Fliers, et al, 2014].

El efecto agudo del frío sobre la actividad del eje HPT es transitorio. En la rata, la concentración sérica de TSH aumenta desde la primera hora de exposición al frío, lo cual

coincide con el aumento en la expresión de *Trh* en el NPV [Uribe, et al, 1993]. El aumento en la concentración sérica de T3 se observa con tiempos prolongados de exposición al frío (6-30 h), regresando a valores basales a las 48 horas [Zoeller, et al, 1990]. En BAT la actividad de D2 aumenta continuamente las primeras 24 horas, al igual que la expresión de UCP-1 [Murakami, et al, 2001]. La respuesta del eje HPT a distintos estímulos (entre ellos la exposición al frío) depende de las condiciones fisiológicas y hormonales del individuo [Sotelo-Rivera, et al, 2014]. Por ejemplo, una inyección de corticosterona una hora antes de exponer a las ratas al frío inhibe el aumento de la expresión de *Trh* en el NPV medio y caudal, además de inhibir el aumento de la concentración sérica de TSH, T4 y la actividad de D2 en BAT [Sotelo-Rivera, et al, 2014]. El aislamiento por 2 horas antes de exponer a las ratas al frío, atenúa el aumento en la expresión de *Trh* del NPV [R. Uribe, et al, 2011]. En adición a esto, ratas aisladas por dos semanas muestran un aumento en los niveles basales del ARNm de *Avp* (Arginina Vasopresina, AVP) en el hipotálamo. La AVP es una hormona sintetizada en neuronas hipotalámicas. Esta hormona es un importante regulador de la presión arterial, y se observa un aumento en la síntesis y liberación de ésta al exponer a las ratas a frío [Angulo, et al, 1991]. Además, se ha mostrado que también puede promover la actividad del eje HPA [Chowdrey, et al, 1995]. Cuando se aísla a las ratas por una o dos semanas, y además se exponen a frío por 3 horas diarias durante 4 días consecutivos, ocurre un aumento mayor en los niveles basales del ARNm de *Avp* cuando se compara con el aislamiento o la exposición al frío por separado; esto muestra que el estrés psicológico se suma con el estrés metabólico para provocar cambios en la respuesta adaptativa al frío [Angulo, et al, 1991]. El mecanismo por el cual los glucocorticoides (GC) inhiben la actividad del eje HPT, contempla la activación de su receptor GR, que interfiere con el efecto estimulador de la norepinefrina sobre los niveles de ARNm de *Trh* [Sotelo-Rivera, et al, 2014].

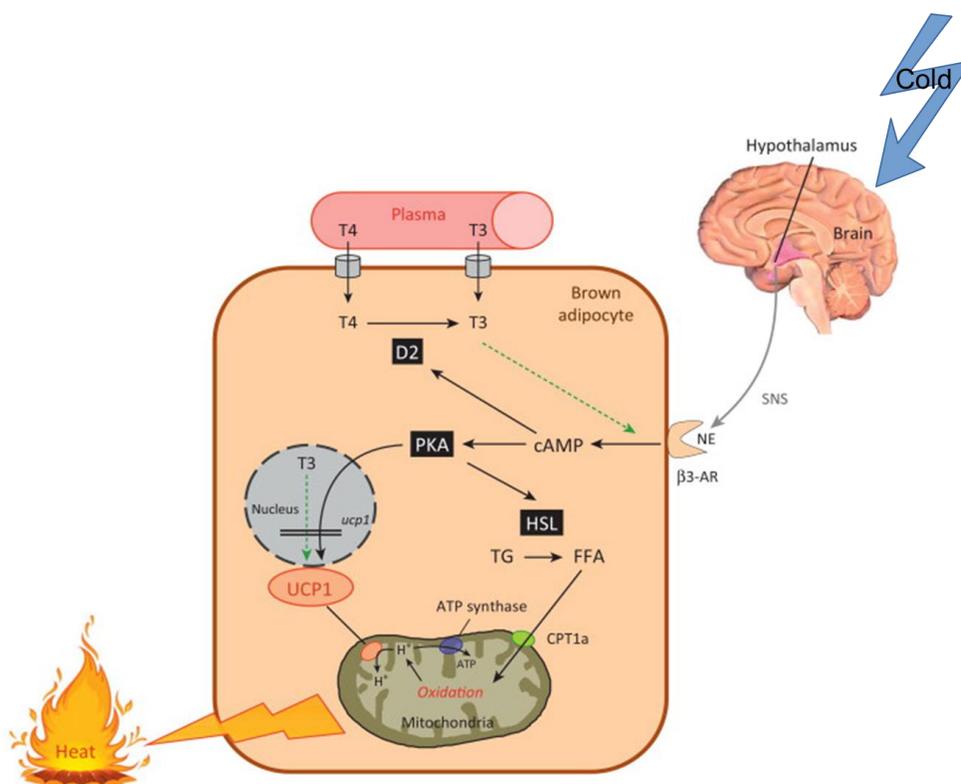


**Ilustración 2.** Diagrama del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides. La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es producida por neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo. Las terminales nerviosas de estas neuronas liberan TRH en la eminencia media del hipotálamo hacia el sistema portahipofisiario. La TRH es transportada a la pituitaria, donde promueve la síntesis y liberación de la tirotropina (TSH), la cual, a su vez, promueve la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (HT) T3 y T4 en la glándula tiroides, las cuales causan cambios metabólicos sobre los tejidos blancos. Estas hormonas ejercen una retroalimentación negativa sobre la síntesis y liberación de la TRH y la TSH en el NPV y la pituitaria, respectivamente. Obtenido de Zoeller, et al, 2015

### 1.3 La termogénesis durante el frío

En especies homeotérmicas, el frío es un estresor físico que provoca que el organismo se adapte a éste para su supervivencia. La supervivencia de animales neonatos depende directamente de su capacidad de mantener estable su temperatura corporal [Greff, 2011]. En humanos expuestos a ambientes que se encuentran a menor temperatura que la corporal, el calor fluye desde el cuerpo hacia el ambiente principalmente a través del contacto de la piel con el exterior. Para contender con esto, los humanos tienen dos mecanismos principales:

respuestas vasomotoras y respuestas metabólicas. Las respuestas vasomotoras reducen la transferencia de calor del núcleo corporal hacia la piel, limitando el calor que pierde el cuerpo al ser expuesto al frío. Las respuestas metabólicas producen calor para reemplazar el que fluye hacia el ambiente [Institute of Medicine and Committee on Military Nutrition Research, 1996]. En los roedores, durante la exposición al frío, se activa el eje HPT y se promueve la liberación de las HT de la glándula tiroideas. Éstas actúan de forma sinérgica con el SNS para promover la termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT por sus siglas en inglés). La norepinefrina, liberada por el SNS en respuesta al frío, se une a su receptor beta-3 adrenérgico (*Adrβ3*) en las células del BAT, lo que provoca un aumento de cAMP, activando a la proteína quinasa A (PKA). La PKA puede fosforilar a la lipasa sensible a hormonas (HSL) activando la lipólisis, lo que promueve el aumento de la concentración intracelular de ácidos grasos libres. Los ácidos grasos son importados a la mitocondria por la carnitil palmitoyl transferasa



1a,

TRENDS in Molecular Medicine

**Ilustración 3.** Diagrama de la adaptación termogénica. Durante la exposición al frío, al activarse el eje HPT, se promueve la liberación de hormonas tiroideas (HT). Éstas actúan de forma sinérgica con el sistema nervioso simpático (SNS) para promover la termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT por sus siglas en inglés). La norepinefrina, liberada por el SNS en respuesta al frío, es reconocida por el receptor beta-3 adrenérgico (*Adrβ3*) en el BAT, lo que provoca un aumento de cAMP, activando a la proteína quinasa A (PKA). La PKA puede fosforilar a la lipasa sensible a hormonas (HSL) activando la lipólisis, lo que

promueve el aumento de concentración de ácidos grasos libres. Los ácidos grasos son importados a la mitocondria por la carnitil palmitoyl transferasa 1a, permitiendo la oxidación de éstos, lo que aumenta la actividad de la proteína desacopladora 1 (UCP1), la cual desacopla la fosforilación oxidativa produciendo calor. La PKA también fosforila el factor transcripcional CREB, aumentando así la síntesis de la *Dio2*, lo cual lleva a una mayor producción de T3 intracelular a partir de la desyodación de T4. De esta manera, T3 aumenta la transcripción y actividad de la proteína UCP1. Además de esto, la T3 aumenta la actividad estimuladora de la norepinefrina.

Obtenido de M. López, et al, 2013

permitiendo la oxidación de éstos, lo que aumenta la actividad de la proteína desacopladora 1 (UCP1), la cual desacopla la fosforilación oxidativa produciendo calor. La PKA también fosforila el factor transcripcional CREB, aumentando así la síntesis de la *Dio2*, lo cual lleva a una mayor producción de T3 intracelular a partir de la desyodación de T4. De esta manera, T3 aumenta la transcripción y actividad de la proteína UCP1, la cual libera calor, como se explica más adelante. Además de esto, la T3 aumenta la actividad estimuladora que la norepinefrina ejerce sobre la concentración intracelular de cAMP [López, et al, 2013]. En la ilustración 3 se puede observar este mecanismo. Debido a que la fosforilación oxidativa sucede en la mitocondria, un aumento en la cantidad de mitocondrias también promueve un aumento de la termogénesis. El coactivador de receptor- $\gamma$  activado por el proliferador de peroxisoma (PGC-1 $\alpha$ ) es miembro de una familia de coactivadores que regulan de forma coordinada las rutas metabólicas en distintos tejidos. PGC-1 $\alpha$  es un regulador maestro de la biogénesis mitocondrial. En tejido adiposo pardo, PGC-1 $\alpha$  promueve la oxidación de ácidos grasos y la expresión de *Ucp-1*. La expresión de *Pgc1a* es activada por el frío, y ratones con mutaciones en esta proteína presentan una termogénesis deficiente [Lin, et al, 2005].

#### **1.4 La adolescencia en ratas**

La adolescencia, frecuentemente definida como el periodo de transición físico, psicológico y social entre niñez y adultez [Blakemore, 2008], es una temporada crítica durante el desarrollo. En esta etapa hay cambios físicos y hormonales significativos. Específicamente, hay maduración del cerebro y del eje HPA. En humanos, el eje HPA madura antes que los sistemas cerebrales que controlan las emociones, la cognición y el aprendizaje, lo que posiblemente esté asociado con el aumento a la susceptibilidad a desarrollar psicopatologías

en la adolescencia y el hecho de que estresores que suceden durante la adolescencia están asociados con la aparición de enfermedades psiquiátricas en etapas de desarrollo posteriores [Toledo-Rodríguez & Sandi].

En ratas, se considera que la adolescencia dura desde el día postnatal (DP) 21-28 hasta el DP 55-60. Debido a la alta variabilidad con la que se presentan los marcadores físicos, muchos laboratorios clasifican las etapas de la adolescencia en ratas utilizando días postnatales [McCormick & Mathews, 2007]. La adolescencia se divide en tres etapas: la prepubertad o adolescencia temprana (DP 21-34) empieza desde el destete, y termina cuando empieza la pubertad, la cual se presenta aproximadamente en el DP 34. La pubertad o adolescencia media inicia el DP 34 y termina el DP 46, y la postpubertad o adolescencia tardía empieza el DP 46 y termina el DP 60 [McCormick & Mathews, 2007]. A partir del DP 60, se considera que las ratas ya son adultas, en el sentido de que alcanzaron la madurez física y sexual. En ratas Wistar, las hembras alcanzan la pubertad alrededor del DP 34-36, que es cuando hay abertura vaginal, mientras que los machos alcanzan la pubertad hasta el DP 40-42, cuando el glande se separa del prepucio [McCormick & Mathews, 2007]. Es importante resaltar que las edades en las que se encuentran estos marcadores pueden variar dependiendo de factores externos, incluyendo la dieta, el manejo de las ratas y exposición a glucocorticoides, y que la maduración sexual y neuroendócrina frecuentemente no suceden simultáneamente. La corticosterona alcanza los niveles observados en las ratas adultas entre el DP 21-28, a pesar de que otros componentes del eje HPA están desfasados, como el receptor de glucocorticoides en el cerebro, que alcanza los niveles adultos en las primeras dos semanas de vida. Las ratas en prepubertad liberan corticosterona por más tiempo que las ratas adultas cuando el eje HPA es estimulado, ya que los sistemas de retroalimentación no están completamente maduros [McCormick & Mathews, 2007]. Además de presentar diferencias en el funcionamiento del eje HPA con respecto a las ratas adultas, las ratas en prepubertad presentan una menor concentración de insulina y T4 y mayor T3 en la circulación. A pesar de que la prepubertad sea un factor significativo que modifica la cantidad de insulina, T4 y T3 en circulación, un estrés agudo por restricción de movimiento durante la prepubertad o en la adultez no tiene efectos a corto ni a largo plazo en estas hormonas [Romeo, et al, 2007].

En ratas adultas que son expuestas repetidamente a ciertos tipos de estrés, se presenta un

fenómeno de habituación, y se reduce la cantidad de glucocorticoides liberados cuando las ratas son expuestas a este estrés [McCormick & Mathews, 2007]. Este fenómeno, aunque bien documentado, puede presentar mucha variación entre individuos expuestos al mismo estrés. Por ejemplo, un estudio encontró que, de 54 ratas machos expuestos una vez por semana durante tres semanas a un estrés psicosocial moderado, sólo el 52% mostró una disminución en la liberación de ACTH y cortisol [Wüst, et al, 2005]. En ratas neonatas, no se presenta este fenómeno, y por el contrario la exposición al mismo tipo de estrés provoca un aumento en la liberación de ACTH y corticosterona. En la adolescencia media, la habituación (medida por la cantidad de corticosterona liberada) depende tanto del sexo del individuo como del tipo de estresor [McCormick & Mathews, 2007].

## **2. Antecedentes**

### **2.1 El aislamiento social durante la adolescencia**

Diversos estímulos ambientales durante etapas tempranas del desarrollo pueden tener efectos neuroendócrinos y en el comportamiento de las ratas a largo plazo, y estos efectos son dependientes de la edad en la que suceden. Por ejemplo, si se aísla socialmente a las ratas machos a partir del destete de forma que puedan oler, ver y escuchar a las demás ratas, se puede observar un decremento en la inhibición prepulso (IPP) del reflejo de la respuesta de sobresalto, mientras que, en ratas aisladas durante la etapa adulta, no se observa esta inhibición [L. S. Wilkinson, et al, 1994]. Además, se ha observado que el aislamiento social a partir del destete provoca que los machos aislados se vuelvan más agresivos [N. Wongwitdecha, C.A. Marsden, 1996]. Adicionalmente, el aislamiento social después del destete también provoca cambios en el cerebro. Se ha observado que la función del receptor GABA<sub>A</sub> disminuye en ratas machos aislados, además de que este tratamiento puede modificar tanto las concentraciones de esteroides neuroactivos [M. Serra, et al, 2000] como la actividad neuronal basal en ciertas regiones del hipocampo [S. Muchimapura, et al, 2002]. Los efectos del aislamiento social no sólo son distintos dependiendo de la edad en la que se

presente, sino que también dependen del sexo del individuo que está siendo estresado. Por ejemplo, el aislamiento social en ratas adolescentes machos y hembras desde el día postnatal 30 al día 50, altera la reactividad del eje HPA cuando los animales adultos son expuestos 30 min a la restricción de movimiento (estrés psicológico); la liberación de ACTH y corticosterona es mayor en las hembras, mientras que en los machos es menor comparado con los animales controles [Weintraub, et al, 2010]. Este mismo aumento de liberación de corticosterona se observa al exponer a las ratas machos a choques eléctricos en la patas después de aislarlos durante 30 días después del destete [M. Serra, et al, 2000]. Además, en resultados preliminares de nuestro laboratorio, se observó que la separación materna durante la lactancia (un momento muy importante del desarrollo) atenúa la respuesta del eje tiroideo al frío en ratas macho adultas. Sin embargo, en estudios anteriores se ha observado que ratas que fueron aisladas desde el destete y posteriormente expuestas a re-socialización rescatan algunos de los síntomas provocados por el aislamiento social a largo plazo [Seffer, et al, 2015] pero no todos [Pascual, et al, 2016].

## **2.2 Diferencias de los efectos del estrés dependientes del sexo del individuo**

La actividad del eje HPA responde a distintas concentraciones de hormonas sexuales en los individuos. En general, el estrógeno estimula la liberación de ACTH y de glucocorticoides mientras que la testosterona inhibe la actividad del eje HPA [V. Viau, et al, 2005]. La adolescencia está marcada por un aumento en la liberación basal de las hormonas del eje HPA y de las hormonas sexuales. Las diferencias dependientes del sexo en la actividad del eje HPA aparecen durante esta etapa del desarrollo, y el hecho de que en la adolescencia haya una activación más prolongada del eje HPA cuando se somete a estrés (comparado con la etapa adulta) provoca que el desarrollo del cerebro se vuelva vulnerable [V. Viau, et al, 2005]. En estudios anteriores se ha observado que un estrés durante la adolescencia puede provocar efectos que persisten durante la adultez, y estos efectos pueden ser dependientes del sexo. Específicamente, un estrés por aislamiento social durante la adolescencia aumenta la sensibilidad locomotora de las ratas hembras a la nicotina y anfetaminas en la etapa adulta, pero no de los machos [McCormick & Mathews, 2007]. Cuando son adultas, las ratas hembras muestran una mayor concentración de ACTH y corticosterona basal que las ratas

machos. Las altas concentraciones de corticosterona son amortiguadas parcialmente debido a que las ratas hembras también tienen una mayor concentración de globulina unidora de corticosterona, ya que sólo la corticosterona que no está ligada se considera biológicamente activa. Además, las ratas hembras tienen niveles más elevados de corticosterona y ACTH cuando son sometidas a un estrés durante el proestro que durante otras etapas del ciclo estral [Viau & Meaney, 1991]. En humanos, se observa que las mujeres adolescentes presentan más síntomas de depresión [B. L. Hankin, et al, 2007], y que son más vulnerables al estrés por rechazo social que los hombres adolescentes [L. R. Stroud, et al, 2002]. Sin embargo, muchos estresores psicológicos, como hacer operaciones aritméticas mentalmente, hostigamiento e incluso estresores del mundo real, como exámenes académicos provocan una mayor liberación de ACTH y cortisol en hombres jóvenes que en mujeres de la misma edad [B. M. Kudielka, C. Kirschbaum, 2005].

