



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**El estrés durante la adolescencia modifica la respuesta del eje tiroideo al ejercicio**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Angélica Gutiérrez Mata

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Limei Zhang Ji  
Facultad de Medicina UNAM

Dr. Ignacio Camacho Arroyo  
Facultad de Química, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Octubre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# JURADO

## PRESIDENTE:

Yvonne Jane Rosenstein Azoulay, Instituto de Biotecnología, UNAM

## SECRETARIO:

Denhi Schnabel Peraza, Instituto de Biotecnología, UNAM

## VOCAL:

Enrique Alejandro Reynaud Garza, Instituto de Biotecnología, UNAM

## VOCAL:

María Teresa Morales Guzmán, Instituto de Neurobiología, UNAM

## VOCAL:

Gina Lorena Quirarte, Instituto de Neurobiología, UNAM

Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y estuvo dirigido por la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo. El proyecto fue financiado con los donativos de DGAPA IN213419 y CONACyT 284883. Para la realización de esta tesis conté con la beca de Maestría de CONACyT (764239) y la Beca de Maestría/Obtención de grado del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT (Proyecto IN213419). Se agradece al “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) por el apoyo otorgado para la asistencia a dos congresos.

## Agradecimientos

A la Dra. Patricia Joseph por darme la oportunidad y la confianza de estar en su laboratorio, por apoyarme y preocuparse por mí en todos los aspectos, por siempre darme el tiempo de contarme alguna anécdota, resolver mis dudas y alentarme a continuar en la carrera científica.

A los miembros de mi comité tutorial: la Dra. Limei Zhang y el Dr. Ignacio Camacho, gracias por los comentarios y correcciones hechos a este proyecto.

Al Dr. Jean-Louis Charli, por sus siempre acertadas preguntas y retroalimentación durante los seminarios, a la Dra. Rosa Uribe por su ayuda durante el sacrificio y por sus observaciones hacia mi proyecto, a la Dra. Antonieta Cote por su orientación y ayuda en el laboratorio.

A la Dra. Lorraine Jaimes, por su valioso apoyo para la estandarización de la técnica de la qPCR, por su apoyo durante en el sacrificio de los animales y siempre atender mis consultas.

A la Quim. Fidelia Romero Arteaga, técnico académico del laboratorio, por su asistencia en las técnicas de biología molecular y su ayuda en el procesamiento de las muestras de tejido adiposo pardo con la extracción de ARN y la RT-PCR.

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

Al técnico Manuel Villa, por su apoyo en el cuidado de las ratas y por su valiosa ayuda durante el sacrificio de los animales y junto a Sandra Verónica Serrano mantienen en orden el funcionamiento del laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio Marco, Andrea, Jonathan, Marlen, Yuvi, Maritere, Ana, que siempre estaban dispuestos apoyarme durante las jornadas de sacrificios y junto con Kari, Yami, Gaby, Karen y Adair se forma un gran ambiente de trabajo en el laboratorio. Gracias especiales a Yamili Vargas por su apoyo durante el corte de los cerebros en el criostato.

A la estudiante de Lic. Mariel Castañeda, quien realizó una estancia en el laboratorio como parte de la materia de “Laboratorio de Biología Celular” bajo la dirección de la Dra. Joseph y supervisión mía y realizó la identificación de las células de los frotis vaginales.

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

A la Unidad de Biblioteca, en especial al LI Omar Arriaga por resolver eficaz y amablemente los contratiempos presentados con los equipos audiovisuales durante mis evaluaciones tutorales y seminarios.

## Dedicatoria

*A Oscar, no puedo expresar lo agradecida que estoy con la vida por compartir este camino juntos, por apoyarme sin condiciones y ser tan comprensivo en este proceso de “La tesis”, por siempre creer en mí, por cuidarme y estar dispuesto a ir de la mano a dónde sea necesario.*

*A mi mamá, Natalia, por creer y estar orgullosa de mí y por entender que ya vendrán después los nietos. A mi papá, Adolfo, gracias por darme la vida y apoyarme cuando decidí seguir en el camino de la ciencia. Les agradezco profundamente a los dos el esfuerzo y los sacrificios que hicieron por nosotros, estoy segura de que no fue en vano.*

*A mi hermanita Gaby y a Sergio, por siempre darme su apoyo, aunque sea ahora en la distancia. Ustedes son un ejemplo de que es posible lograr lo que uno se propone.*

*A mi hermano Migui, a Marce y a mi sobrina Cami, gracias por siempre abrirme las puertas de su hogar y por traer al mundo a la nueva alegría de la familia.*

*A mi nueva familia, Rosy, Lalo y Omar, gracias por adoptarme como parte de su familia y apoyarnos a Oscar y a mí incondicionalmente.*

## Contenido

Lista de abreviaciones .....	9
Índice de figuras .....	12
Índice de tablas .....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
1. Introducción.....	16
1.1 La respuesta al estrés.....	16
1.2 Biosíntesis de la hormona liberadora de tirotrópina.....	19
1.3 El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides .....	21
1.4 Efecto de las hormonas tiroideas en el metabolismo .....	23
1.5 Diferencias sexuales en la respuesta al estrés y el metabolismo .....	25
1.6 Neurobiología de la pubertad y la adolescencia .....	26
1.7 El aislamiento social como modelo de estrés crónico .....	27
2. Antecedentes .....	29
2.1 Efecto del estrés agudo en el eje tiroideo .....	29
2.2 Efecto del estrés crónico en el adulto en la respuesta del eje tiroideo a demandas energéticas .....	30
2.2.1 Demanda energética: una hora de frío .....	30
2.2.2 Demanda energética: ejercicio voluntario .....	31
3. Justificación.....	33
4. Objetivos .....	34
General.....	34
Específicos .....	34
5. Métodos .....	35
5.1 Animales.....	35
5.2 Paradigma de estrés .....	35