### **3. Justificación**

La adolescencia es una etapa crítica en el desarrollo. El estrés crónico durante este periodo tiene efectos a corto y largo plazo sobre la función del eje HPA en animales adultos, además de que existe una asociación clara entre una infancia o adolescencia estresante con alteraciones fisiológicas y conductuales en la vida adulta. No existe información sobre los efectos o cambios inducidos por el estrés en la adolescencia sobre la actividad del eje HPT en animales adultos. En el laboratorio se ha reportado que, en ratas adultas, la respuesta del eje HPT a la exposición al frío puede cambiar dependiendo del tipo de estrés agudo previo [Sotelo-Rivera, et al, 2014, Uribe, et al, 2011], sin embargo, desconocemos si esta respuesta se ve afectada en animales con un estrés crónico a una edad temprana. Por lo tanto, nos interesa determinar si las experiencias previas en una etapa importante del desarrollo, como en la adolescencia, tienen efectos sobre la actividad del eje HPT en animales adultos, si estos efectos son adaptativos o si aumentan la susceptibilidad del organismo a un estrés en la vida adulta y si dependen del sexo del individuo. Además, consideramos importante analizar los cambios a diferentes niveles de regulación del eje tiroideo.

## **4. Hipótesis**

El aislamiento social desde el destete genera un estrés psicológico que modificará de manera diferencial entre machos y hembras el punto de ajuste del eje HPT en ratas adultas, alterando la respuesta adaptativa del eje tiroideo cuando los animales adultos sean expuestos al frío, lo que a su vez también alterará la expresión de algunos genes que regulan la termogénesis en el tejido adiposo pardo.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar los efectos del aislamiento social desde la pre-adolescencia y en respuesta a la exposición a un estrés físico agudo en ratas adultas machos y hembras sobre la actividad del eje HPT y la expresión de los genes que regulan la termogénesis en el tejido adiposo pardo.

### **5.2 Objetivos particulares**

**5.2.1** Estudiar los efectos del aislamiento social a partir de la pre-adolescencia y en la respuesta al frío en el animal adulto, en particular en la expresión de los genes que participan en regulación del eje HPT en el NPV del hipotálamo, hipotálamo medio-basal y pituitaria anterior, así como la concentración sérica de las hormonas TSH, T3 y T4 en ratas machos y hembras adultas.

**5.2.2** Analizar la respuesta adaptativa del tejido adiposo pardo en respuesta a la exposición al frío en ratas adultas machos y hembras para determinar si el aislamiento social la altera.

**5.2.3** Determinar si el aislamiento social induce cambios sexo-específicos sobre la actividad del eje HPT en condiciones basales y en respuesta al frío.

## **6. Metodología**

### **6.1 Animales**

Se usaron ratas hembras y machos de la cepa Wistar (3 meses de edad) del Bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM, para la cruce (un macho por dos hembras). Las ratas gestantes ( $n=10$ ) se mantuvieron en cajas individuales con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (7:00 AM/7:00 PM) y con una temperatura constante de  $22 \pm 1$  °C. Tuvieron libre acceso al alimento y agua. El alimento disponible era proporcional al número de ratas en cada caja. El día del nacimiento de las crías (día postnatal 0, DP0), se estandarizaron las camadas a ocho crías, tratando de tener 4 hembras y 4 machos por madre. Las ratas se mantuvieron en cajas de plástico con tapas de metal donde se colocó el alimento.

### **6.2 Estrés por aislamiento social**

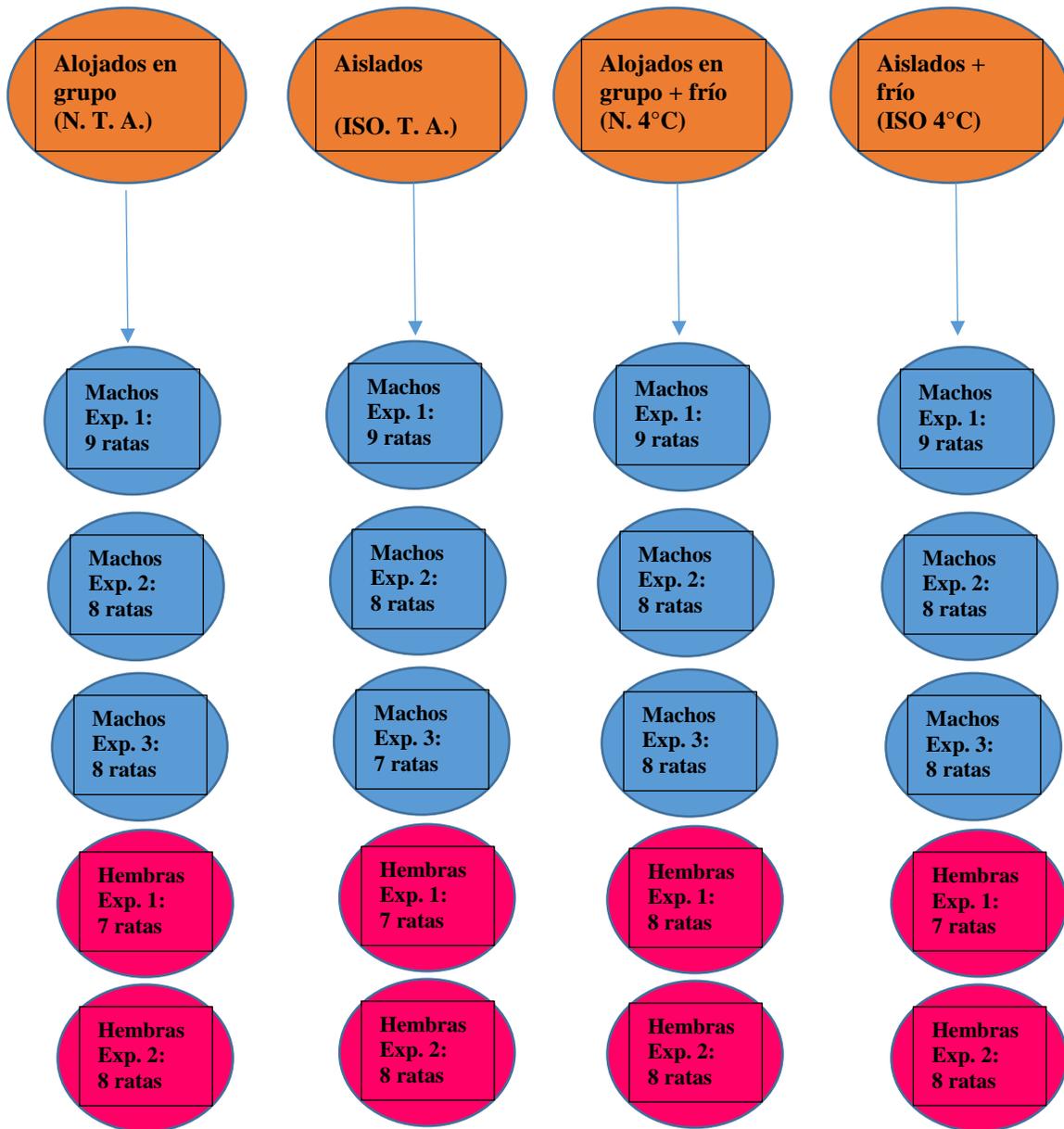
A partir del DP 21, al destete, la mitad de las ratas (machos y hembras) fueron alojadas aleatoriamente de forma individual hasta su vida adulta. Las ratas aisladas se mantuvieron en el mismo cuarto que las ratas que no estaban aisladas, de modo que pudieran oler, ver El resto de los animales se mantuvieron en grupos de 4 durante la adolescencia y en grupos de 2-3 animales/caja llegando a la edad adulta (DP 60). Durante este tiempo no se manipuló a los animales excepto para el cambio de cama (2 veces/semana) y se registró su peso y consumo de alimento. El alimento se pesó cada dos días y el peso una vez a la semana. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* al alimento y agua. Para corroborar nuestros resultados, se hicieron 2 experimentos independientes en hembras y 3 experimentos independientes para

machos, ya que, en el primer experimento de machos, el grupo control presentaba valores basales de corticosterona muy elevados. Para determinar si el aislamiento social tenía efectos sobre la masa grasa de las ratas y si este estrés y el frío cambian la masa de las glándulas adrenales, extrajimos y pesamos el tejido adiposo de tipo visceral (gonadal y retroperitoneal) y el subcutáneo (interescapular), así como las glándulas adrenales. A continuación, se muestra una figura con los grupos de estudio utilizados:

### **6.3 Estrés agudo por exposición al frío**

En el DP 70, las ratas adultas se expusieron a 4 ° C (grupo de frío) o se mantuvieron a temperatura ambiente (control) durante una hora. El grupo de frío se mantuvo en aislamiento durante la exposición a 4 ° C. Una vez transcurrida la hora, todos los animales fueron sacrificados inmediatamente por decapitación con una guillotina. Se obtuvo la sangre troncal para cuantificar la concentración sérica de T3 y T4 por ELISA, de TSH y corticosterona por RIA y de triglicéridos con tiras reactivas (Accutrend, Roche). Se obtuvieron las glándulas adrenales en fresco, el tejido adiposo blanco gonadal, retroperitoneal e interescapular, y se almacenaron a -70°C para análisis posteriores. El cerebro y la adenohipófisis se extrajeron y almacenaron a -70°C para cuantificar por RT-PCR de punto final la expresión de ARNm de *Trh* en el NPV del hipotálamo; *Trhde* y *Dio2* en hipotálamo mediobasal (que contiene la eminencia media), el ARNm de *Trh-r1*, *Tshβ* y *Dio2* en adenohipófisis y el ARNm de *Ucp-1*, *Dio2*, *Pgc1a* y el receptor β3 adrenérgico en tejido adiposo pardo.

## Número de ratas por experimento:



Se usaron las siglas N. T.A. (naïve, temperatura ambiente) para denominar a las ratas que fueron mantenidas en compañía de otras ratas y que no fueron expuestas a frío, ISO T.A. (isolation, temperatura ambiente) para denominar a las ratas aisladas que no fueron expuestas a frío, las N. 4°C fueron las ratas que no fueron aisladas pero que sí se expusieron al frío e ISO 4°C las ratas que fueron aisladas y expuestas al frío.

#### **6.4 Extracción de ARN total por el método de tiocianato de guanidina**

Todos los cerebros fueron disecados manualmente, se realizaron dos cortes de 1 mm de grosor. Del primer corte (Bregma -0.84 a -1.92 mm, Paxinos y Watson 2005) se obtuvo el NPV utilizando un ponche de 1 milímetros de diámetro y del segundo corte (Bregma -1.92 a -2.92 mm, Paxinos y Watson 2005) se obtuvo el hipotálamo mediobasal utilizando un ponche de .5 milímetros de diámetro. Para cuantificar la expresión de los genes involucrados en la regulación de la termogénesis en el tejido adiposo pardo, este se disecó y se pesó una pequeña porción (aproximadamente .015 gramos) por rata. La extracción del ARN total se realizó utilizando el método de extracción por tiocianato de guanidina [Chomczynski & Sacchi, 1987].

El primer día se homogenizó el tejido en buffer de tiocianato de guanidina. Se usó 1 ml de buffer por cada 0.1 g de tejido y se adicionó 7  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada ml de buffer. Se homogenizaron las muestras usando un sonicador marca Ultrasonic Homogenizer serie 4710. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 2870 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Después se desnaturalizaron y removieron las proteínas añadiendo fenol/cloroformo y extrayendo el sobrenadante después de centrifugar las muestras durante 22 minutos a 10,000 rpm. Finalmente se precipitó toda la noche el ARN usando una cantidad de isopropanol igual al volumen recuperado.

El segundo día se centrifugaron las muestras a 13500 rpm por 30 min a 4°C y se disolvió el precipitado en un buffer de tiocianato de guanidina y se precipitaron toda la noche en isopropanol.

El tercer día se centrifugaron las muestras y se adicionó etanol para remover las sales. Después, se solubilizó el ARN en agua tratada con DEPC (0.1% dietil pirocarbonato). Se tomó un microgramo de ARN y se diluyó en 12 microlitros de agua tratada con DEPC para llevar a cabo la retrotranscripción.

## 6.5 Medición de la expresión génica mediante RT-PCR semi-cuantitativa de punto final

Después de extraer el ARN, se llevó a cabo una retrotranscripción para obtener ADN complementario (c) a partir del ARN extraído. Se usó 1 microgramo de ARN suspendido en 12 microlitros de agua tratada con DEPC. Para la retrotranscripción primero se desnaturalizaron las muestras durante 5 minutos a 65 °C y luego se agregó la mezcla de reacción: 8.9 µl de agua, 6 µl de Buffer para retrotranscripción, 3 µl de DTT, 1 µl de oligonucleótido dT (500ng/ µl), 0.6 µl de dNTPs (0.6 Mm) y 0.5 µl de enzima RT. Después, cantidades fijas de este ADNc se amplificaron mediante PCR usando la mezcla para PCR: entre 2- 4 µl de ADNc dependiendo del gen [Uribe, et al, 2014], entre 35-38 µl de agua, 5 µl de buffer para TAQ polimerasa 10x, 1 µl de dNTPs (10 Mm), 1 µl de oligonucleótidos (25 pmol) sentido y antisentido, 0.5 µl de Taq polimerasa y 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM). El producto se corrió en un gel de agarosa al 2% y las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría. Para determinar cuántos µl de ADNc y cuántos ciclos se amplificó cada gen, se hicieron varios PCRs con distintas cantidades de ADNc y distintos ciclos, y se eligieron los que mejor permitieran diferenciar las distintas concentraciones de las bandas en el gel de agarosa.

	Secuencia	ADNc	TM	Ciclos	Tamaño del amplificado
Dio2	S 5' GATGCTCCCAATTCCAGTGT 3' AS 5' AGGCTGGCAGTTGCCTAGTA 3'	2 µl	64°	26 ó 27	200 pb
UCP1	S 5' GGATCAAACCCCGCTACACTG 3' AS 5' CAGGATCCGAGTCGCAGAAAA 3'	2 µl	64°	18	450 pb
PGC1-α	S 5' ATGGAGTGACATAGAGTGTGC 3' AS 5' GTGCTAAGACCGCTGCATTC 3'	3 µl	64°	28	459 pb
TRH-R1	S 5' GATCCGCCACAGCCAGACTCACCAG 3' AS 5' ACCCAGAGAAGCAGGCAGCGTGACA 3'	4 µl	67°	28	350 pb
TSHβ	S 5' TTGGTTTTGACAGCCTCGTG 3'	4 µl	55°	18	350 pb

	AS 5' TTCCGTGCTTTTCGCTCTTG 3'				
Adrβ3	S 5' TCTGTGCTGGCTGCCCTTCTT 3' AS 5' CTTCTCCTCCCCCAACCCTCAA 3'	4 μl	64°	28	351 pb
TRH	S 5' GACAGCTAGTGAAGGGAACAGG 3' AS 5' CCCTGGATGGAGTCTGATGT 3'	4 μl	64°	23	358 pb
Cyc	S 5'CGAGCTGTTTGCAGACAAAGTTCC 3' AS 5' GATGGGGTGGGGGTGCTCTC 3'	4 μl	64°	18 ó 19	503 pb

**Tabla 1. Oligonucleótidos complementarios y condiciones de amplificación para cada gen**

Se utilizó ciclofilina en cada PCR para normalizar la cuantificación de cada gen.

### **6.6 Cuantificación de la concentración sérica de hormonas por ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)**

Se midió la concentración sérica de T3 y T4 utilizando un kit de ELISA (número de catálogo 600 para T3 y 601 para T4 de Diagnóstica Internacional, Jal.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente la prueba consistió en:

Primero se realizó la adición de la muestra problema.

Después se lleva a cabo la unión del antígeno específico al anticuerpo tapizado en el pocillo.

Luego se hace el lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno no unido.

Después se adiciona el anticuerpo secundario conjugado con la enzima HRP (peroxidasa de rábano) y hay una unión del anticuerpo secundario al antígeno.

Luego del paso anterior se lava el pocillo para eliminar el exceso de anticuerpo no unido y se adiciona el sustrato.

Finalmente, hay unión del sustrato a la enzima y se lleva a cabo la reacción colorimétrica y cuantificación en el espectrofotómetro a 450 nm para T3 (sensibilidad 0.25 ng/ml) y T4 (sensibilidad 0.5 μg/dl).

## **6.7 Medición de la concentración sérica de hormonas mediante Radioinmunoensayo (RIA)**

La concentración sérica de TSH y corticosterona se cuantificó por radioinmunoensayo, el cual está bien establecido en nuestro laboratorio desde hace varias décadas [Cohen, et al, 1982].

La curva estándar se preparó por triplicado con 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 pg/200  $\mu$ l de amortiguador para RIA (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 + 150 mM NaCl + 0.25% BSA+ 50 mM EDTA). A estos tubos se les agregó anticuerpo contra la hormona a detectar. Para las muestras se tomaron 50  $\mu$ l de suero de rata y se diluyeron 1:3 en amortiguador para RIA para un total de 200  $\mu$ l y después se agregó anticuerpo contra la hormona a detectar. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente toda la noche y posteriormente se añadieron 100  $\mu$ l de hormona marcada a cada tubo. Después de dejarlos incubando otra vez toda la noche se les añadió anticuerpo contra IgG de conejo (dilución 1:40 en PBS, el cual consiste en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 + 150 mM NaCl) y 100  $\mu$ l de suero normal de conejo al 2% en PBS. Después de dejarlos incubando por 2 horas a temperatura ambiente, se les añadió 1 ml de polietilenglicol al 4% en PBS y se centrifugaron a 5,000 rpm por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se cuantificaron las cuentas por minuto de cada tubo en un contador gamma.