5.3 Prueba de hedonismo .....	38
5.4 Prueba de campo abierto.....	38
5.5 Reto metabólico .....	39
5.6 Ejercicio voluntario.....	40
5.7 Eutanasia y extracción de tejidos.....	41
5.8 Disecciones de cerebros.....	41
5.9 Radioinmunoensayos.....	41
5.9.1 Radioinmunoensayo de corticosterona.....	42
5.9.2 Radioinmunoensayo de tirotropina .....	43
5.10 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).....	43
5.11 Extracción de ARN.....	44
5.11.1 Extracción de ARN de NPV .....	44
5.11.2 Extracción de ARN de Tejido adiposo pardo y blanco .....	45
5.12 Análisis de la expresión genética .....	45
5.12.1 Retro transcripción .....	45
5.12.2 PCR de punto final .....	45
5.12.3 PCR cuantitativa.....	46
5.12.3.1 Estandarización de los oligonucleótidos y elección del control interno.....	46
5.13 Análisis estadístico .....	47
6. Resultados .....	48
6.1 Efecto del aislamiento social durante la adolescencia.....	48
6.1.1 Ganancia de peso y el consumo de alimento .....	48
6.1.2 Efecto del aislamiento en los niveles de corticosterona y en la prueba de hedonismo .....	48
6.1.3 Efecto del aislamiento en la prueba de campo abierto (OFT) .....	49

6.2 Efecto del aislamiento social y el estrés intermitente en la respuesta del eje tiroideo al frío. ....	50
6.2.1 Respuesta en el tejido adiposo pardo y en el tejido adiposo blanco .....	53
6.3 Efecto del aislamiento social en la adolescencia en la respuesta del eje tiroideo al ejercicio voluntario .....	54
6.3.1 Consumo de alimento, ganancia de peso y ejercicio realizado.....	54
6.3.2 Efecto del aislamiento y del ejercicio en el peso de los tejidos .....	54
6.3.3 Efecto del aislamiento y el ejercicio en la actividad del eje adrenal .....	56
6.3.4 Efecto del aislamiento social y el ejercicio en la actividad del eje tiroideo.....	57
6.3.5 Efecto del aislamiento y el ejercicio en la expresión genética en el tejido adiposo pardo y blanco.....	58
7. Discusión.....	60
Respuesta al frío agudo. ....	60
Respuesta al ejercicio voluntario. ....	62
8. Conclusiones.....	65
9. Perspectivas.....	66
10. Bibliografía.....	67
Anexo 1 Secuencias, condiciones y estandarización de los oligonucleótidos .....	76
Anexo 2 Elección del estándar interno para la qPCR.....	79
Anexo 3 Fase del ciclo estral al momento de la eutanasia .....	80
Anexo 4 Artículo publicado .....	80

## Lista de abreviaciones

<b>18s</b>	Subunidad ribosomal 18s
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropina
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>Adrb3</b>	Receptor adrenérgico beta 3
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATGL</b>	Lipasa adipocítica de triglicéridos
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>C</b>	Grupo Control
<b>C-5°</b>	Control a 5°
<b>C-EV</b>	Control ejercitado
<b>C-TA</b>	Control a temperatura ambiente
<b>C-SED</b>	Control sedentario
<b>CORT</b>	Corticosterona
<b>cPKA</b>	Subunidad catalítica de la proteína cinasa A
<b>CREB</b>	Elemento de unión en respuesta a AMPc
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotropina
<b>CVS</b>	Estrés crónico variable
<b>CycA</b>	Ciclofilina A
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>Dio1</b>	Desyodasa 1
<b>Dio2</b>	Desyodasa 2
<b>Dio3</b>	Desyodasa 3
<b>DPN</b>	Día posnatal
<b>ELISA</b>	Inmunoensayo ligado a enzimas
<b>EPM</b>	Laberinto en cruz elevado
<b>FFA</b>	Ácidos grasos libres
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>Gapdh</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropina
<b>GR</b>	Receptor de glucocorticoides
<b>HKG</b>	Gen housekeeping
<b>HPA</b>	Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal
<b>Hprt1</b>	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
<b>HPT</b>	Eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides

<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormonas
<b>HT</b>	Hormonas tiroideas
<b>ISO</b>	Aislamiento social
<b>ISO-EV</b>	Aislado ejercitado
<b>ISO-TA</b>	Aislado a temperatura ambiente
<b>ISO-SED</b>	Aislado sedentario
<b>ISO-5°</b>	Aislado a 5°
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>MCT8</b>	Transportador de monocarboxilato 8
<b>MCT10</b>	Transportador de monocarboxilato 10
<b>MR</b>	Receptor de mineralocorticoides
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>NPV</b>	Núcleo paraventricular del hipotálamo
<b>OFT</b>	Prueba de campo abierto
<b>PAM</b>	Enzima monooxigenasa alfa-amidante de peptidilglicina
<b>pCREB</b>	Elemento de respuesta a cAMP fosforilado
<b>Pgc1<math>\alpha</math></b>	Proteína coactivadora 1 $\alpha$ del receptor activado por el proliferador de peroxisomas
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKAc</b>	Subunidad catalítica de la proteína cinasa A
<b>Ppary</b>	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas
<b>PPII</b>	Piroglutamil peptidasa II
<b>Prepro-TRH</b>	Precursor de la hormona liberadora de tirotrópina
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<b>RES</b>	Restricción de movimiento
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
<b>Rplp0</b>	Proteína ribosómica ácida 60S P0
<b>SAM</b>	Eje simpático-adrenal-medular
<b>SNS</b>	Sistema nervioso simpático
<b>T3</b>	3,3',5-triyodotironina
<b>T4</b>	3,3',5,5'-tetrayodotironina
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAB</b>	Tejido adiposo blanco
<b>TAP</b>	Tejido adiposo pardo
<b>THRa</b>	Receptor alfa de hormonas tiroideas
<b>THRb</b>	Receptor beta de hormonas tiroideas
<b>TRE</b>	Elemento de respuesta a hormonas tiroideas

<b>TRH</b>	Hormona liberadora de tirotropina
<b>TRHDE</b>	Enzima que degrada a la hormona liberadora de tirotropina
<b>TRH-R1</b>	Receptor 1 de la hormona liberadora de tirotropina
<b>TSH</b>	Tirotropina
<b>TSHR</b>	Receptor de tirotropina
<b>UCP1</b>	Proteína desacopladora 1
<b>WR</b>	Wheel running

## Índice de figuras

Figura 1	Organización del sistema del estrés	18
Figura 2	Biosíntesis del TRH	20
Figura 3	Eje hipotálamo-pituitaria-tiroides	22
Figura 4	Mecanismo de la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo pardo	24
Figura 5	Línea del tiempo del protocolo experimental	37
Figura 6	Fotografías de la prueba de hedonismo	38
Figura 7	Rata durante la prueba de campo abierto	39
Figura 8	Ratas durante la fase de ejercicio voluntario	40
Figura 9	Efecto del aislamiento social en el consumo y la ganancia de peso	48
Figura 10	Efecto del aislamiento social en los niveles de corticosterona y en la prueba de hedonismo	49
Figura 11	Efecto del aislamiento en la respuesta a una hora de frío	52
Figura 12	Efecto del aislamiento y el frío en la expresión genética en el TAP y TAB	53
Figura 13	Efecto del aislamiento en el consumo, la ganancia de peso, la cantidad de ejercicio y el peso de los tejidos	55
Figura 14	Efecto del aislamiento y el ejercicio en la actividad del eje adrenal	56
Figura 15	Efecto del aislamiento y el ejercicio en la actividad del eje tiroideo	57
Figura 16	Efecto del aislamiento y el ejercicio en la expresión genética en el TAP y TAB	58
Figura 17	Esquema de resumen de los cambios observados en el eje HPT, HPA y órganos periféricos	59
Figura 18	Geles de agarosa de la estandarización de la Tm en distintos oligonucleótidos	77

## Índice de tablas

Tabla 1	Parámetros medidos en la prueba de campo abierto	50
Tabla 2	Condiciones usadas en la RT-PCR	76
Tabla 3	Resultados del software Bestkeeper para la elección del control interno de la qPCR	79
Tabla 4	Fases del ciclo estral al momento de la eutanasia	80

## Resumen

La adolescencia es un periodo crítico en el desarrollo del organismo, comprende la etapa de la pubertad que es cuando aparecen los cambios hormonales y la maduración de los órganos sexuales (en la rata hembra abarca del día posnatal [DPN] 28 al 41) además del tiempo adicional que requiere la formación de circuitos cerebrales entre áreas límbicas y la maduración del eje adrenal (hasta el DPN 60). El estrés durante periodos juveniles puede tener efectos conductuales y fisiológicos permanentes; el aislamiento social es particularmente nocivo ya que durante este periodo se desarrollan las conductas sociales. El estrés agudo o crónico inhibe la actividad del eje tiroideo que es fundamental en la homeostasis energética. Además de inhibir la actividad basal del eje, el estrés inhibe la respuesta a demandas energéticas como la provocada por la estimulación al frío o al ejercicio en ratas adultas. Debido a que las hembras son más susceptibles al efecto nocivo del estrés durante la adolescencia estudiamos el efecto a largo plazo, del aislamiento social (ISO) en ratas Wistar hembras sometidas durante la etapa adulta a estresores intermitentes y posteriormente a frío o a ejercicio. Encontramos que el aislamiento en la adolescencia provocó una disfunción en el eje adrenal, que se refleja en niveles basales más altos de corticosterona después de 30 días de aislamiento cuando las ratas ya son adultas, además presentan un estado de anhedonia, característico de la depresión. El aislamiento social también provocó alteraciones metabólicas que se reflejan en una mayor acumulación de tejido adiposo blanco, así como una incapacidad de regular la temperatura corporal y menor actividad física en la rueda de ejercicio. Respecto al eje tiroideo y la respuesta en órganos blanco de las hormonas tiroideas, el aislamiento aumentó los niveles basales de TSH sin alterar a las hormonas tiroideas, lo que sugiere una condición de hipotiroidismo subclínico. Tanto el tejido adiposo pardo como el tejido adiposo blanco tuvieron una menor expresión de los genes que se inducen durante la termogénesis adaptativa asociada con el ejercicio. Estos resultados demuestran que el estrés crónico en una etapa vulnerable del desarrollo como es la adolescencia ocasiona alteraciones que perduran hasta la edad adulta en las ratas hembra.

## **Abstract**

Adolescence is a critical period in the development of the organism as connections between limbic regions associated with stress continue to mature. Stress during youth periods can have permanent behavioral and physiological effects; social isolation is particularly harmful since during this period social behaviors develop. Acute or chronic stress inhibits the response of thyroid axis to energy demands such as cold exposure or exercise in adult rats. Because females are more susceptible to the harmful effect of stress during adolescence, we studied the long-term effect of social isolation (ISO) in female Wistar rats subjected to intermittent stressors during adulthood and subsequently to cold or exercise. We found that isolation in adolescence caused higher baseline levels of corticosterone after 30 days of isolation, in addition to a state of anhedonia, characteristic of depression. Social isolation also caused metabolic disturbances with increased accumulation of white adipose tissue, an inability to regulate body temperature, and reduced physical activity on the running wheel. Isolation affected thyroid axis and response of target organs to four weeks of voluntary exercise; increased basal levels of TSH without altering thyroid hormones, suggesting a condition of subclinical hypothyroidism. Isolation inhibited the expected exercise-induced increase in T3, loss of adipose tissue, increased expression of deiodinase 2, adrenergic receptor  $\alpha_1$  and  $\beta_1$  in either brown or white adipose tissue detected in controls. These results support that chronic stress at a vulnerable stage of development, such as adolescence, causes neuroendocrine and metabolic alterations that last until adulthood in female rats.

# 1. Introducción

La respuesta al estrés en el organismo es un mecanismo evolutivo de gran valor adaptativo. Sin embargo, cuando la exposición al estrés es prolongada e incontrolable, la respuesta puede ser inadecuada y desadaptativa, causando trastornos físicos y mentales tales como la depresión y trastornos de ansiedad, así como a alteraciones neuroendocrinas y metabólicas<sup>1,2</sup>.

## 1.1 La respuesta al estrés

La supervivencia del individuo depende de la habilidad de adaptarse a situaciones que le resultan amenazantes que pueden ser reales o percibidas<sup>3</sup>. El organismo está preparado para contener con estas amenazas activando sistemas que, una vez que las amenazas desaparecen, le permiten regresar a la homeostasis. Al estado de amenaza de la homeostasis o del bienestar se le ha definido como estrés<sup>4</sup> y al estímulo que desencadena la respuesta al estrés se le llama estresor. Los estresores que representan una amenaza directa a la supervivencia, son los estresores físicos como hemorragia, hipoxia, infección; mientras que los estresores psicológicos representan una amenaza potencial que desencadena una respuesta orientada a escapar de la situación<sup>5</sup>.