## **6.8 Medición de la actividad de la desyodasa 2 mediante ensayo radiométrico**

Para purificar las proteínas, se siguieron los siguientes pasos:

Primero, se disecaron 50-60 mg de BAT y luego se agregó el buffer de homogenización (100 mM NaPO<sub>4</sub> pH6.8, 0.25M Sacarosa, 1mM EDTA pH6.8, 20mM DTT, completar el volumen final con H<sub>2</sub>O milli Q) 1:10 g/ml y se homogenizó el tejido, teniendo cuidado de que no se calentara. Después de esto, se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 700 g y se recuperó la fase intermedia usando aguja y jeringa y se pasó a otro tubo. Luego, se centrifugó este tubo por 11 minutos a 10,000 g y se recuperó el sobrenadante, se pasó un volumen fijo

de cada muestra a un tubo de ultracentrífuga y se centrifugó por 1 hora a 150,000. Luego, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 70-100  $\mu$ l de buffer de homogenización, se dio un pulso de sonicación y se transfirió a un tubo limpio. Se cuantificaron las proteínas usando el método de Bradford usando 2.5  $\mu$ l para cada muestra y se hicieron alícuotas con 10  $\mu$ g de proteína en 50  $\mu$ l de buffer de homogenización y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La actividad de la D2 se midió por ensayo radiométrico en el tejido adiposo pardo como lo reportado por [Pavelka, 2010]. Se usó T4 marcada con  $\text{I}^{125}$  como sustrato y se agregaron 10  $\mu$ g de proteína de BAT y se incubó por 60 minutos. Se purificaron las hormonas marcadas usando Sephadex LH 20 (Sigma-Aldrich). El  $\text{I}^{125}$  se separó con 50WX2, 100–200 mesh (Bio-Rad Life Sciences). Al final se cuantificaron las cuentas por minuto de cada muestra utilizando un contador gamma.

### **6.9 Medición de temperatura corporal**

La temperatura corporal se midió con un termómetro por vía anal inmediatamente después de que cada rata fuera sacrificada.

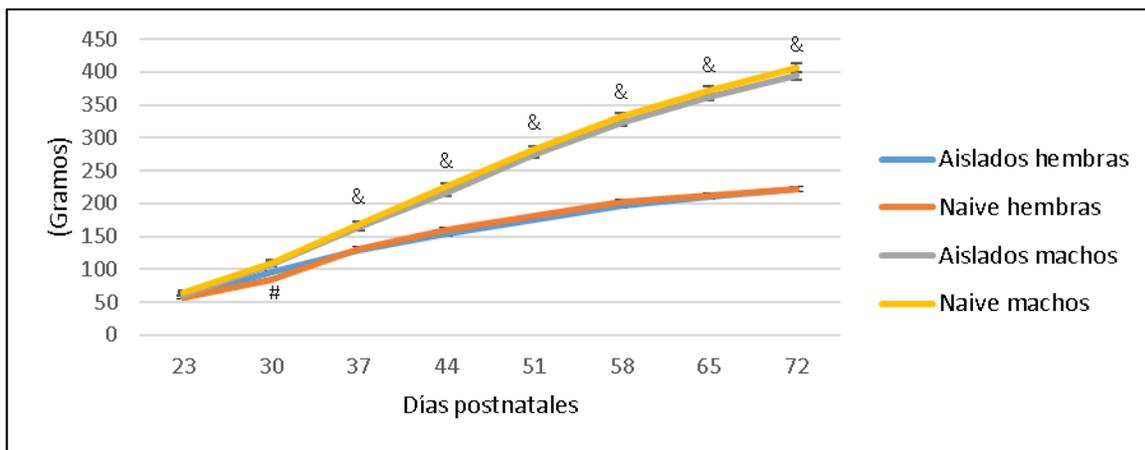
### **6.10 Análisis estadístico**

Debido a que los duplicados de los experimentos realizados en los machos fueron reproducibles, se juntaron los datos y las gráficas se representaron como el promedio del % de diferencia vs el grupo N.T.A.  $\pm$  E.E.M. (error estándar medio). En el caso de las hembras, encontramos resultados opuestos en algunos parámetros analizados, por lo tanto, se muestran las gráficas de ambos experimentos representados como el % de diferencia vs el grupo N.T.A.  $\pm$  E.E.M. Los resultados se analizaron por ANOVA de 3 vías seguido de la prueba post hoc de Fisher. Estos análisis se hicieron usando el software Stat view versión 4.53. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con una  $p < 0.05$ , la cual se denota en las gráficas con un asterisco. En caso de que la  $p < 0.01$ , se indica con dos asteriscos.

## 7. Resultados

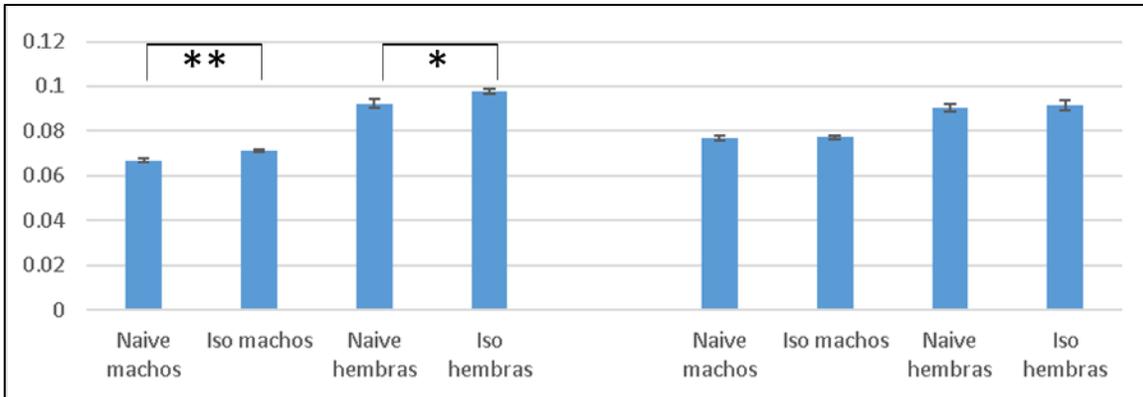
### 7.1 Efecto del aislamiento social sobre el peso corporal y el consumo de alimento

Para estudiar los efectos del aislamiento sobre el crecimiento de los animales, se registró el peso corporal de los mismos. No se observaron cambios significativos entre los grupos aislados y los no aislados en el peso de las ratas macho ni de las hembras. Las ratas ganaron peso constantemente desde el inicio del experimento hasta el día del sacrificio (figura 1). Las ratas machos ganaron más peso que las ratas hembras como era de esperarse. Las ratas aisladas (tanto machos como hembras) consumieron más alimento por peso corporal que las ratas controles durante la adolescencia, pero en la adultez esta diferencia desapareció.



**Figura 1. Peso corporal de los animales.**

Se registró el peso de los animales a partir del día en que fueron aislados hasta el día del sacrificio. No se observaron diferencias dependientes del aislamiento social. #  $p < 0.05$  con respecto al grupo control del mismo sexo. &  $p < 0.05$  con respecto a los dos grupos de hembras. El último punto es el día postnatal 72.

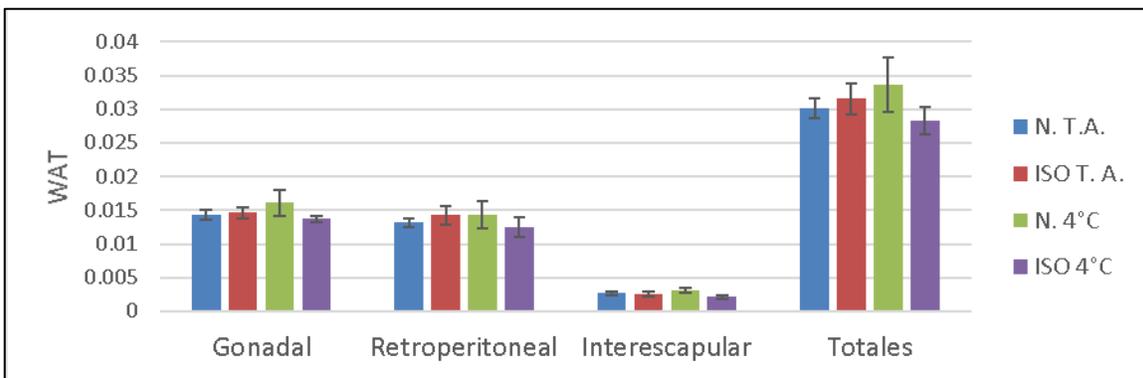


**Figura 2. Promedio de alimento consumido diariamente en la adolescencia y adultez (gramos/gramos).**

En esta gráfica se observa un incremento en el alimento consumido tanto por las ratas macho como las hembras durante la adolescencia por las ratas aisladas cuando se comparan con las ratas que no fueron aisladas. Se muestra el promedio del consumo de alimento/día en la adolescencia (DP21-59) y en la adultez (DP60-70).

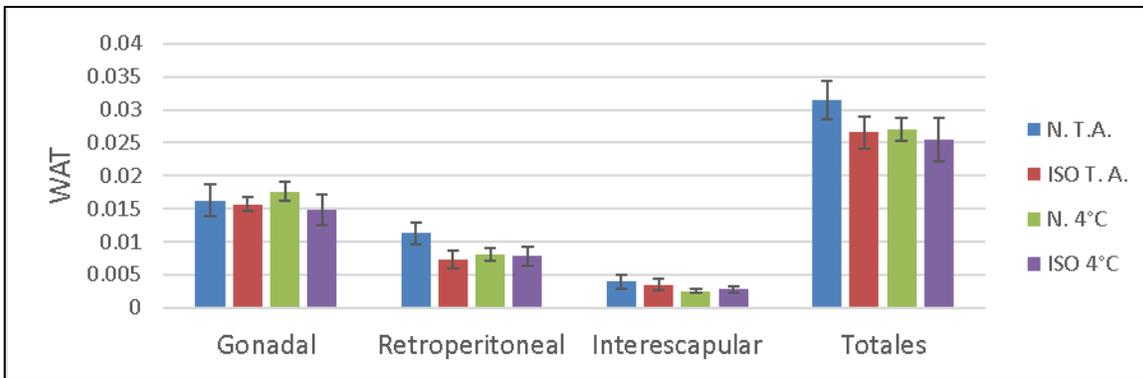
### 7.2 Efecto del aislamiento social y el frío sobre el peso del tejido adiposo, las glándulas adrenales y la concentración sérica de corticosterona.

No se observaron cambios significativos en los pesos de los tejidos adiposos (figura 2 y 3) ni en las glándulas adrenales (figura 5 y 6) entre ninguno de los grupos estudiados ni en machos ni en hembras.



**Figura 3. Peso de las grasas blancas en machos.**

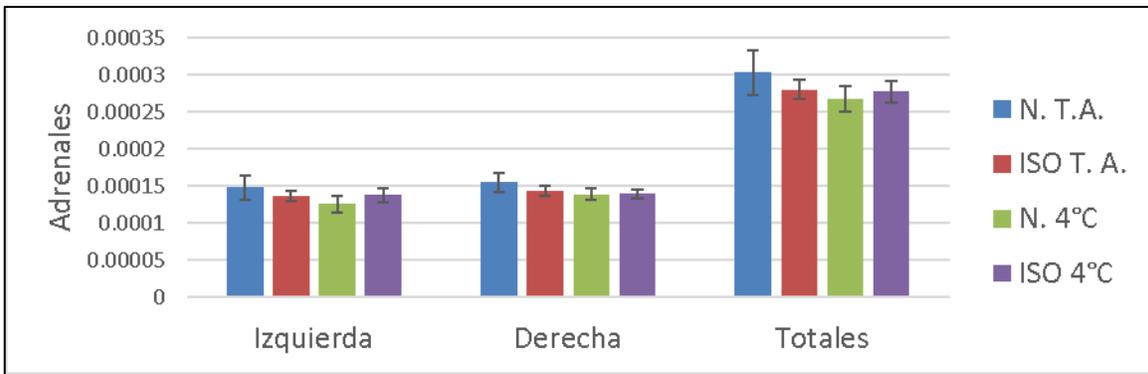
En esta figura no se observan efectos del aislamiento social sobre las grasas blancas de ratas macho. Se muestran, de izquierda a derecha, los promedios de cada grupo de los pesos divididos entre el peso corporal de cada rata de los siguientes tejidos para las ratas machos: tejido adiposo blanco (WAT) gonadal, retroperitoneal e interscapular y la sumatoria de los tres. El aislamiento social no provocó cambios en el peso de las grasas.



**Figura 4. Pesos de las grasas blancas en hembras.**

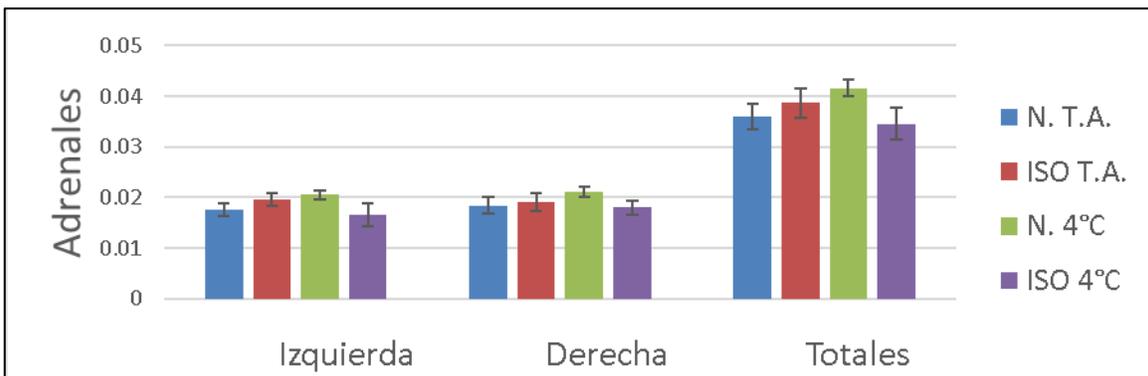
En esta figura no se observan efectos del aislamiento social sobre las grasas blancas de ratas macho. Se muestran, de izquierda a derecha, los promedios de cada grupo de los pesos divididos entre el peso corporal de cada rata de los siguientes tejidos para las ratas hembra: tejido adiposo blanco (WAT) gonadal, retroperitoneal e interescapular y la sumatoria de los tres. El aislamiento social no provocó cambios en el peso de las grasas.

El aislamiento social no indujo cambios sobre la concentración basal de corticosterona en los machos (figura 7). En respuesta a la exposición al frío, la concentración sérica de corticosterona aumentó significativamente en animales controles, como se ha reportado [Zoeller, et al, 1990, Sotelo-Rivera, et al, 2014]). La exposición al frío también provocó un aumento de concentración de corticosterona sérica en los animales aislados, sin embargo, este aumento fue mayor en el grupo aislado que en el grupo control (figura 7). En el experimento 1 de hembras, el aislamiento social indujo un aumento en la concentración basal de corticosterona, y el estrés por frío aumentó significativamente la concentración de corticosterona sólo en las ratas controles (figura 8). En el experimento 2 de hembras el aislamiento social indujo una disminución en la concentración basal de corticosterona, e igual que en los machos, el estrés por frío aumentó significativamente la concentración sérica de corticosterona tanto en las ratas controles como las aisladas (figura 9). Es importante resaltar que, al ser expuestas a frío, las ratas hembras tanto del experimento 1 como del 2 mostraron un menor aumento en la concentración de corticosterona en suero con respecto a las ratas machos independientemente del aislamiento.



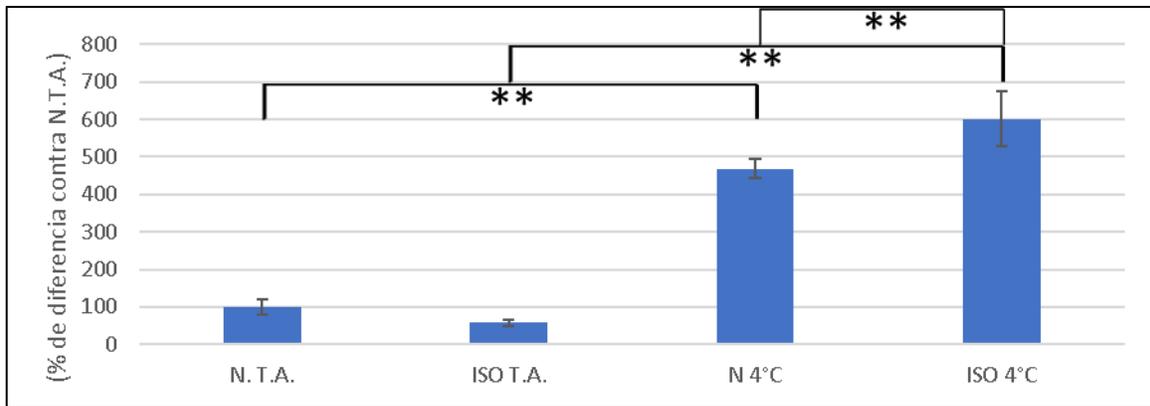
**Figura 5. Pesos de las glándulas adrenales en machos.**

En esta figura no se observan efectos del aislamiento social sobre las glándulas adrenales de ratas macho. Se muestran los promedios de los pesos de la glándula adrenal izquierda, derecha y la sumatoria de ambos divididos entre el peso corporal de cada rata. El aislamiento social no provocó cambios en el peso de las glándulas adrenales.