La respuesta hormonal ante una situación de estrés inicia con la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). Sin embargo, además del eje HPA, muchos sistemas endógenos reaccionan ante el estrés. Entre ellos se encuentra el sistema nervioso autónomo que estimula al eje simpático-adrenal-medular (SAM) que induce una respuesta generalizada que optimiza la supervivencia ante el estresor aumentando el ritmo cardiaco, la presión sanguínea y la producción de glucosa hepática<sup>3</sup>. Las respuestas provocadas por estímulos psicológicos recaen en una o más estructuras del sistema límbico (corteza prefrontal, amígdala e hipocampo) conectadas con el núcleo paraventricular (NPV) a través de núcleos de relevo que trabajan de manera paralela al influenciar la actividad del eje HPA, lo que resulta en una respuesta anticipada ante la posible amenaza<sup>6</sup>.

La reacción fisiológica al estrés físico y/o psicológico activa al sistema nervioso simpático (SNS) y al eje HPA. La activación del eje HPA inicia en neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo al inducir la síntesis de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) -en el

NPV se encuentran neuronas que sintetizan varios péptidos de importancia neuroendócrina como CRH, vasopresina, TRH, oxitocina y somatostatina- y simultáneamente induce la liberación del péptido de las terminales en la eminencia media cerca de los vasos portales por donde viaja a la pituitaria anterior y estimula la síntesis y secreción de la adrenocorticotropina (ACTH) de los corticotropos (Figura 1A). La ACTH circulante actúa en la zona fascicular de la corteza adrenal donde estimula la liberación de glucocorticoides: cortisol en el caso de humanos y corticosterona (CORT) en el caso de roedores. Los glucocorticoides son hormonas esteroideas y pueden atravesar la membrana citoplasmática debido a sus propiedades liposolubles, una vez dentro de la célula se unen a receptores específicos en el citoplasma<sup>7</sup>. Existen dos tipos de receptores de glucocorticoides: el receptor de mineralocorticoides (MR) y el receptor de glucocorticoides (GR), ambos son factores transcripcionales y cuando los glucocorticoides se unen a su receptor pueden entrar al núcleo y regular la expresión de muchos genes<sup>8</sup>. El receptor MR tiene una mayor afinidad a los glucocorticoides que el GR y regula los ritmos circadianos y ultradianos basales. El receptor GR, al tener una menor afinidad por los glucocorticoides, requiere niveles mayores de glucocorticoides, como los que se liberan después del estrés, para activarse<sup>9</sup>.

Los glucocorticoides son las hormonas al final de la activación del eje adrenal y son los responsables de la retroalimentación negativa ya que inhibe la síntesis y secreción de CRH y ACTH limitando la duración de su exposición y apagando el eje<sup>10</sup> (Figura 1B). Los glucocorticoides junto con las catecolaminas actúan en muchos tejidos induciendo efectos catabólicos tales como el incremento de la lipólisis y la liberación de ácidos grasos en el tejido adiposo blanco y además estimulan la glucogenólisis y la gluconeogénesis hepática aumentando las concentraciones de glucosa circulante y la acumulación de glucógeno<sup>11</sup>.

La activación del SNS estimula la liberación de epinefrina de la médula adrenal y norepinefrina de las terminaciones nerviosas simpáticas (Figura 1B). Estas catecolaminas estimulan los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos expresados en órganos periféricos donde coordinan actividades enzimáticas como la lipólisis o la glicólisis, así como, las respuestas cardiovasculares acelerando el gasto cardíaco y la respiración o redirigiendo el flujo sanguíneo para estimular el cerebro y preparar los músculos y el corazón para una respuesta de "lucha o huida"<sup>11</sup>.

Esta reacción fisiológica ante el estrés tiene el objetivo de movilizar las reservas energéticas y poder responder rápidamente ante la situación amenazante pero el estar crónicamente estresado y con una respuesta al estrés sostenida se vuelve dañino para el individuo y lo predispone a enfermedades metabólicas, cardiovasculares y mentales<sup>11</sup>. El daño causado por el estrés crónico depende del tipo de estrés, la intensidad y la duración. Cuando es el mismo tipo de estrés (homotípico) hay una habituación; en cambio, cuando el estrés es variable e inesperado (heterotípico) ocurre una sensibilización que causa hiperactividad del eje HPA y en ocasiones, hipoactividad<sup>12</sup>.

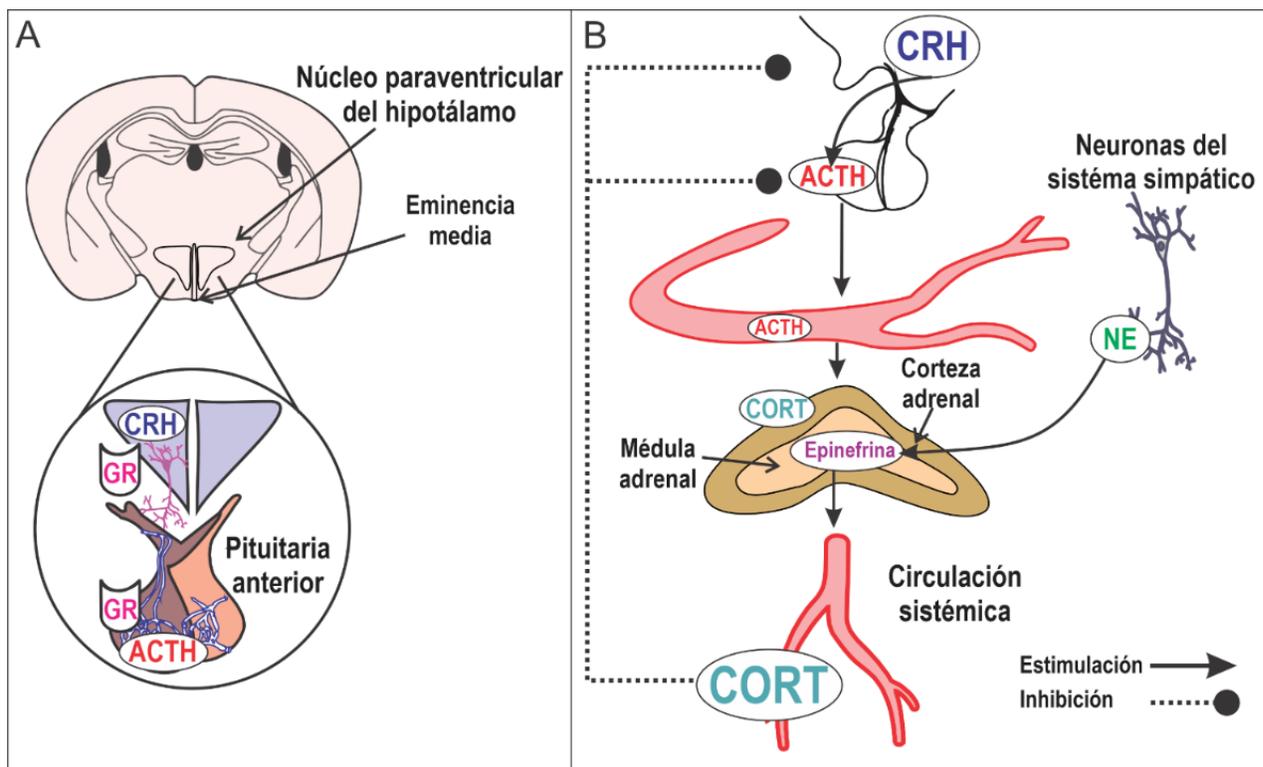


Figura 1. **Organización del sistema del estrés.** La respuesta al estrés inicia en neuronas del NPV que se encargan de sintetizar CRH: este se libera hacia el sistema portal-hipofisiario donde llega a la eminencia media y posteriormente es liberado en la glándula pituitaria anterior y estimula en los corticotropos que se libere la ACTH hacia la circulación sistémica a través de la cual llega a la glándula adrenal, específicamente a la corteza adrenal, donde promueve la síntesis y liberación de glucocorticoides ( cortisol en humano, corticosterona en roedores). Los glucocorticoides son liberados a la circulación sistémica donde llegan a órganos blancos (tejido adiposo, hígado, cerebro) y movilizan las reservas energéticas para contender contra el estresor, además, ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre la pituitaria y el NPV, donde se unen al GR, suprimiendo la respuesta del eje. El SNS estimula la liberación de norepinefrina de las terminales nerviosas simpáticas y epinefrina de la médula adrenal preparando al organismo para una respuesta de “lucha o huida”. Es importante aclarar que el esquema presenta la respuesta al estrés en roedores, donde se ha estudiado ampliamente. Sin embargo, la organización del eje HPA está altamente conservada en mamíferos, incluyendo al humano.

(ACTH, adrenocorticotropina; CORT, corticosterona; CRH, hormona liberadora de corticotropina; GR, receptor de glucocorticoides; NE, norepinefrina; NPV, núcleo paraventricular del hipotálamo; SNS, sistema nervioso simpático)

Basado y modificado de Myers, B., et al, 2012.

## 1.2 Biosíntesis de la hormona liberadora de tirotropina

En respuesta a un estímulo ambiental, como el estatus nutricional, la temperatura, el ejercicio o un estímulo hormonal como la leptina (una hormona producida por los adipocitos, que produce un efecto anorexigénico al reducir el apetito cuando se libera a la circulación) las vías hipotalámicas modulan la actividad simpática y la del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides<sup>13</sup>. En las neuronas hipofisiotrópicas de la región parvocelular del NVP se sintetiza la proteína precursora de la hormona liberadora de tirotropina (TRH): el precursor prepro-TRH<sup>14</sup> (Figura 2). El promotor de TRH contiene múltiples elementos regulatorios que reclutan diferentes factores de transcripción dependiendo del estímulo, entre ellos se encuentra el elemento de unión en respuesta a AMPc (CREB), el elemento de respuesta a glucocorticoides, a STAT3, cJun y cFos<sup>15</sup>. El transcrito primario es sintetizado en el núcleo como prepro-TRH, un ARN heterogéneo nuclear que contiene tres exones y dos intrones tanto en murinos como en humanos, pero en diferentes cromosomas<sup>16</sup>. El ARN mensajero del prepro-TRH es sintetizado en el retículo endoplásmico rugoso y después es cortado para formar el pro-TRH en el retículo endoplásmico. En el Golgi, el pro-TRH es procesado por las proteasas convertasas PC 1/3 y posteriormente es compartimentalizado en gránulos de secreción que durante el viaje por el axón, las convertasas cortan en los residuos básicos Lys-Arg, y estos son removidos por las carboxipeptidasas E y D<sup>15</sup>. Finalmente, en la secuencia Gln-his-pro-gly-NH<sub>2</sub> la enzima monooxigenasa alfa-amidante de peptidilglicina (PAM) y una piroglutaminasa modifican los extremos amino y carboxilo respectivamente para formar el péptido activo, TRH -(L-piroglutamil-L-histidil-L-prolilamida)<sup>16</sup>.