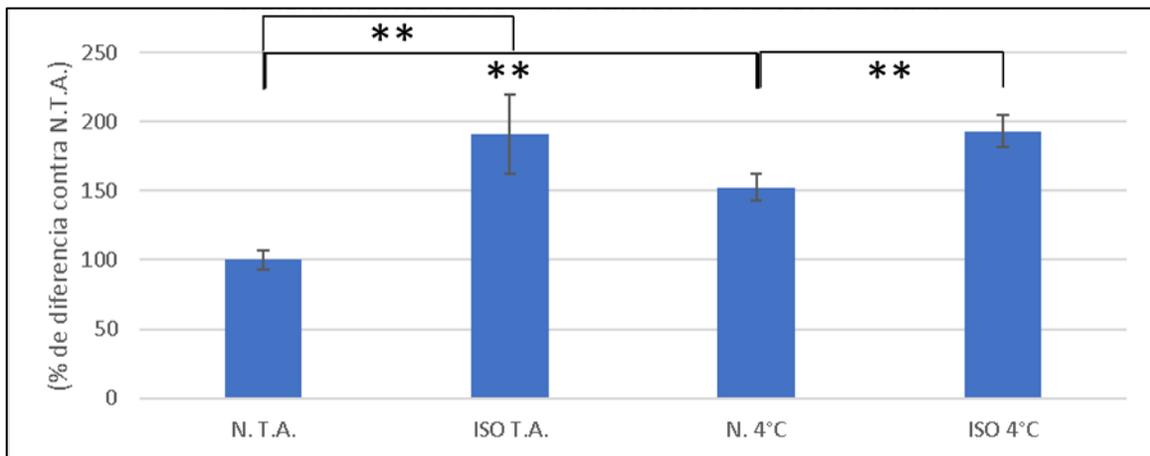
**Figura 6. Pesos de las glándulas adrenales en hembras.**

En esta figura no se observan efectos del aislamiento social sobre las glándulas adrenales de ratas macho. Se muestran los promedios de los pesos de la glándula adrenal izquierda, derecha y la sumatoria de ambos divididos entre el peso corporal de cada rata. El aislamiento social no provocó cambios en el peso de las glándulas adrenales.



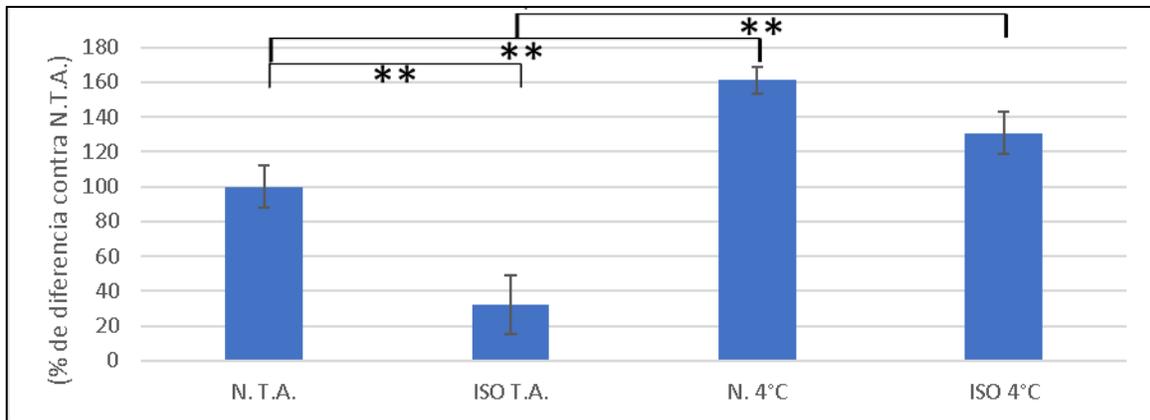
**Figura 7. Concentración sérica de corticosterona en ratas macho.**

En machos, el aislamiento induce un mayor aumento en la concentración sérica de corticosterona en respuesta al frío. En esta gráfica se observa un aumento en la concentración sérica de corticosterona, en respuesta al frío, tanto en las ratas naïve, como las aisladas, siendo mayor en éstas últimas.



**Figura 8. Concentración sérica de corticosterona en ratas hembra del Exp. 1.**

En hembras, el aislamiento induce un aumento en la concentración basal de corticosterona a T.A. y en respuesta al frío. En esta gráfica se observa un aumento en la concentración sérica de corticosterona en las ratas aisladas a T.A. y en respuesta al frío, comparado con los animales controles.



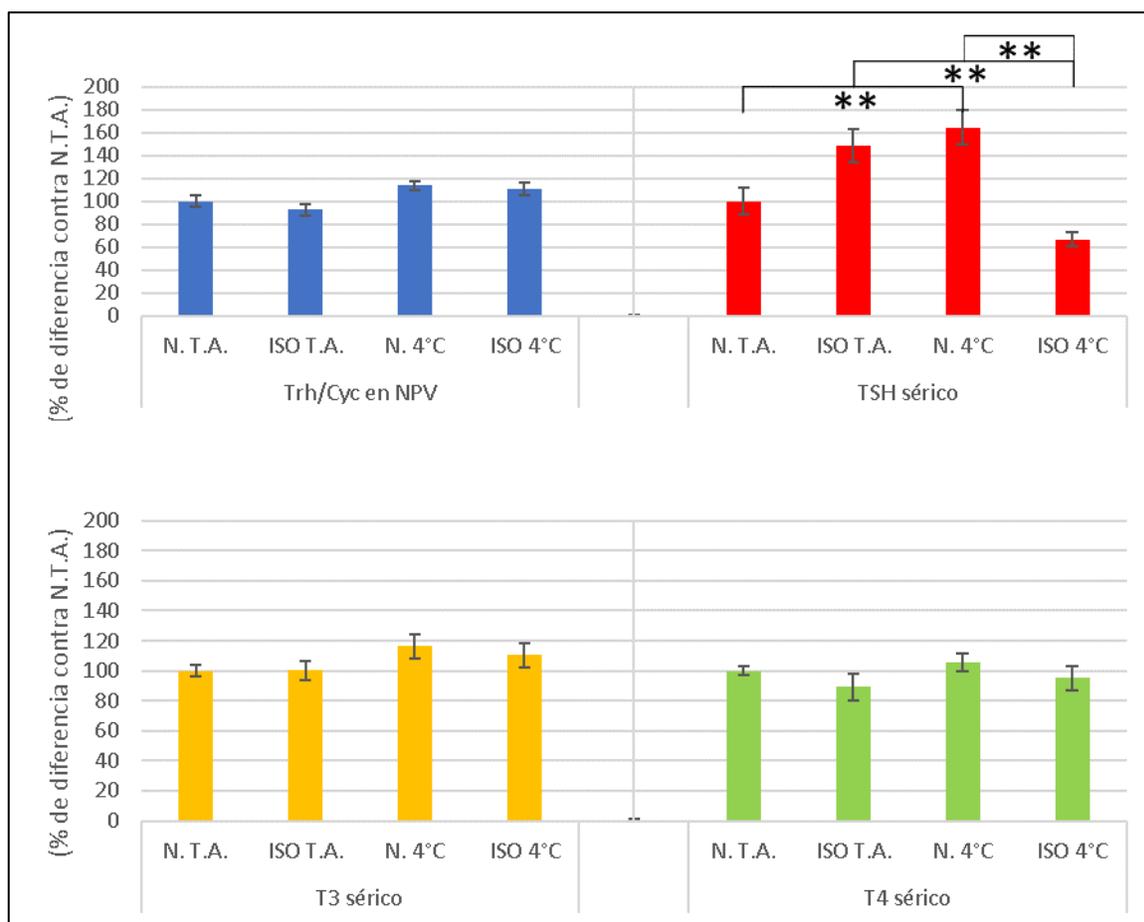
**Figura 9. Concentración sérica de corticosterona en ratas hembra del Exp. 2.**

En hembras, el aislamiento indujo una disminución en la concentración basal de corticosterona, pero no en respuesta al frío. En esta gráfica se observa una disminución en la concentración sérica de corticosterona en las ratas aisladas a T.A. y un aumento de las ratas que fueron expuestas a frío comparadas con los animales controles. También se observa un aumento en la concentración de corticosterona en las ratas aisladas que fueron expuestas a frío comparadas con las ratas aisladas que no lo fueron.

### 7.3 Efecto del aislamiento social y el frío sobre la actividad del eje HPT

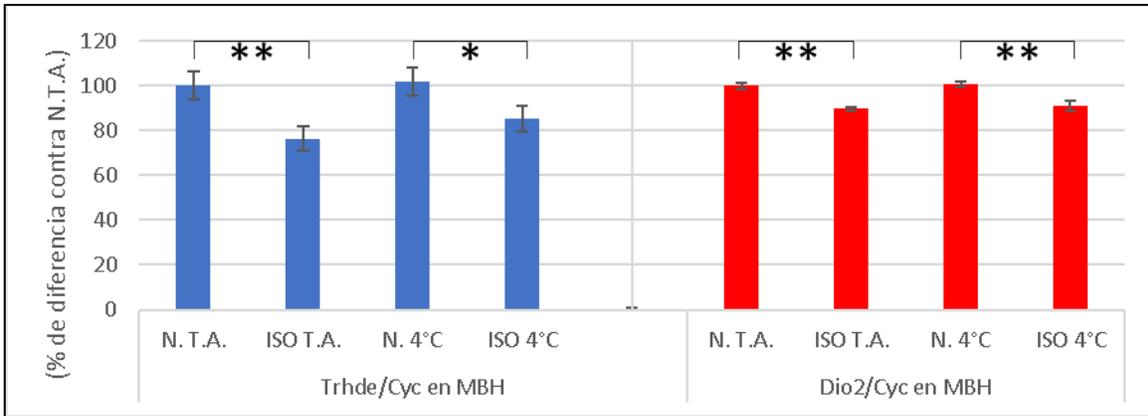
En las ratas macho, no se observaron cambios en la actividad del eje HPT inducidos por el aislamiento social (figura 10), y en respuesta al frío, el grupo naïve presentó un aumento significativo en la concentración sérica de TSH como se ha reportado previamente [Joseph-Bravo, et al, 2015], mientras que la respuesta al frío estuvo inhibida en los animales aislados (figura 10). En el hipotálamo mediobasal, el aislamiento social indujo una disminución en la expresión de la *Dio2* y la *Trhde*; y la exposición al frío no tuvo efectos sobre la expresión de estos genes en ninguno de los grupos experimentales (figura 11); mientras que en la adenohipófisis no se encontraron cambios significativos bajo ninguna condición experimental estudiada (figura 12). En las ratas hembras el aislamiento social no tuvo efectos sobre la actividad del eje HPT en las ratas adultas en ninguno de los dos experimentos (figura 13, 14), sin embargo, en respuesta al frío, encontramos diferencias entre el experimento 1 y 2 en la concentración sérica de TSH y de las hormonas tiroideas. En el experimento 1, aumentó la concentración sérica de TSH tanto en el grupo naïve (y también fue mayor vs los

machos) como en el aislado (figura 13), mientras que en el experimento 2 aumentó la concentración sérica de T3 y T4 en ambos grupos expuestos al frío (figura 14). Por lo tanto, decidimos guardar los cerebros de las hembras del experimento 2 para analizar, más adelante, la expresión de *Trh* en el NPV y de *Dio2* y *Trhde* en el HMB por hibridación *in situ*. No se encontraron cambios en la expresión de los genes analizados en el hipotálamo mediobasal en ninguna condición experimental estudiada del experimento 1 (figura 15) ni en la adenohipófisis del experimento 2 (figura 16). Desafortunadamente, el ARN de las adenohipófisis del experimento 1 de las hembras se degradó durante la extracción.



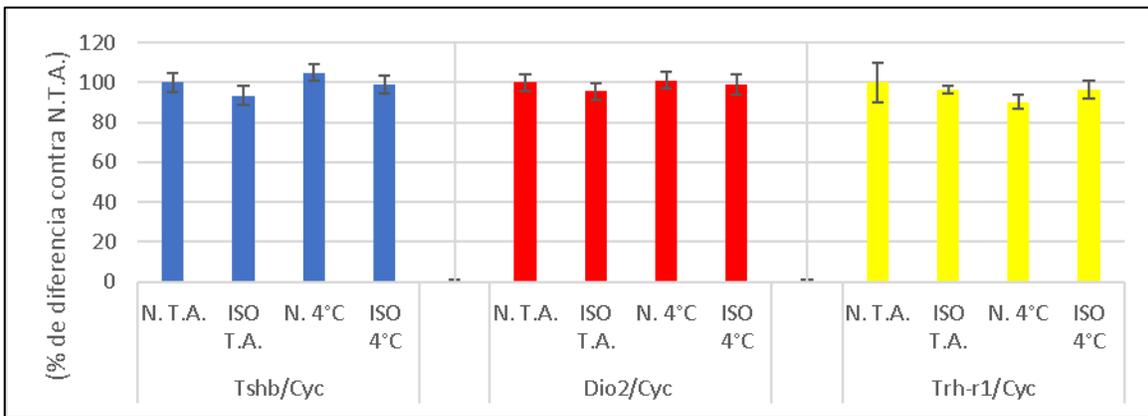
**Figura 10. Cuantificación de hormonas y genes del eje HPT de ratas macho.**

En ratas macho el aislamiento induce un aumento en la concentración sérica de TSH e inhibe su aumento en respuesta al frío. En la gráfica azul se indica la cuantificación del mensajero de *Trh* en el NPV del hipotálamo, en rojo la concentración de TSH, en amarillo de T3 y en verde de T4. En la cuantificación de TSH sérico se observa un aumento en las ratas N 4°C comparados con las N.T.A. y una inhibición en el incremento de TSH en respuesta al frío en las ratas aisladas. (*Trh* indica el ARNm de TRH)



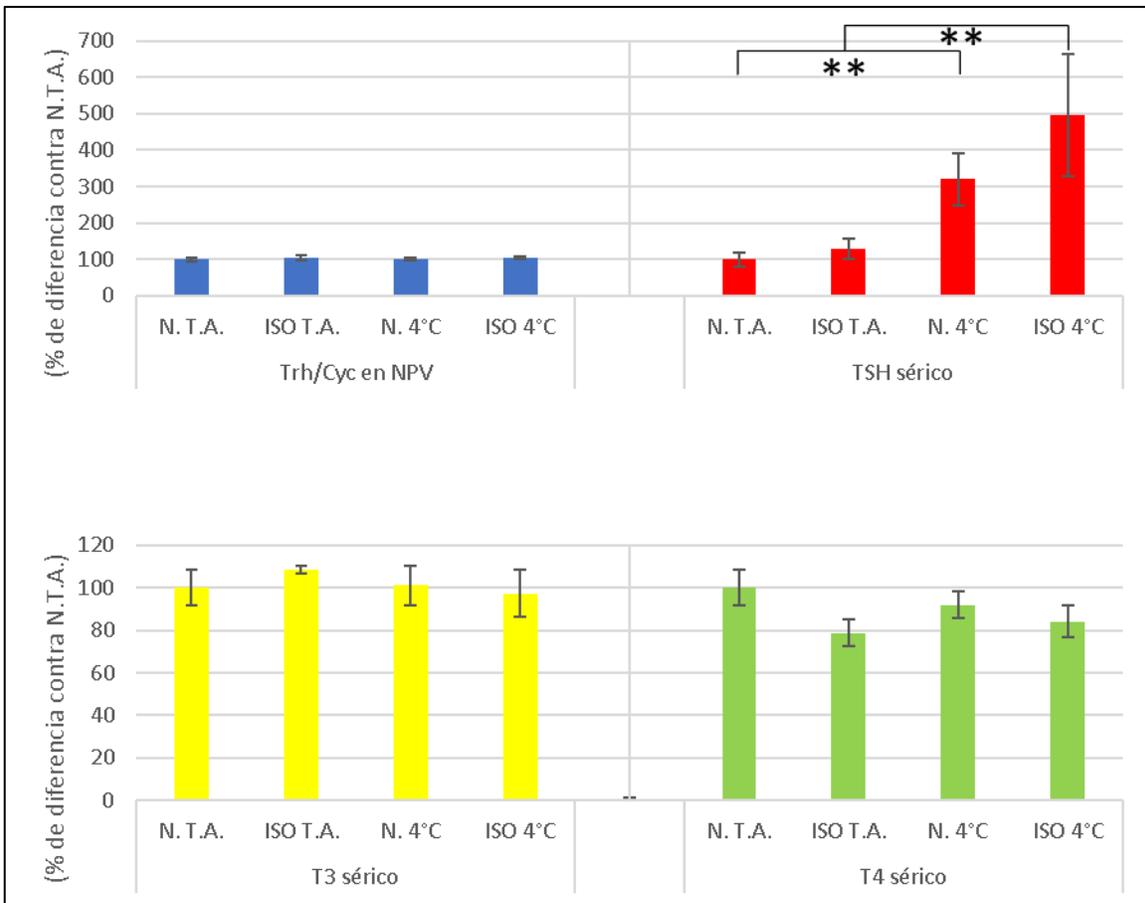
**Figura 11. Cuantificación de genes asociados con la regulación del eje HPT en el HMB en ratas macho.**

El aislamiento induce una disminución del ARNm de *Trhde* y *Dio2* en el HMB de ratas macho. En esta gráfica se observa en la cuantificación de *Trhde* (el mensajero de PPII) y *Dio2* una disminución en ISO T.A. comparado con N. T.A. y también en ISO 4°C comparado con N 4°C. (*Trhde* indica el ARNm de PPII, *Dio2* indica el ARNm de la desyodasa 2).