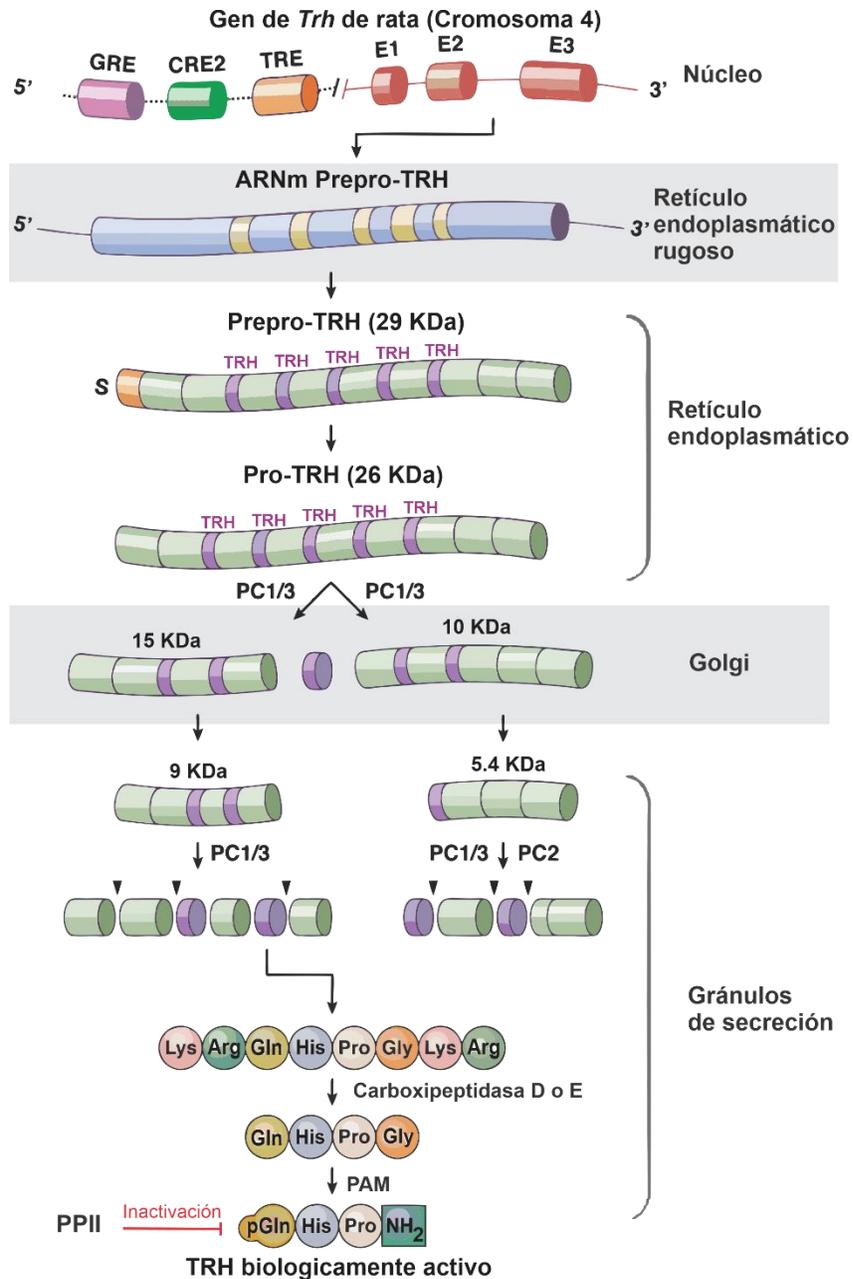


Figura 2. **Biosíntesis del TRH.** El gen de *Trh* de rata se encuentra en el cromosoma cuatro, contiene tres exones, representados con las letras E1-3 y se presenta al inicio del esquema junto con tres elementos regulatorios en la región del promotor. El ARNm del prepro-TRH es sintetizado en el RER y después es cortado para formar el pro-TRH, este es procesado por las PC 1/3 en el Golgi formando intermediarios más pequeños que son procesados en gránulos de secreción donde la Lys y Arg son cortadas por las PC y removidas por las carboxipeptidasas E y D. Una piroglutaminasa convierte la glutamina en piroglutamina, mientras que la glicina es convertida a amida por la enzima PAM dando lugar al TRH biológicamente activo. El TRH es inactivado y degradado por la ectoenzima piroglutamil peptidasa II.

(*GRE*: Elemento de respuesta a glucocorticoides; *CRE2*: Elemento de respuesta a AMPc; *TRE*: Elemento de respuesta a hormonas tiroideas; *PC 1/3*: Proteínas convertasas 1/3; *PAM*: Enzima monooxigenasa alfa-amidante de peptidilglicina; *PPII*, Piroglutamil peptidasa 2)

Modificado de Ortiga-Carvalho, T., 2016.

### 1.3 El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides

El estrés crónico altera otros ejes neuroendocrinos, entre ellos el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT). Este eje es uno de los principales reguladores de la homeostasis energética, además de que, por medio de las hormonas tiroideas, juega un papel importante en el desarrollo, el crecimiento y el metabolismo<sup>17</sup> siendo necesario para el funcionamiento adecuado de la mayoría de los tejidos, con importantes efectos sobre el consumo de oxígeno y la tasa metabólica<sup>18</sup>.

Similar a las neuronas CRHérgicas, los axones de las neuronas TRHérgicas se proyectan hacia la eminencia media dónde el TRH es liberado cercano a las venas portales del sistema hipotálamo-pituitaria y a los tanicitos presentes en la pared del 3er ventrículo donde encuentra la ectoenzima piroglutamil peptidasa II que degrada al TRH (PPII o TRHDE). La cantidad de TRH liberado que llega a la pituitaria y que controla la liberación de la hormona liberadora de tirotrópina (TSH)<sup>19</sup> depende por lo tanto de la cantidad de TRH que no fue degradada por la PPII. El TRH se une a su receptor (TRH-R1) en los tirótrofos de la pituitaria, activa la síntesis y la liberación de la TSH (Figura 3A). La TSH es liberada de la pituitaria hacia la circulación sistémica y llega hasta las células foliculares de la glándula tiroides en dónde se une a su receptor (TSHR), estimulando la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (HT)<sup>20</sup>. La tiroxina (T4, 3,3',5,5'-tetrayodotironina) es una prohormona y el producto principal de la glándula tiroides, mientras que la triyodotironina (T3, 3,3',5-triyodotironina) se secreta en menor cantidad y es la hormona activa que se deriva de la T4. La T3 y T4 liberadas generan un efecto de retroalimentación negativa e inhiben la producción de TRH en el hipotálamo y de TSH en la glándula pituitaria a través los receptores de hormonas nucleares (THRa y THRb), regulando así la expresión genética (Figura 3B)<sup>21</sup>.

Las HT entran a las células a través de proteínas transportadoras, siendo el principal transportador el de monocarboxilato 8 (MCT8)<sup>13</sup>. La T4 y demás HT se metabolizan por las desyodasas, enzimas que remueven el yodo del anillo interno como la Dio1 y Dio2, convirtiendo T4 a la forma activa T3; Dio1 tiene además capacidad de desyodar el anillo externo convirtiendo T4 en T3-reversa, o T3-reversa en T2. Dio2 es responsable de convertir T4 a T3 en varios tejidos y su actividad es regulable por el sistema simpático. La desyodasa Dio3 se expresa durante el desarrollo embrionario y en tipos celulares específicos; es la

responsable de inactivar a T4 a T3 reversa y T3 a T2 que pueden unirse a receptores de HT y bloquear la acción de T3<sup>19,22,23</sup>.