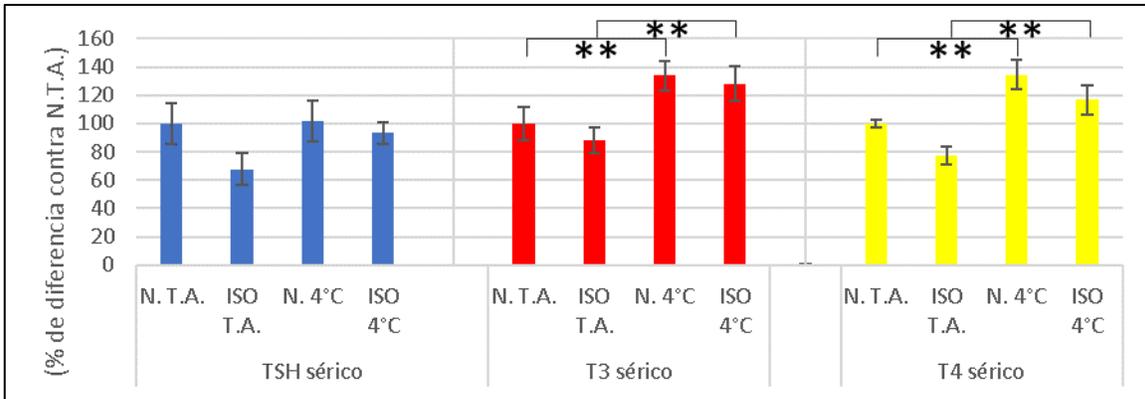
**Figura 12. Cuantificación de genes asociados con la regulación del eje HPT en adenohipófisis de ratas machos.**

El aislamiento social no tiene impacto sobre el ARNm de *Tshb*, *Dio2* ni *Trhr1* en adenohipófisis de ratas macho. En esta gráfica no se observa ningún cambio significativo. (*Tshb* indica el ARNm de la subunidad b de la TSH, *Dio2* indica el ARNm de la desyodasa 2 y *Trh-r1* indica el ARNm del receptor de TRH)



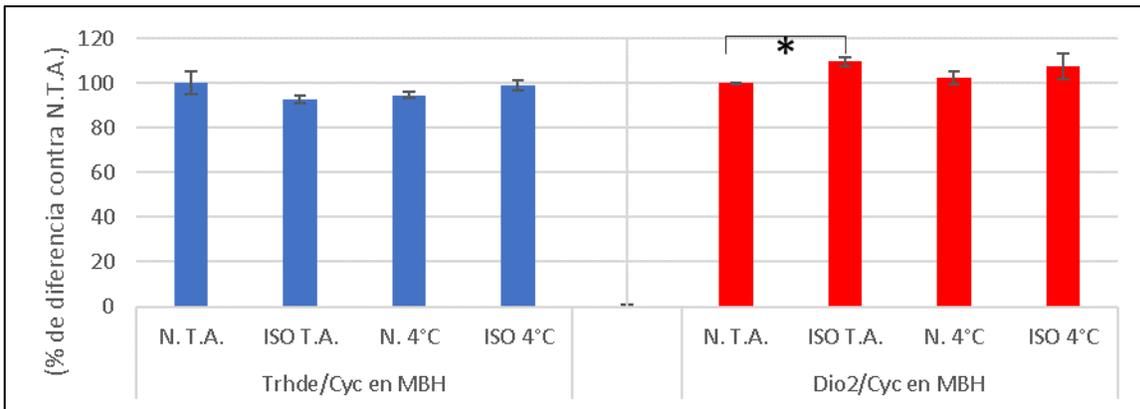
**Figura 13. Cuantificación de hormonas y genes del eje HPT de ratas hembras Exp. 1.**

El aislamiento social no tiene impacto sobre el ARNm de TRH en el NPV ni en la concentración sérica de HT y TSH en ratas hembra. En esta gráfica se observa un aumento de la concentración sérica de TSH en las ratas que fueron expuestas a frío comparadas con las ratas que no lo fueron. (Trh indica el ARNm de TRH)



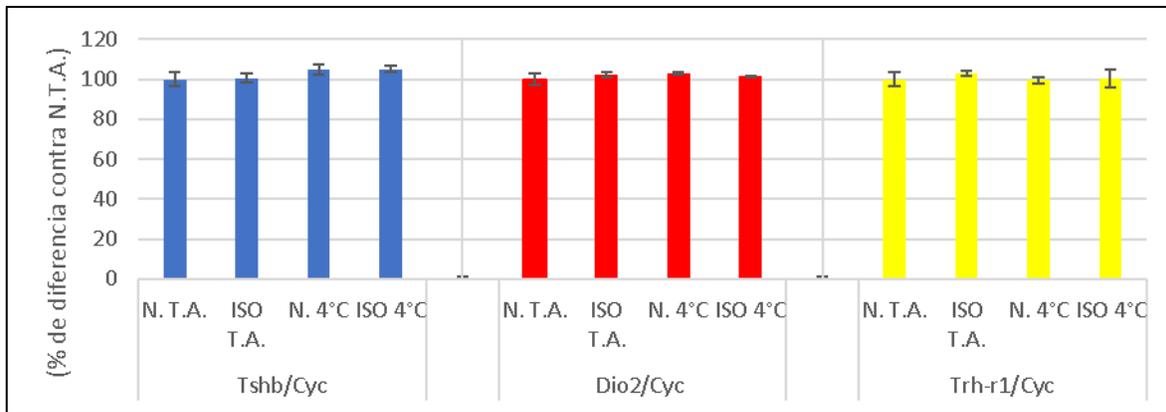
**Figura 14. Cuantificación de hormonas del eje HPT de ratas hembras Exp. 2.**

El aislamiento social no modifica la concentración sérica de TSH, T3 ni T4 en ratas hembra. En esta gráfica se observa un aumento en la concentración sérica de T3 y T4 en las ratas que fueron expuestas a frío en comparación con las que no lo fueron.



**Figura 15. Cuantificación de genes asociados con la regulación del eje HPT en HMB de ratas hembras del Exp. 1.**

El aislamiento social provoca un aumento del ARNm de Dio2 en HMB a T. A. en ratas hembra. En esta gráfica se observa una disminución de Dio2 de ratas aisladas a T.A. comparadas con las ratas control. (Trhde indica el ARNm de PPII, Dio2 indica el ARNm de la desyodasa 2)



**Figura 16. Cuantificación de genes asociados con la regulación del eje HPT en adenohipófisis de ratas hembras del Exp. 2.**

El aislamiento social no tiene efectos sobre el ARNm de *Tshb*, *Dio2* y *Trh-r1* en adenohipófisis de ratas hembras. En esta gráfica no hay cambios estadísticamente significativos. (*Tshb* indica el ARNm de la subunidad b de la TSH, *Dio2* indica el ARNm de la desyodasa 2 y *Trh-r1* indica el ARNm del receptor de TRH)

#### **7.4 Efecto del aislamiento social y el frío sobre la temperatura corporal y el tejido adiposo pardo**

Las hembras tienen, en promedio, una mayor temperatura corporal comparadas a los machos, a pesar de que su temperatura varíe con el ciclo estral [Marrone, et al, 1976], tanto a temperatura ambiente como a 4°C; no se observó una disminución en la temperatura corporal de los animales controles ni aislados después de una hora de exposición al frío (tabla 2).

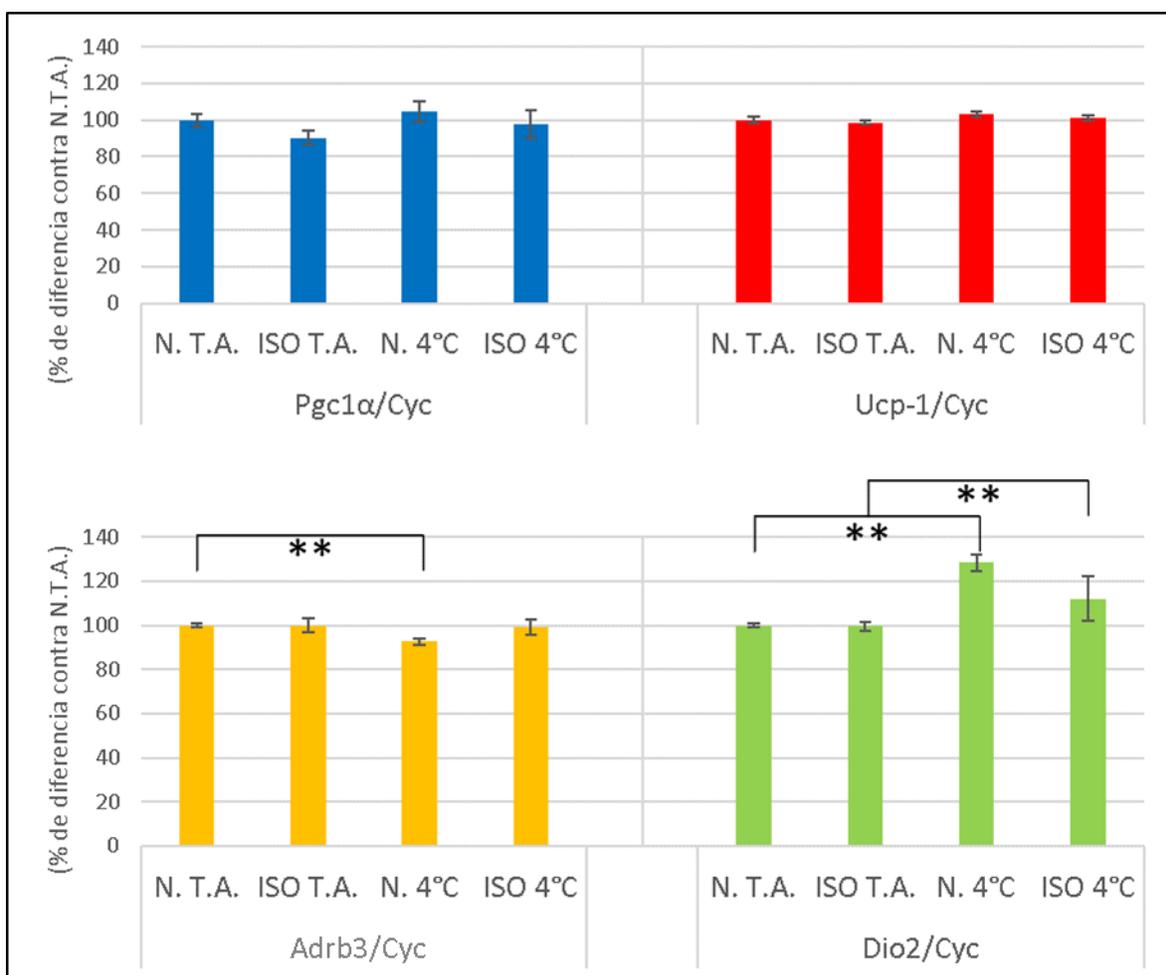
En condiciones basales, el aislamiento social no tuvo efectos sobre la expresión de los genes que participan en regular la termogénesis del tejido adiposo pardo, en ninguno de los sexos estudiados (figuras 17, 18 y 19) excepto por un pequeño aumento en la expresión de la *Pgc1a* en el experimento 1 de las hembras (figura 18). En los machos, la exposición al frío provocó un aumento en la expresión de *Dio2* independientemente de las condiciones de alojamiento de las ratas (figura 17) y disminuyó la expresión de *Adrb3* en las ratas naïve, pero no en las aisladas (figura 17). En las hembras, el frío indujo un aumento en la expresión de la *Pgc1a* en las ratas naïve del experimento 1 (figura 18), mientras que en el experimento 2 la expresión de *Pgc1a* aumentó tanto en las ratas alojadas en grupo como en las aisladas (figura 19). La actividad de la D2 aumentó en ambos sexos en respuesta al frío, independientemente de la

condición de alojamiento de las ratas (figuras 20 y 21).

	N. T. A.	ISO T. A.	N. 4°C	ISO 4°C
Machos	36.3 °C ±0.3	36 °C ±0.1	35.8 °C ±0.2	36 °C ±0.2
Hembras	38.8 °C ±0.2	38.3 °C ±0.2	38.3 °C ±0.2	38.2 °C ±0.2

**Tabla 2. Temperatura corporal de ratas machos y hembras**

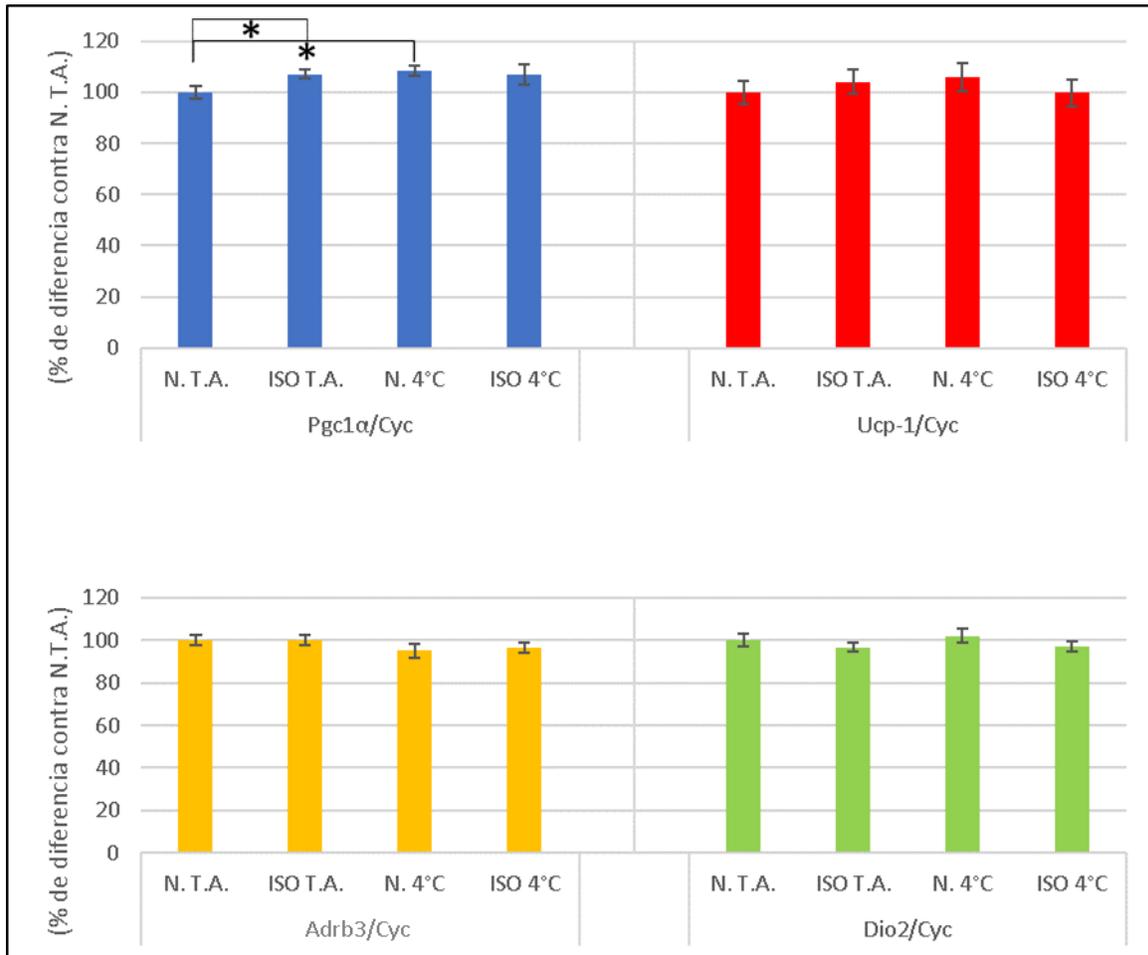
El frío y el aislamiento social no provocaron cambios significativos en la temperatura de las ratas. Las ratas hembras tienen una temperatura corporal más alta que las ratas machos.



**Figura 17. Cuantificación de genes asociados con la termogénesis en BAT de ratas machos.**

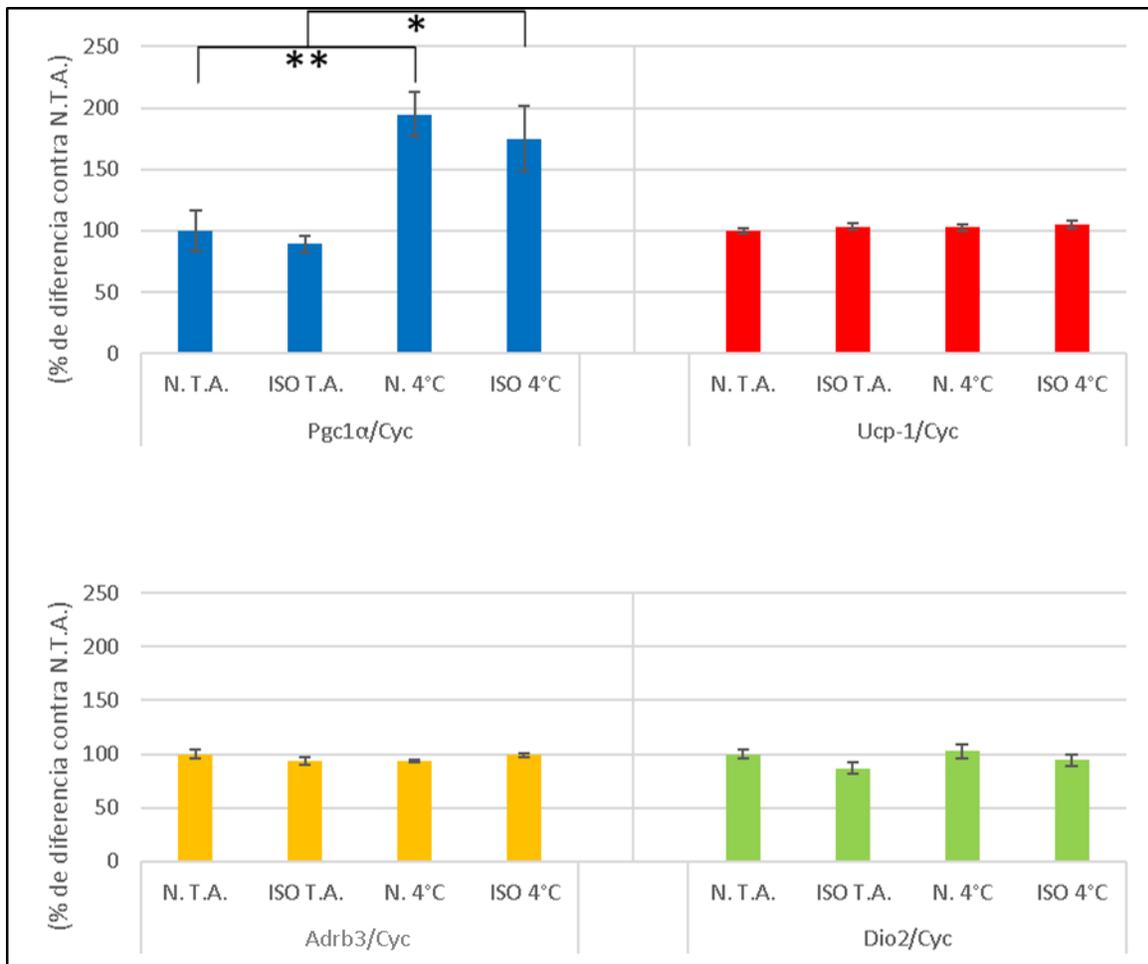
El aislamiento social induce una modificación en la expresión de ADRB3 en respuesta al frío en ratas macho. En

esta gráfica se observa una disminución del ARNm de *Adrb3* en ratas control que fueron expuestas a frío comparadas con las que no lo fueron. Además, las ratas que fueron expuestas a frío presentan un aumento en el ARNm de *Dio2* comparado con las ratas que no lo fueron. (*PGC1 $\alpha$*  indica el ARNm de *PGC1 $\alpha$* , *Ucp-1* el ARNm de UCP-1,  $\beta$  3-ar el ARNm de  $\beta$ 3-AR y *Dio2* el ARNm de la desyodasa 2)



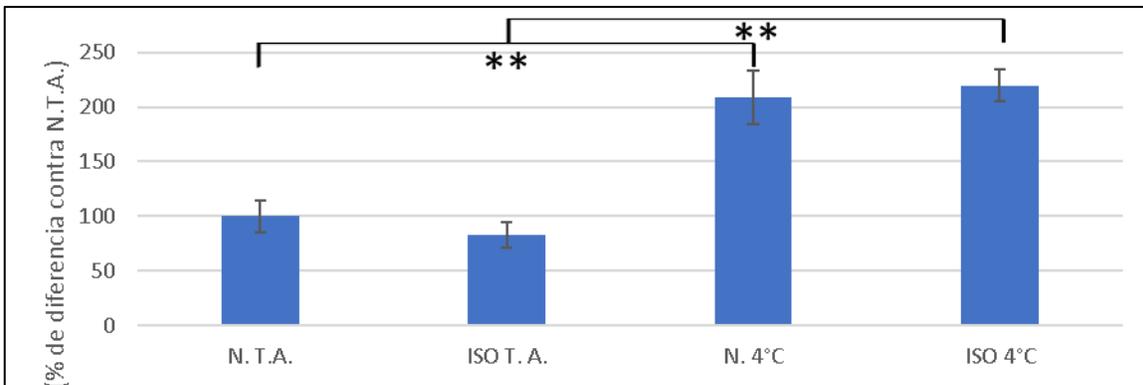
**Figura 18. Cuantificación de genes asociados con la termogénesis en BAT de ratas hembras del Exp.1.**

En esta gráfica se observa un aumento del ARNm de *Pgc1-a* sérico tanto en ratas aisladas que se mantuvieron a T.A. como ratas control que fueron expuestas a frío comparadas con las ratas control que no fueron expuestas a frío en ratas hembras. (*PGC1 $\alpha$*  indica el ARNm de *PGC1 $\alpha$* , *Ucp-1* el ARNm de UCP-1,  $\beta$  3-ar el ARNm de  $\beta$ 3-AR y *Dio2* el ARNm de la desyodasa 2)



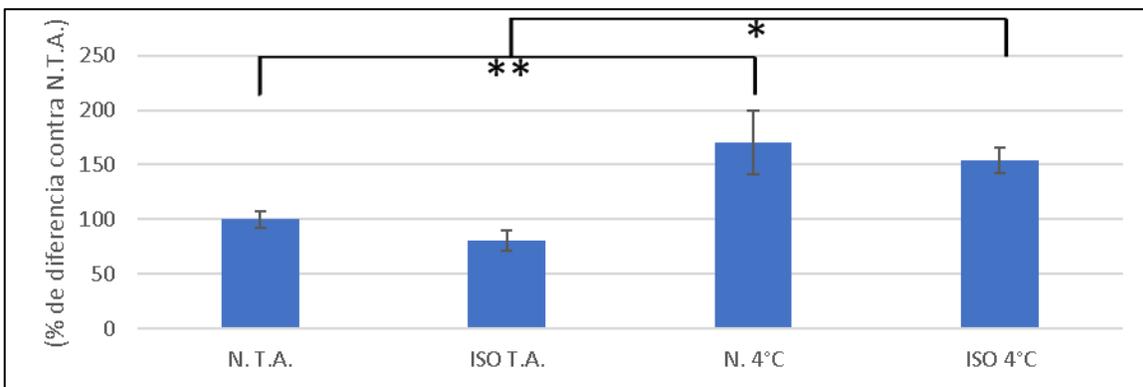
**Figura 19. Cuantificación de genes asociados con la termogénesis en BAT en ratas hembras del Exp. 2.**

El aislamiento social no induce cambios en la expresión de genes asociados con la termogénesis en BAT en ratas hembras. En esta gráfica se observa un aumento en la expresión de *Pgc1-a* de las ratas que fueron expuestas a frío comparadas con las que no lo fueron. (PGC1 $\alpha$  indica el ARNm de PGC1 $\alpha$ , Ucp-1 el ARNm de UCP-1, Adrb3 el ARNm de  $\beta$ 3-AR y Dio2 el ARNm de la desyodasa 2)



**Figura 20. Actividad de D2 en BAT de ratas machos.**

El aislamiento social no modifica la actividad de D2 en BAT de ratas machos. Aquí se observa un aumento de las ratas N. 4°C comparadas con N. T. A. y de ISO 4°C con ISO T.A. (D2 indica a la proteína desyodasa 2)



**Figura 21. Actividad de D2 en BAT de ratas hembras.**

El aislamiento social no modifica la actividad de D2 en BAT de ratas hembras. En esta gráfica se observa un aumento de las ratas N. 4°C comparadas con N. T. A. y de ISO 4°C con ISO T.A. (D2 indica a la proteína desyodasa 2)

## 8. Discusión

La adolescencia es una etapa del desarrollo vulnerable a diferentes tipos de estresores, ya que en este periodo diversos sistemas neuronales continúan desarrollándose y también existe una reorganización neuronal. El aislamiento social es un modelo de estrés crónico leve que resulta en alteraciones metabólicas [Perelló, et al, 2006; Jahng, et al, 2012; Arcego, et al, 2018;

Schiavone, et al, 2017] y conductuales como aumento en la actividad locomotora, ansiedad y agresión; también afecta la reactividad neuroendócrina en respuesta al estrés y estas alteraciones son sexualmente dimórficas [Pisu, et al, 2016].

### **8.1 Efectos del aislamiento social y el frío sobre el peso corporal y el tejido adiposo**

Algunos estudios previos han reportado que el aislamiento social induce una mayor ganancia de peso con respecto a los animales que son alojados en grupo [Fone & Porkess, 2008; Weintraub, et al, 2010]. Sin embargo, la mayoría de los estudios no encuentran diferencias en la ganancia de peso [Schubert, et al, 2009; Sahakian, et al, 1982; Thorsell, et al, 2005; Sánchez, et al, 1997; Weiss, 2003], lo cual coincide con nuestros resultados tanto para ratas machos como para hembras, y aunque se ha reportado que el estrés en otras etapas tempranas del desarrollo (durante la lactancia), como el estrés por separación materna, puede provocar la acumulación de tejido adiposo blanco [Bemardi, et al, 2013], ni las ratas machos ni las hembras aisladas en este estudio presentaron cambios en el peso de los distintos tejidos adiposos extraídos, sugiriendo que el aislamiento social no provocó un desbalance energético en nuestro modelo experimental. Se ha reportado que los animales que son aislados desde la pubertad, presentan una mayor acumulación de grasa visceral en la adultez [Schiavone, et al, 2017] e hiperplasia de la grasa inguinal y retroperitoneal [Sun, et al, 2014]. Sin embargo, no encontramos cambios significativos en los pesos de las grasas blancas que extrajimos (gonadal, interescapular y retroperitoneal). Estos resultados pueden ser explicados debido a que en ratas machos que fueron aislados no se observó una modificación de las hormonas tiroideas o de la concentración de corticosterona dependiente del aislamiento a temperatura ambiente, las cuales tienen efectos sobre el tejido adiposo, como discutido anteriormente. En ratas hembras, es posible que los cambios que se observan en la concentración de corticosterona y en algunos de los genes en BAT hayan fluctuado dependiendo de la etapa del ciclo estral en el que se encontraban las ratas, provocando que el tejido adiposo se mantuviera constante a largo plazo, como se observó.

## **8.2 Efectos del aislamiento social y el frío sobre las glándulas adrenales y la concentración sérica de corticosterona**

Las glándulas adrenales son esenciales para la respuesta al estrés del organismo y son reguladas tanto por el eje HPA como por el sistema simpato-adrenal. El estrés crónico puede inducir una hiperplasia e hipertrofia de estas glándulas, aumentando su peso [Ulrich-Lai, et al, 2006; Koolhaas, et al, 2011]. El aislamiento en las hembras puede aumentar el peso de las glándulas adrenales, aunque es un evento que no se observa frecuentemente [Syme, 1973]. Nosotros no encontramos cambios en el peso de las glándulas adrenales de las ratas hembras ni machos. En estudios anteriores, el aislamiento social parece no tener efectos sobre el peso de las glándulas adrenales de las ratas machos [Gamallo, et al, 1981; Sánchez, et al, 1997; Holson, et al, 1991] como observamos en nuestros resultados. A pesar de que la mayor parte de los estudios no observan cambios en el peso de las glándulas adrenales, sí hay un efecto reportado denominado el “síndrome de estrés por aislamiento” que afecta el comportamiento de las ratas [Holson, et al, 1991]. Este síndrome consiste en que, a pesar de que la actividad basal de las glándulas adrenales no haya sido alterada, y que no se observen cambios en el peso, (como fue nuestro caso) la respuesta al estrés sí se afecta. Por lo tanto, la falta de cambios en el peso de las glándulas adrenales en este experimento es indicativo de que no hay diferencia en la actividad basal de éstas, pero no descarta la posibilidad de que las ratas presenten el síndrome de estrés por aislamiento a juzgar por el incremento de corticosterona observado al exponer a las ratas aisladas al frío.

En los machos aislados que fueron expuestos al frío durante una hora, se indujo una mayor liberación de corticosterona a la circulación comparado con los animales controles que también fueron sometidos al frío (figura 7). Este resultado sugiere que las ratas machos pueden presentar el “síndrome de estrés por aislamiento”, ya que hay una liberación aumentada de glucocorticoides cuando son expuestas a un estrés agudo en su vida adulta. A pesar de que en las ratas hembras aisladas no se observó una diferencia significativa en la concentración de corticosterona comparado a las ratas que no fueron aisladas en respuesta al frío, el delta entre el grupo aislado a T.A. y el aislado a 4°C fue mayor vs los animales controles en el experimento 1 (figura 8). En el experimento 2 (figura 9), se observa una disminución de la corticosterona sérica en las ratas aisladas contra las que no lo fueron, y un aumento independiente del aislamiento cuando las ratas hembras fueron expuestas al frío. El

hecho de que las ratas reaccionen de forma distinta al aislamiento y al frío puede deberse a la etapa del ciclo estral en la que se encontraban, que puede afectar la reactividad del eje HPA. Específicamente, durante el proestro hay una mayor liberación de corticosterona en respuesta al estrés [Viau & Meaney, 1991; McCormick & Mathews, 2007], lo que podría explicar el aumento de la concentración de corticosterona en ratas aisladas a temperatura ambiente en el exp.2, mientras que este aumento no se observó en el exp.1. A pesar de esto, ratas hembras que fueron aisladas por 24 horas que se encontraban en proestro fueron menos propensas a mostrar conductas de ansiedad que sus contrapartes en estro [Palanza, et al, 2001].

### **8.3 Efectos del aislamiento social y el frío sobre la actividad del eje HPT**

El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides es uno de los principales sistemas endócrinos encargado de regular el metabolismo energético, y alteraciones en su funcionamiento puede llevar a un desequilibrio en el balance energético [López, et al, 2013; Baxter & Web, 2009]. En este estudio, encontramos que el aislamiento social a partir de la adolescencia y hasta la vida adulta induce cambios en el sistema TRHérgico en los machos adultos, pero no en las hembras. Como recordatorio, el eje HPT está controlado por la TRH, sintetizada en el NPV del hipotálamo, y el péptido maduro es liberado en la eminencia media del hipotálamo mediobasal (HMB), donde puede ser inactivado por la PPII localizada en los tanicitos, limitando de esta forma la cantidad de TRH que llega a la pituitaria anterior [Fekete & Lechan, 2014]. Los tanicitos localizados en el tercer ventrículo también expresan altos niveles de la *Dio2*, que convierte la T4 a T3, la cual actúa de forma parácrina en las neuronas TRHérgicas para inhibir su síntesis [Fekete & Lechan, 2007]. En las ratas machos que fueron aislados, observamos una disminución en la expresión de la *Trhde* (el ARNm de PPII) y de la *Dio2* en el HMB, estos cambios probablemente hayan contribuido al aumento en la concentración sérica de TSH observada en estos animales. La expresión hipotalámica de *Dio2* es regulada por diferentes estímulos hormonales, metabólicos y ambientales. La D2 es regulada por la concentración circulante de T4, por ejemplo, durante el ayuno, cuando la concentración sérica de T4 es baja, aumenta el ARNm y la actividad de la D2 en el hipotálamo mediobasal [Diano, et al, 1998; Lazcano, et al, 2015]; la elevada concentración de corticosterona junto

con una disminución en la concentración de leptina en el ayuno, contribuyen al aumento observado en la expresión de *Dio2* en el hipotálamo [Coppola, et al, 205]. La regulación de la expresión de *Dio2* en hipotálamo también es sensible a diferentes estresores, y se ha reportado un aumento en los niveles de su actividad y ARNm cuando animales adultos son sometidos a un estrés agudo [Helmreich & Tylee 2011; Baumgartner, et al, 1998], sin embargo, nosotros encontramos que el estrés crónico a partir de una edad temprana inhibe su expresión en ratas machos, mientras que en las hembras sí observamos un aumento en la expresión de *Dio2*, lo que podría contribuir a que se observe una tendencia de disminución de TSH sérica. Al igual que la D2, la expresión de *Trhde* en el HMB es regulada por la concentración circulante de las hormonas tiroideas y por el estado energético del animal, aumentando los niveles de su ARNm a las 48h de un ayuno y disminuyendo en el hipotiroidismo [Lazcano, et al, 2015]. La expresión de la *Trhde* también es regulada en los tanicitos en respuesta a un estrés crónico, ratas machos adultos que fueron separados de su madre 3h diarias durante la lactancia, presentan una expresión elevada de *Trhde* en la eminencia media [Jaimes-Hoy, et al, 2016]. La disminución en los niveles de ARNm de *Trhde* en HMB que encontramos en los machos aislados podría estar ligada a la disminución en la concentración intrahipotalámica de T3, debido a la baja expresión de *Dio2* en los tanicitos sin embargo se desconoce este dato a la fecha [Lazcano, et al, 2015].

Las neuronas TRHérgicas del hipotálamo responden a distintas condiciones fisiológicas como a cambios energéticos y a estímulos ambientales como el frío. En respuesta a éste, la síntesis de Trh aumenta de manera rápida y transitoria, estimulando la liberación de TSH [Sotelo-Rivera, et al, 2014] y unas horas después (2h) el aumento de las hormonas tiroideas en la circulación [Hefco, et al, 1975], activándose así la respuesta termogénica del tejido adiposo pardo. En nuestro estudio, reproducimos los resultados reportados que la concentración sérica de TSH aumenta en los machos que fueron expuestos 1 hora al frío: si bien no encontramos un aumento significativo en la expresión de *Trh* en el NPV, observamos una tendencia, y la concentración sérica de TSH aumentó significativamente como se ha reportado [Zoeller, et al, 1990, Sotelo-Rivera, et al, 2014; Uribe, et al, 1991]. En cuanto a las ratas hembras, si bien se ha reportado que el frío induce la expresión de *c-fos* (el cual puede ser usado como un marcador de actividad neuronal [Bullit, 1990; Hoffman, et al, 1993]) en aproximadamente el 25% de las neuronas TRHérgicas del NPV [Sánchez, et al, 2001], el

aumento en la expresión de *Trh* en ratas vírgenes tiene una variación mayor comparado a los machos [Sánchez, et al, 2001] y los niveles de su ARNm son regulables dependiendo del ciclo estral de las ratas [Uribe, et al, 1991]. Además, se ha observado un aumento de la actividad basal de la glándula tiroides durante el estro [Soliman & Reineke, 1954]. Esto podría explicar por qué no hay un aumento de las HT en el exp.1 de ratas hembras en respuesta al frío en comparación con las ratas que estaban a temperatura ambiente, a pesar de que se puede observar el aumento de la TSH. Por el contrario, en las ratas en proestro se observa un aumento de la concentración de corticosterona en respuesta al estrés [Viau & Meaney, 1991], y éste puede inhibir la activación del eje HPT por el frío, provocando que no se observe un aumento de TSH [Sotelo, et al, 2014], como se vio en las ratas hembras del Exp.2. Por lo tanto, es importante que en experimentos futuros se realice un frotis vaginal a las ratas para determinar su ciclo estral y tomarlo en cuenta al momento de analizar e interpretar resultados, o bien ciclar a las ratas.

El aislamiento social indujo una respuesta diferencial sobre la actividad del eje HPT entre los machos y hembras que fueron expuestos 1 hora al frío. El aumento en la concentración sérica de TSH inducido por el frío se encontró inhibido en los machos; mientras que, en las hembras aisladas, se observó una activación del eje HPT, reflejado por un aumento en la concentración de TSH en el experimento 1 y un aumento en la concentración de T3 y T4 en suero en el experimento 2. La activación del eje HPT en respuesta al frío puede verse atenuada en condiciones donde hay una exposición a un estrés agudo previo al estímulo del frío como el aislamiento por 2 horas [Uribe, et al, 2011] o una inyección de corticosterona 1 hora antes de que los animales sean expuestos a 4°C [Sotelo, et al, 2014], así que es posible que el aumento de concentración de corticosterona sérica observado en las ratas macho aisladas que fueron expuestas a frío haya contribuido a que no se presentara un aumento de la concentración sérica de TSH inducido por el frío en estas ratas. Se ha reportado que el eje HPT presenta diferencias dimórficas dependiendo del sexo, por ejemplo, las hembras presentan una menor concentración sérica de TSH y de expresión de TSH $\beta$  en hipófisis, mayor concentración sérica de T3 y menor actividad hepática de D1 comparado con los machos en condiciones basales [Cizza, et al, 1996; Marassi, et al, 2007]. Además, estas diferencias entre sexos, sobre la actividad del eje HPT ante un reto metabólico en animales con un historial de estrés crónico se ha reportado previamente. Por ejemplo, ratas adultas machos que fueron estresados

durante el periodo de la lactancia, presentan una respuesta disminuida del eje HPT después de 48 horas de ayuno; mientras que las hembras con estrés neonatal conservan la respuesta adaptativa del eje tiroideo ante el ayuno que representa un estado de balance energético negativo [Jaimes-Hoy, et al, 2016].