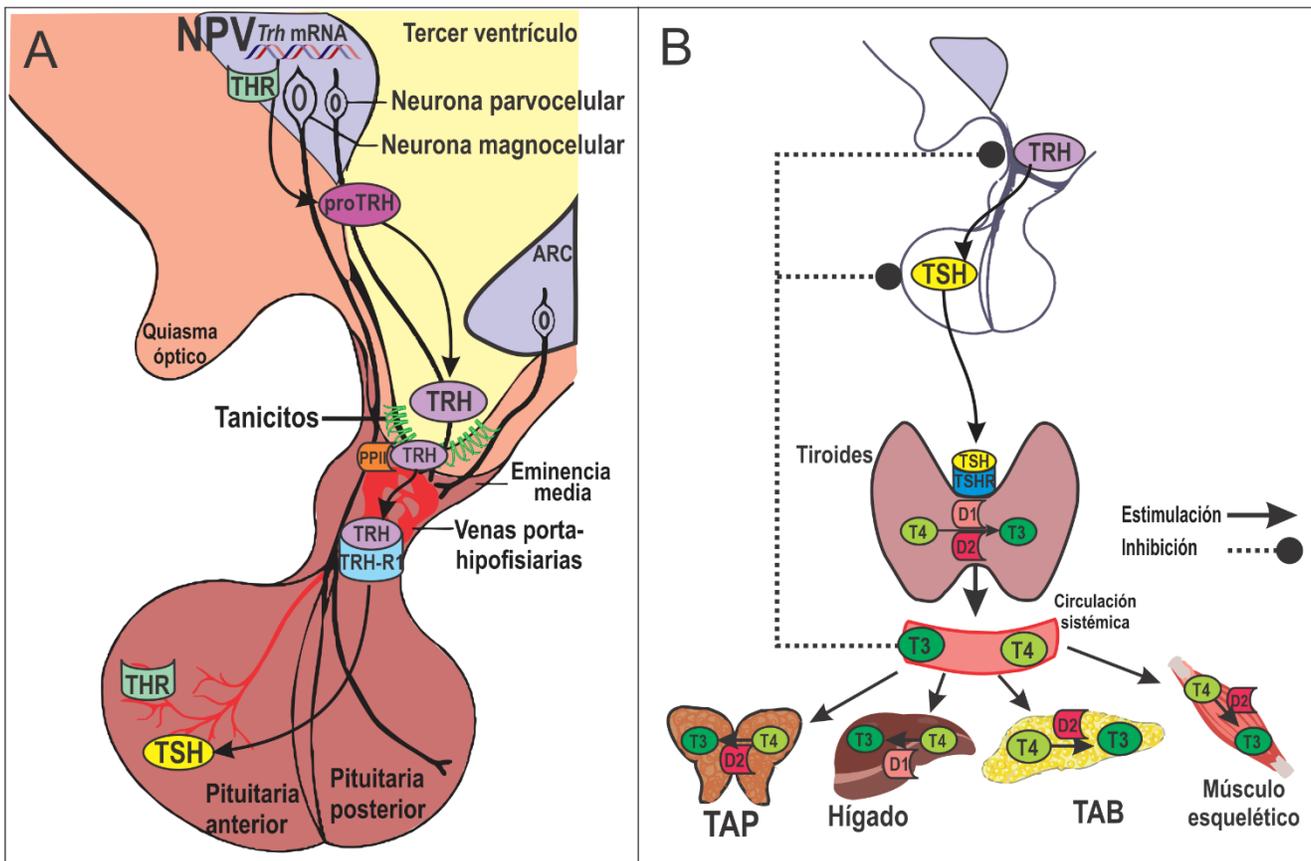


Figura 3. **Eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides.** En las neuronas hipofisiotróficas del NPV se sintetiza el TRH. Los axones de estas neuronas se proyectan hacia la eminencia media dónde el TRH es liberado hacia las venas portales del sistema hipotálamo-pituitaria y controla la liberación de la TSH en la pituitaria anterior, posteriormente esta es liberada hacia la circulación sistémica y llega hasta la glándula tiroides, en dónde estimula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas T3 y T4. Las hormonas tiroideas tienen múltiples órganos blanco, entre los que se destacan algunos involucrados en el metabolismo energético como el tejido adiposo blanco y pardo, el músculo esquelético y el hígado.  
 (ARC, Núcleo arqueado; D1, Desyodasa 1; D2, desyodasa 2; NPV, núcleo paraventricular; PPII, Piroglutamil peptidasa 2; pro-TRH, prohormona de la hormona liberadora de tiotropina; T3, triyodotironina; T4, Tiroxina; THR, Receptor de hormonas tiroideas; TRH, hormona liberadora de tiotropina; TRH-R1, Receptor 1 de TRH; TSH, tiotropina; TSHR, Receptor de tiotropina; TAB; tejido adiposo blanco; TAP, tejido adiposo pardo)  
 Basado y modificado de Clasadonte, J., & Prevot, V., 2018 y de Joseph-Bravo, P., et al, 2017.

## 1.4 Efecto de las hormonas tiroideas en el metabolismo

Las hormonas tiroideas (T4 y T3) son responsables del metabolismo basal, la termogénesis, el gasto energético<sup>24</sup> y del flujo de metabolitos energéticos a tejidos activos. Regulan múltiples enzimas que participan en síntesis y degradación de lípidos, carbohidratos y proteínas en órganos como cerebro, tejido adiposo blanco y pardo, músculo esquelético, hígado y páncreas<sup>25</sup>.

En el tejido adiposo blanco estimulan la lipólisis y la lipogénesis. La T3 estimula la transcripción del receptor a norepinefrina y de enzimas involucradas en lipólisis y en la reducción de la grasa corporal. Sin embargo, aunque las HT también promueven la lipogénesis, cuando los niveles de HT son elevados el efecto neto es la pérdida de grasa<sup>26</sup>. En el hígado, las HT regulan la homeostasis de lípidos por acciones directas de la T3 e indirectas a través de receptores nucleares activados por nutrientes<sup>25</sup>.