#### **8.4 Efectos del aislamiento social y el frío en el tejido adiposo pardo**

Las HT participan en la regulación de la actividad del tejido adiposo pardo (BAT), una de sus principales funciones en este tejido es la de estimular la termogénesis a través de la regulación de la expresión de las proteínas desacopladoras (UCP), la cual puede llegar a componer hasta el 20% de la proteína mitocondrial [Lafontan & Berlan, 1993]. La actividad metabólica del BAT es iniciada por el sistema nervioso simpático (SNS) a través de su interacción con los receptores beta-adrenérgicos, pero requiere de la presencia de HT, las cuales, además, pueden modificar el número de receptores beta-adrenérgicos que se encuentran en BAT [de Jesus, et al, 2001; Lafontan & Berlan, 1993]. Las HT son transportadas a los adipocitos del BAT, donde por acción de la D2, aumenta la concentración intracelular de T3 a partir de T4. T3, a través de su receptor TR $\alpha$ , aumenta la respuesta del AMPc a la estimulación simpatoadrenérgica, mientras que el TR- $\beta$  aumenta la expresión de la *Ucp1* [de Jesus, et al, 2001]. Alteraciones en estos mecanismos, pueden poner en riesgo la sobrevivencia de los animales cuando son expuestos a una temperatura baja. El receptor *Adrb3* es el principal receptor adrenérgico responsable de la respuesta termogénica, y el frío indujo una disminución de su expresión en las ratas controles como era de esperarse [Scarpace, et al, 1999], pero no en las ratas que fueron aisladas. Sin embargo, una hora de exposición al frío estimuló, tanto en las ratas controles como los aislados, la expresión (machos) y actividad (machos y hembras) de la D2 en el BAT, como se ha reportado previamente [Murakami, et al, 2001; Sotelo-Rivera, et al, 2014]; así como la expresión de la *Pgc1a* en las hembras; aunque no observamos cambios en los niveles del ARNm de la *Ucp1*, al igual que en el reporte de Sotelo-Rivera y cols. (2014). Estos resultados sugieren que, a pesar de que el aislamiento social altera la actividad basal del eje HPT, el mecanismo termogénico de las ratas no se ve afectado, y son capaces de mantener una temperatura corporal constante en respuesta a una 1 hora de exposición al frío, como se muestra en la

tabla2.

A continuación, se presenta una tabla (tabla 3) con un resumen de las gráficas que se expusieron anteriormente. Sólo se muestran las mediciones en que se vieron diferencias significativas en al menos uno de los grupos. En esta tabla se pueden apreciar las diferencias que provoca el aislamiento social entre ratas machos y hembras.

Elemento medido	Aislados vs Naïve T.A. Machos	Naïve frío vs T.A. Machos	Aislados frío vs Aislados T.A. Machos	Aislados frío vs Naïve frío Machos	Aislados vs Naïve T.A. Hembras	Naïve frío vs T.A. Hembras	Aislados frío vs Aislados T.A. Hembras	Aislados frío vs Naïve frío Hembras
Alimento consumido	↑	No aplica	No aplica	No aplica	—	No aplica	No aplica	No aplica
Corticoesterona sérica	—	↑	↑	↑	↓ o ↑	↑	↑ o —	↑ o —
TSH sérica	—	↑	↓	↓	—	↑ o —	↑ o —	—
T3 sérica	—	—	—	—	—	↑ o —	↑ o —	—
T4 sérica	—	—	—	—	—	↑ o —	↑ o —	—
<i>Trhde</i> en HMB	↓	—	—	↓	—	—	—	—
<i>Dio2</i> en HMB	↓	—	—	↓	↑	—	—	—
<i>Adrβ3</i> en BAT	—	↓	—	—	—	—	—	—
<i>Dio2</i> en BAT	—	↑	↑	—	—	—	—	—
<i>Pgc1-a</i> en BAT	—	—	—	—	↑	↑	↑	—

					o		o	
Actividad de D2 en BAT	—	↑	↑	—	—	↑	↑	—

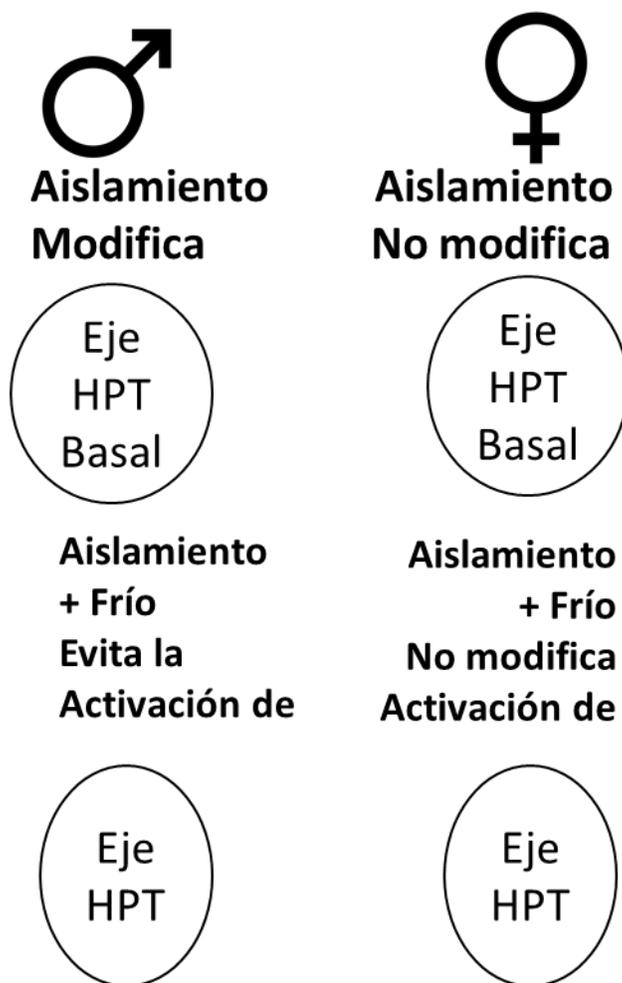
**Tabla 3. Resumen de los resultados.**

Todas las flechas azules indican un aumento significativo, las líneas azules horizontales indican que no hubo cambio y las flechas rojas indican una disminución. En caso de que aparezca más de un símbolo en la misma casilla, eso indica que ambos resultados fueron observados.

### 9. Conclusiones

Aislar a las ratas a partir de una edad temprana, importante en la maduración neuroendócrina, induce cambios sexo-dependientes, que perduran en la vida adulta. El aislamiento social produjo cambios sobre la actividad basal del eje HPT solamente en las ratas macho, específicamente, en la expresión de los genes que regulan el metabolismo TRHérgico en el hipotálamo mediobasal y en la concentración sérica de TSH. La activación del eje HPT inducida por la exposición al frío, está inhibida en los machos que estuvieron aislados, mientras que, en las hembras, esta respuesta adaptativa se conserva. Estos resultados sugieren una mayor susceptibilidad por parte de las ratas machos de la actividad basal del eje HPT, así como a un reto metabólico, después de un estrés crónico psicológico durante la adolescencia. A pesar de estos cambios en el eje tiroideo, nuestros resultados sugieren que la respuesta termogénica del tejido adiposo inducido por el frío se conserva tanto en las ratas machos como en las hembras, lo que permite que las ratas mantengan regulada su temperatura corporal después de una hora de exposición al frío. Es posible que alteraciones en estos sistemas afecten la supervivencia de las ratas machos al exponerlas a frío por más tiempo, ya que el eje HPA y HPT son fundamentales para la regulación de la homeostasis energética. Debido a que ratas machos y hembras tienen diferentes vulnerabilidades en las distintas etapas de desarrollo, la actividad del eje HPT de las ratas hembras podría ser más susceptible que la de los machos a un estresor psicológico durante una etapa de desarrollo distinto a la adolescencia. Nuestros resultados abren la puerta para la exploración de los efectos de estresores en distintas etapas del desarrollo sobre el eje HPT y las diferencias entre los sexos.

En la ilustración 4 se resumen los efectos que tiene el aislamiento social sobre las ratas machos y hembras.



**Ilustración 4.** Resumen de los efectos que tiene el aislamiento social sobre el eje HPT y la termogénesis en BAT en ratas machos y hembras. El aislamiento social produjo cambios sobre la actividad basal del eje HPT solamente en las ratas macho. La activación del eje HPT inducida por la exposición al frío, está inhibida en los machos que estuvieron aislados, mientras que, en las hembras, esta respuesta adaptativa se conserva.

## 10. Perspectivas

- 1.- Repetir el experimento en ratas hembra teniendo cuidado de ciclar a las ratas para estudiar el efecto del ciclo estral sobre el estrés por aislamiento social.
- 2.- Medir la expresión de PPII y D2 en HMB de ratas hembra del Exp. 2 y ratas macho del Exp. 3.
- 3.- Medir la expresión de TRH en NPV de ratas hembra Exp. 2 y ratas macho del Exp. 3.

## Bibliografía

- [1] B. Niall, D. Anita, K. Ronald C., and S. Elizabeth A. Effects of daily stress on negative mood. *Journal of Personality and Social Psychology*, 57(5): 808-818, 1989.
- [2] J. M. Koolhaas, A. Bartolomucci, B. Buwalda, S.F. de Boer, G. Flgge, S.M. Korte, P. Meerlo, R. Murison, B. Olivier, P. Palanza, G. Richter-Levin, A. Sgoifo, T. Steimer, O. Stiedl, G. van Dijk, M. Whr, and E. Fuchs. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(5):1291 – 1301, 2011.
- [3] H. Selye. “Stress and the General Adaptation Syndrome. *British Medical Journal* 1(4667):1383–1392, 1950.
- [4] B. Myers, J. M. McKlveen, and J. P. Herman. Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(2):180 – 196, 2014. CRH/Stress in Honor of Wylie Vale.
- [5] J. Maniam and M. J. Morris. The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology*, 63(1):97 – 110, 2012. Central Regulation of Food Intake and Energy Expenditure.
- [6] C. Fekete and R. M. Lechan. Central regulation of hypothalamicpituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine Reviews*, 35(2):159–194, 2014. PMID: 24423980.
- [7] P. Joseph-Bravo, L. Jaimes-Hoy, and J. L. Charli. Regulation of trh neurons and energy

homeostasis-related signals under stress. *Journal of Endocrinology*, 224(3):R139-R159, 2015.

[8] M. López, C. V. Alvarez, R. Nogueiras, and C. Diéguez. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*, 19(7):418 – 427, 2013.

[9] M. J. Krashes, B. P. Shah, J. C. Madara, D. P. Olson, D. E. Stochlic, A. S. Garfield, L. Vong, H. Pei, M. Watabe-Uchida, N. Uchida, S. D. Liberles, and B. B. Lowell. An excitatory paraventricular nucleus to agrp neuron circuit that drives hunger. *Nature*, 507(7491):238242, 2014.

[10] P. Joseph-Bravo, L. Jaimes-Hoy, R. M. Uribe, and J. L. Charli. 60 years of neuroendocrinology: Trh, the first hypophysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *Journal of Endocrinology*, 226(2):T85-T100, 2015.

[11] R. T. Zoeller, N. Kabeer, and H. E. Albers. 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):2955-2962, 1990.

[12] M. Murakami, Y. Kamiya, T. Morimura, O. Araki, M. Imamura, T. Ogiwara, H. Mizuma, and M. Mori. Thyrotropin receptors in brown adipose tissue: Thyrotropin stimulates type II iodothyronine deiodinase and uncoupling protein-1 in brown adipocytes. *Endocrinology*, 142(3):1195–1201, 2001.

[13] I. Sotelo-Rivera, L. Jaimes-Hoy, A. Cote-Vlez, C. Espinoza-Ayala, J. L. Charli, and P. Joseph-Bravo. An acute injection of corticosterone increases thyrotrophin-releasing hormone expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus but interferes with the rapid hypothalamus pituitary thyroid axis response to cold in male rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(12):861-869, 2014.

[14] J.M. Koolhaas, A. Bartolomucci, B. Buwalda, S.F. de Boer, G. Flgge, S.M. Korte, P. Meerlo, R. Murison, B. Olivier, P. Palanza, G. Richter-Levin, A. Sgoifo, T. Steimer, O. Stiedl, G. van Dijk, M. Whr, and E. Fuchs. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 35(5):1291 – 1301, 2011.

[15] R. M. Uribe, M. Cisneros, M. A. Vargas, L. Lezama, A. Cote-Vlez, P. Joseph-Bravo,

and J. L. Charli. 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 Research*, 1367:188 - 197, 2011.

[16] L. C. Hawkley, S. W. Cole, J. P. Capitanio, G. J. Norman, and J. T. Cacioppo. Effects of social isolation on glucocorticoid regulation in social mammals. *Hormones and Behavior*, 62(3):314 - 323, 2012. Special Issue: The Neuroendocrine-Immune Axis in Health and Disease.

[17] G. Paxinos and C. Watson *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Fifth edition. Elsevier Academic Press (2005)

[18] P. Chomczynski and N. Sacchi. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1):156 – 159, 1987.

[19] A. Gwosdow-Cohen, C. L. Chen, and E. L. Besch. Radioimmunoassay (RIA) of serum corticosterone in rat. *Experimental Biology and Medicine*, 170(1):29–34, 1982.

[20] S. Pavelka. Radiometric enzyme assays: development of methods for extremely sensitive determination of types 1, 2 and 3 iodothyronine deiodinase enzyme activities. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 286(3):861–865, 2010.

[21] A. Mehlem, C. E Hagberg, L. Muhl, U. Eriksson, and A. Falkevall. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nature Protocols*, 8:1149–1154, 2013)

[22] A. Weintraub, J. Singaravelu, and S. Bhatnagar. Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. *Brain Research*, 1343:83 – 92, 2010

[23] J. R. Bernardi, C. F. Ferreira, G. Senter, R. Krolow, B. W. de Aguiar, A. K. Portella, M. Kauer-Sant’Anna, F. Kapczinski, C. Dalmaz, M. Z. Goldani, and P. P. Silveira. Early life stress interacts with the diet deficiency of omega-3 fatty acids during the life course increasing the metabolic vulnerability in adult rats. *PLoS ONE*, 8(4):1–11, 04 2013

[24] L. A. Syme. Social isolation at weaning: Some effects on two measures of activity.

*Animal Learning & Behavior*, 1(3):161–163, 1973.

[25] A. Gamallo, A. Villanua, G. Tranco, and A. Fraile. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiology & Behavior*, 36(2):217 – 221, 1981.

[26] E. Hefco, L. Krulich, P. Illner, and P. R. Larsen. Effect of acute exposure to cold on the activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid system. *Endocrinology*, 97(5):1185–1195, 1975. PMID: 1183407.

[27] B. S. McEwen and J. C Wingfield. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43(1):2 – 15, 2003.

[28] A. Thorsell, C. J. Slawecki, A. E. Khoury, A. A. Mathe, and C. L. Ehlers. The effects of social isolation on neuropeptide y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83(1):28 – 34, 2005.

[29] M. M. Sánchez, F. Aguado, F. Sánchez-Toscano, and D. Saphier. Neuroendocrine and Immunocytochemical Demonstrations of Decreased Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Responsiveness to Restraint Stress after Long-Term Social Isolation. *Endocrinology*, 139(2): 579-587, 1998

[30] I. C Weiss, C. R Pryce, A. L Jongen-Rlo, N. I NanzBahr, and J. Feldon. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research*, 152(2):279 – 295, 2004.

[31] B.J. Sahakian, Christine Burdess, Heidi Luckhurst, and Paul Trayhurn. Hyperactivity and obesity: The interaction of social isolation and cafeteria feeding. *Physiology & Behavior*, 28(1):117-124, 1982

[32] M.I. Schubert, M.V. Porkess, N. Dashdorj, K.C.F. Fone, and D.P. Auer. Effects of social isolation rearing on the limbic brain: A combined behavioral and magnetic resonance imaging volumetry study in rats. *Neuroscience*, 159(1):21 – 30, 2009.

[33] Kevin C.F. Fone and M. Veronica Porkess. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents- Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 32(6):1087 – 1102, 2008.

[34] R.R. Holson, A.C. Scallet, S.F. Ali, and B.B. Turner. Isolation stress revisited: Isolation-

rearing effects depend on animal care methods. *Physiology and Behavior*, 49(6):1107 – 1118, 1991.

[35] S. Dronjak, L. Gavrilovi, D. Filipovi, and M. B. Radoji. Immobilization and cold stress affect sympathoadrenomedullary system and pituitaryadrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiology & Behavior*, 81(3):409 – 415, 2004.

[36] E. Sánchez, R. M. Uribe, G. Corkidi, R. T. Zoeller, M. Cisneros, M. Zacarias, C. Morales-Chapa, J. L. Charli, and P. Joseph-Bravo. Differential Responses of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Neurons to Cold Exposure or Suckling Indicate Functional Heterogeneity of the TRH System in the Paraventricular Nucleus of the Rat Hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 74:407-422, 2001

[37] H. Liang, and W. F. Ward. PGC-1 $\alpha$ : a key regulator of energy metabolism *Advances in Physiology Education*, 30:145-151, 2006

[38] E. Arellanes-Licea and M. Díaz-Muñoz. Ritmicidad biológica de la secreción de ghrelina, GH e IGF-1, y su regulación por la alimentación *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 20:74-87, 2012

[39] N. Mrosovsky. Rheostasis: The Physiology of Change. First edition. Oxford University Press Inc (1990)

[40] Institute of Medicine and Committee on Military Nutrition Research: Nutritional Needs in Cold and High-Altitude Environments: Applications for Military Personnel in Field Operations. First edition. National Academy Press (1996)

[41] M. Serra, M. G. Pisu, M. Littera, G. Papi, E. Sanna, F. Tuveri, L. Usala, R. H. Purdy, and G. Biggio. Social Isolation-Induced Decreases in Both the Abundance of Neuroactive Steroids and GABAA Receptor Function in Rat Brain *Journal of Neurochemistry*, 75: 732-740, 2000

[42] N. Wongwitdecha and C.A. Marsden. Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test *Behavioural Brain Research*, 75: 27-32, 1996

[43] L. S. Wilkinson, S. S. Killcross, T. Humby, F. S. Hall, M. A. Geyer, and T. W. Robbins.

Social Isolation in the Rat Produces Developmentally Specific Deficits in Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle Response Without Disrupting Latent Inhibition *Neuropsychopharmacology*, 10: 61-72, 1994

[44] E. R. de Kloet, M. Joëls, and F. Holsboer. Stress and the brain: from adaptation to disease *Nature Reviews Neuroscience*, 6: 463-475, 2005

[45] T. Frodl and Veronica O'Keane. How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans *Neurobiology of Disease*, 52: 24-37, 2013

[46] N. E. Simmons, H. M. Do, M. H. Lipper, E. R. Laws Jr. Cerebral atrophy in Cushing's disease *Surgical Neurology*, 53: 72-76, 2000

[47] J.A.O. Ahlquist, J.A. Franklyn, D.B. Ramsden, and M.C. Sheppard. The influence of dexamethasone on serum thyrotrophin and thyrotrophin synthesis in the rat *Molecular and Cellular Endocrinology*, 64: 55-61, 1989

[48] D.L. Helmreich, D.B. Parfitt, X. Y. Lu, H. Akil, and S. J. Watson. Relation between the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis during Repeated Stress *Neuroendocrinology*, 81:183-192, 2005

[49] S. Muchimapura, A. J. Fulford, R. Mason, and C. A. Marsden. Isolation rearing in the rat disrupts the hippocampal response to stress *Neuroscience*, 112: 697-705, 2002

[50] J. Lin, C. Handschin, and B. M. Spiegelman. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators *Cell Metabolism*, 1: 361-370, 2005

[51] M. Toledo-Rodríguez and C. Sandi. Stress before Puberty Exerts a Sex- and Age-Related Impact on Auditory and Contextual Fear Conditioning in the Rat *Neural Plasticity*, 2007: 1-12, 2007

[52] C. M. McCormick and I. Z. Mathews. HPA function in adolescence: Role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 86: 220-233, 2007

[53] V. Viau, B. Bingham, J. Davis, P. Lee, and M. Wong. Gender and Puberty Interact on the Stress-Induced Activation of Parvocellular Neurosecretory Neurons and Corticotropin-

Releasing Hormone Messenger Ribonucleic Acid Expression in the Rat *Endocrinology*, 146: 137-146, 2005

[54] B. L. Hankin, R. Mermelstein, and L. Roesch. Sex Differences in Adolescent Depression: Stress Exposure and Reactivity Models *Child Development*, 78: 279-295, 2007

[55] L. R. Stroud, P. Salovey, and E. S. Epel. Sex differences in stress responses: social rejection versus achievement stress *Biological Psychiatry*, 15: 318-327, 2002

[56] B. M. Kudielka, C. Kirschbaum. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review *Biological Psychology*, 69: 113-132, 2005

[57] P. R. Larsen. Triiodothyronine: Review of recent studies of its physiology and pathophysiology in man *Metabolism - Clinical and Experimental*, 21: 1073-1092, 1972

[58] R.M. Uribe, J. L. Redondo, J. L. Charli, P. Joseph-Bravo. Suckling, and Cold Stress Rapidly and Transiently Increase TRH mRNA in the Paraventricular Nucleus *Neuroendocrinology*, 58: 140-145, 1993

[59] C. M. Pariante and S. L. Lightman. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments *Trends in Neurosciences*, 31: 464-468

[60] R. T. Zoeller, S. W. Tan, and R. W. Tyl General Background on the Hypothalamic Pituitary-Thyroid (HPT) Axis *Critical Reviews in Toxicology*, 37: 1-2, 11-53

[61] R. D. Romeo, I. N. Karatsoreos, F. S. Ali, and Bruce S. McEwen. The effects of acute stress and pubertal development on metabolic hormones in the rat *The International Journal on the Biology of Stress*, 10(1): 101-106

[62] S. Wüst, I. S. Federenko, E. F. C. van Rossum, J. W. Koper, D. H. Hellhammer. Habituation of cortisol responses to repeated psychosocial stress—further characterization and impact of genetic factors *Psychoneuroendocrinology*, 30(2) 199-211

[63] J. A. Angulo, M. Ledoux, and B. S. McEwen. Genomic Effects of Cold and Isolation Stress on Magnocellular Vasopressin mRNA-Containing Cells in the Hypothalamus of the Rat *Journal of Neurochemistry*, 56(6): 2033-2038

[64] E. Fliers, A. Kalsbeek, and A. Boelen. Beyond the fixed setpoint of the hypothalamus–pituitary–thyroid axis *European Journal of Endocrinology*, 171(5): 197-208

- [65] Y. Xue, S. Q. Shen, J. C. Corbo, and V. J. Kefalov. Circadian and light-driven regulation of rod dark adaptation *Scientific Reports*, 5(17616): 1-10
- [66] M. Puerta, M. Abelenda, M. Rocha, and P. Trayhurn. Effect of Acute Cold Exposure on the Expression of the Adiponectin, Resistin and Leptin Genes in Rat White and Brown Adipose Tissues *Hormone and Metabolic Research*, 34(11/12): 629-634
- [67] M. Perelló, F. Chacon, D. P. Cadrinali, A. I. Esquifino, and E. Spinedi. Effect of social isolation on 24-h pattern of stress hormones and leptin in rats *Life Sciences*, 78 (16): 1857-1862, 2006
- [68] J. W. Jahng, S. B. Yoo, V. Ryu, and J. Lee. Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats *International Journal of Developmental Neuroscience*, 30 (1): 47-53, 2012
- [69] D. M. Arcego, A. P. Toniazzo, R. Krolow, C. Lampert, C. Berlitz, E. d. S. Garcia, F. d. C. Nicola, J. B. Hoppe, M. M. Gaelzer, C. P. Klein, and C. Lazzaretti. Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats *Molecular Neurobiology* 55 (4): 2740-2753, 2018
- [70] S. Schiavone, E. Mhillaj, M. Neri, M. G. Morgese, P. Tucci, M. Bove, M. Valentino, G. D. Giovanni, C. Pomara, E. Turillazzi, L. Trabace, and V. Cuomo Early Loss of Blood-Brain Barrier Integrity Precedes *NOX2* Elevation in the Prefrontal Cortex of an Animal Model of Psychosis *Molecular Neurobiology* 54 (3): 2031-2044, 2017
- [71] M. G. Pisu, A. Garau, G. Boero, F. Biggio, V. Pibiri, R. Dore, V. Locci, E. Paci, P. Porcu, and M. Serra. Sex differences in the outcome of juvenile social isolation on HPA axis function in rats *Neuroscience* 320 (21): 172-182, 2016
- [72] M. Sun, E. Y. Choi, D. J. Magee, C. W. Stets, M. J. Doring, and E. D. Lin. Metabolic Effects of Social Isolation in Adult C57BL/6 Mice *International Scholarly Research Notices* 2014: 9 páginas, 2014
- [73] Y. M. Ulrich-Lai, H. F. Figueiredo, M. M. Ostrander, D. C. Choi, W. C. Engeland, and J. P. Herman. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 291 (5): 965-973, 2006

- [74] S. K. Fried, D. A. Bunkin, A. S. Greenberg. Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83 (3): 847-850, 1998
- [75] C. Xu, J. He, H. Jiang, L. Zu, W. Zhai, S. Pu, G. Xu. Direct Effect of Glucocorticoids on Lipolysis in Adipocytes *Molecular Endocrinology* 23 (8): 1161-1170, 2009
- [76] S. M. Greff. A NOVEL ROLE FOR ARGININE IN ENHANCING NEONATAL THERMOGENESIS *Tesis entregada a Office of Graduate Studies of Texas A&M University*, 2011
- [77] S. M. King and S. L. Gray. Role of Pituitary Adenylate-cyclase Activating Polypeptide (PACAP) in Energy Expenditure and Thermogenesis *Canadian Journal of Diabetes*, 36 (5): 37, 2012
- [78] H. S. Chowdrey, P. J. Larsen, M. S. Harbuz, D. S. Jessop, G. Aguilera, D. J. A. Eckland, and S. L. Lightman. Evidence for arginine vasopressin as the primary activator of the HPA axis during adjuvant-induced arthritis *British Journal of Pharmacology*, 116 (5): 2417-2424, 1995
- [79] R. W. Pamerter & G. A. Hedge. Inhibition of Thyrotropin Secretion by Physiological Levels of Corticosterone *Endocrinology*, 106 (1): 162-166, 1980
- [80] M. Harris, C. Aschkenasi, C. F. Elias, A. Chandrankunnel, E. A. Nillni, C. Bjørnbæk, J. K. Elmquist, J. S. Flier, and A. N. Hollenberg. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling *The Journal of Clinical Investigation*, 107 (1): 111-120, 2001
- [81] V. Viau and M. J. Meaney. Variations in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Stress during the Estrous Cycle in the Rat *Endocrinology*, 129 (5): 2503-2511, 1991
- [82] S. Diano, F. Naftolin, F. Goglia, and T. L. Horvath. Fasting-Induced Increase in Type II Iodothyronine Deiodinase Activity and Messenger Ribonucleic Acid Levels Is Not Reversed by Thyroxine in the Rat Hypothalamus *Endocrinology*, 139 (6): 2879-2884, 1998
- [83] J. D. Baxter and P. Webb. Thyroid hormone mimetics: potential applications in atherosclerosis, obesity and type 2 diabetes *Nature Reviews Drug Discovery*, 8: 308-320,

2009

[84] C. Fekete and R. M. Lechan. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: Role of neuronal afferents and type 2 deiodinase *Frontiers in Neuroendocrinology*, 28 (2-3): 97-114, 2007

[85] J. C. Buckingham, K.-D. Döhler, and C. A. Wilson. Activity of the pituitary-adrenocortical system and thyroid gland during the oestrous cycle of the rat *Journal of Endocrinology*, 78: 359-366, 1978

[86] A. D. Léan, G. Felly, and F. Labrie. Changes of Pituitary Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Receptor Level and Prolactin Response to TRH During the Rat Estrous Cycle *Endocrinology*, 100 (6): 1505-1510, 1977

[87] L. A. de Jesus, S. D. Carvalho, M. O. Ribeiro, M. Schneider, S. W. Kim, J. W. Harney, P. R. Larsen, and A. C. Bianco. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue *The Journal of Clinical Investigation*, 108 (9): 1379-1385, 2001

[88] P. Puigserver, Z. Wu, C. Won Park, R. Graves, M. Wright, B. M. Spiegelman. A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis *Cell*, 92: 829-839, 1998

[89] M. Lafontan and M. Berlan. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function *Journal of Lipid Research*, 34: 1057-1091, 1993

[90] I. Lazcano, A. Cabral, R. M. Uribe, L. Jaimes-Hoy, M. Perello, P. Joseph-Bravo, E. Sánchez-Jaramillo, J. L. Charli. Fasting Enhances Pyroglutamyl Peptidase II Activity in Tanycytes of the Mediobasal Hypothalamus of Male Adult Rats *Endocrinology*, 156 (7): 2713-2723, 2015

[91] A. Coppola, R. Meli, S. Diano. Inverse Shift in Circulating Corticosterone and Leptin Levels Elevates Hypothalamic Deiodinase Type 2 in Fasted Rats *Endocrinology*, 146 (6): 2827-2833, 2005

[92] D. L. Helmreich and D. Tylee. Thyroid hormone regulation by stress and behavioral differences in adult male rats *Hormones and Behavior*, 60 (3): 284-291, 2011

- [93] A. Baumgartner, L. Hiedra, G. Pinna, M. Eravci, H. Prengel, and H. Meinhold. Rat Brain Type II 5'-Iodothyronine Deiodinase Activity Is Extremely Sensitive to Stress *Journal of Neurochemistry*, 71 (2): 817-826, 2002
- [94] L. Jaimes-Hoy, M. Gutiérrez-Mariscal, Y. Vargas, A. Pérez-Maldonado, F. Romero, E. Sánchez-Jaramillo, J. L. Charli, and Patricia Joseph-Bravo. Neonatal Maternal Separation Alters, in a Sex-Specific Manner, the Expression of TRH, of TRH-Degrading Ectoenzyme in the Rat Hypothalamus, and the Response of the Thyroid Axis to Starvation *Endocrinology*, 157 (8): 3253-3265, 2016
- [95] E. Sánchez, R. M. Uribe, G. Corkidi, R. T. Zoeller, M. Cisneros, M. Zacarias, C. Morales-Chapa, J. L. Charli, and P. Joseph-Bravo. Differential Responses of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Neurons to Cold Exposure or Suckling Indicate Functional Heterogeneity of the TRH System in the Paraventricular Nucleus of the Rat Hypothalamus *Neuroendocrinology*, 74 (6): 407-422, 2001
- [96] G. E. Hoffman, M.S. Smith, and J. G. Verbalis. c-Fos and Related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14 (3): 173-213, 1993
- [97] E. Bullit. Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat *The Journal of Comparative Neurology*, 296 (4): 517-530, 1990
- [98] R. M. Uribe, P. Joseph-Bravo, J. Pasten, G. Ponce, M. Méndez, L. Covarrubias, and J. L. Charli. Some Events of Thyrotropin-Releasing Hormone Metabolism Are Regulated in Lactating and Cycling Rats *Neuroendocrinology*, 54 (5): 493-498, 1991
- [99] L. F. Cageao, I. R. Mignone, C. R. Ricci, C. C. Brignone, J. A. Brignone, and A. A. Zaninovich. Effects of thyroid hormones on mitochondrial oxygen consumption in brown adipose tissue and heart from cold-exposed hypothyroid rats *European Journal of Endocrinology*, 127: 72-75, 1992
- [100] Y. L. Dou and F. Tang. Effect of environmental and hypothalamic factor on thyrotropin secretion in the hypothyroid rat *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 20 (1): 65-70, 1993
- [101] K. Fukuhara, R. Kvetnansky, G. Cizza, K. Pacak, H. Ohara, D. S. Goldstein, and I. J.

Kopin. Interrelations between Sympathoadrenal System and Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical/Thyroid Systems in Rats Exposed to Cold Stress *Journal of Neuroendocrinology*, 8 (7): 533-541, 1996

[102] L. Jaimes-Hoy, P. Joseph-Bravo, and P de Gortari. 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 *Hormones and Behavior*, 53 (2): 366-377, 2008

[103] G. Cizza, L. S. Brady, M. Esclapes, M. R. Blackman, P. W. Gold, and G. P. Chrousos. Age and Gender Influence Basal and Stress-Modulated Hypothalamic-Pituitary-Thyroidal Function in Fischer 344/N Rats *Neuroendocrinology*, 64 (6): 440-448, 1996

[104] M. P. Marassi, R. S. Fortunato, A. C. Matos da Silva, V. S. Pereira, D. P. Carvalho, D. Rosenthal, and V. M. Corrêa da Costa. Sexual dimorphism in thyroid function and type 1 iodothyronine deiodinase activity in pre-pubertal and adult rats *Journal of Endocrinology*, 192: 121-130, 2007

[105] P. J. Scarpace, M. Matheny, and N. Tümer. Differential down-regulation of  $\beta$ 3-adrenergic receptor mRNA and signal transduction by cold exposure in brown adipose tissue of young and senescent rats *European Journal of Physiology*, 437 (3): 479-483, 1999

[106] B. L. Marrone, R. T. Gentry, and G. N. Wade. Gonadal hormones and body temperature in rats: Effects of estrous cycles, castration and steroid replacement *Physiology & Behavior*, 17 (3): 419-425, 1976

[107] D. Seffer\*, H. Rippberger, R. K. W. Schwarting, and M. Wöhr. Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments—phenotypic rescue by re-socialization *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9:102, 2015

[108] R. Pascual, S. P. Zamora-León, and A. Valero-Cabré. Effects of postweaning social isolation and re-socialization on the expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) and dendritic development in the medial prefrontal cortex of the rat *Europe PMC*, 66 (1): 7-14, 2006

[109] F.A. Soliman and E. P. Reineke Changes in uptake of radioactive iodine by thyroid of

the rat during the estrous cycle *American Journal of Physiology*, 178: 88-90, 1954

[109] R. Cruz, M. A. Vargas, R. M. Uribe, I. Pascual, I. Lazcano, A. Yiotakis, M. Matziari, P. Joseph-Bravo, and J. L. Charli. Anterior pituitary pyroglutamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release *Peptides*, 29 (11): 1953-1964, 2008

[110] J. L. Charli, M. A. Vargas, M. Cisneros, P. de Gortari, M. A. Baeza, P. Jasso, J. Bourdais, L. Perez, R. M. Uribe, and P. Joseph-Bravo. TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II *Europe PMC*, 6 (1): 45-57, 1998

[111] S. J. Blakemore. The social brain in adolescence *Nature Reviews Neuroscience*, 9 (4): 267-277, 2008

[112] P. Palanza, L. Gioiosa, and S. Parmigiani. Social stress in mice: Gender differences and effects of estrous cycle and social dominance *Physiology and Behavior*, 73 (3): 411-420, 2001

[113] H. Heuer, M. K.-H. Schäfer, and K. Bauer. The Thyrotropin-Releasing Hormone-Degrading Ectoenzyme: The Third Element of the Thyrotropin-Releasing Hormone-Signaling System *Thyroid*, 8 (10), 1998