Las HT facilitan la termogénesis adaptativa, mecanismo que permite a las especies homeotérmicas mantener constante su temperatura corporal, independientemente de la temperatura ambiental. En roedores el sitio primario de la termogénesis es el tejido adiposo pardo, un tejido especializado que produce calor al desacoplar la cadena transportadora de electrones en la mitocondria por medio de la proteína Ucp1<sup>27</sup>. Las HT, como el SNS, estimulan la termogénesis<sup>28</sup>. La activación del SNS es mediada por la norepinefrina (NE) a través del receptor adrenérgico  $\beta 3$  (Adrb3) estimula a la adenilato ciclasa, incrementa AMPc y activa la PKA que fosforila la Dio2 activándola y se incrementa la formación intracelular de T3. A su vez, la PKAc fosforila lipasas que incrementan la formación de ácidos grasos que activan a Ucp1 y sirven de sustrato energético. Además, PKAc fosforila a CREB (elemento de unión en respuesta a cAMP) que se une a su elemento de respuesta CRE del gen de *Ucp1* que también tiene elementos de respuesta a receptor de hormonas tiroideas (TRE), ambos incrementan la expresión de *Ucp1*<sup>25</sup> y en forma similar, la expresión de *Dio2* (Figura 4).

El músculo esquelético es influenciado por las HT, cuyo papel es importante para la función contráctil, la regeneración, la miogénesis, así como para el metabolismo y eliminación de glucosa. Estos efectos dependen de la presencia de los transportadores de MCT8 y MCT10

en la membrana plasmática, de la expresión de los receptores de HT (THRa y THRb) y de la disponibilidad hormonal que es determinada por la actividad de la Dio2<sup>29</sup>.

Situaciones de demanda energética como el ejercicio<sup>30</sup> o el frío<sup>31</sup> activan al eje tiroideo, mientras que se inhibe en condiciones de balance energético negativo como el ayuno<sup>32</sup> o por situaciones de estrés agudo<sup>33</sup> o crónico<sup>34</sup>. El estrés, ya sea agudo o crónico modifica los patrones alimenticios y el metabolismo, siendo estos dos últimos la base del síndrome metabólico<sup>14</sup>.

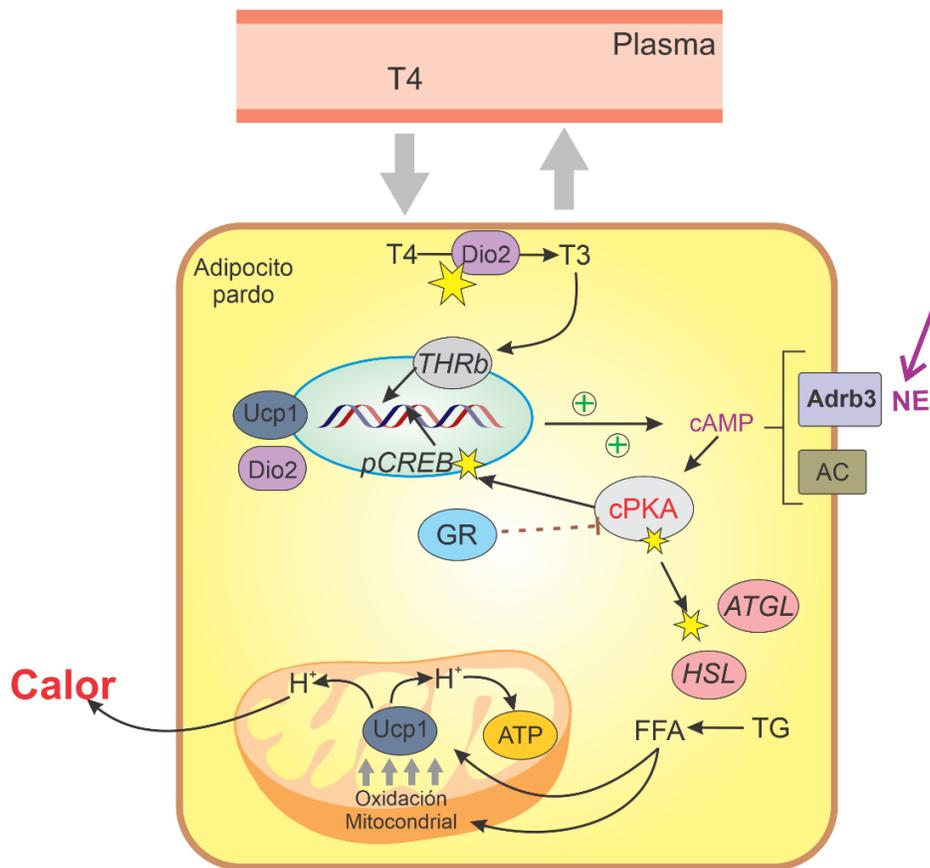


Figura 4. **Mecanismo de la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo pardo.** La señalización local de las hormonas tiroideas incrementa la termogénesis en el TAP. T4 es transportada dentro del adipocito y es convertida a T3 por la Dio2. La norepinefrina se une al receptor ADRB3 y activa a la adenilato ciclasa incrementando la concentración de cAMP, lo que activa a la PKA que fosforila a la Dio2 e incrementa la T3 intracelular. Además, PKA fosforila lipasas que incrementan los ácidos grasos libres que servirán como sustratos para la termogénesis mediada por la Ucp1.

*Adrb3*, Receptor adrenérgico beta 3; *AC*, Adenilato ciclasa; *ATGL*, lipasa adipocítica de triglicéridos; *ATP*, Adenosin trifosfato; *cAMP*, adenosin monofosfato cíclico; *cPKA*, subunidad catalítica de la proteína cinasa A; *Dio2*, Desyodasa 2; *FFA*, Ácidos grasos libres; *GR*, receptor a glucocorticoides; *HSL*, lipasa sensible a hormonas; *NE*, norepinefrina; *pCREB*, elemento de respuesta a cAMP fosforilado; *THRb*, receptor de hormonas tiroideas beta; *T4*, tiroxina; *T3*, Triyodotiroina; *Ucp1*, proteína desacopladora 1.

Basado y modificado de Castillo-Campos, A., et al, 2020.

## 1.5 Diferencias sexuales en la respuesta al estrés y el metabolismo

Los estudios con animales y humanos indican que aunque la respuesta neuroendocrina de “lucha o huida” al estrés es bastante similar entre hembras y machos<sup>35</sup>, existen diferencias sexuales en la actividad del eje HPA inducida por estrés. La información procede principalmente de estudios realizados en roedores e indica que las diferencias provienen de las hormonas gonadales durante periodos clave del desarrollo o en la adultez<sup>36</sup>. En ratas, las hembras tienen concentraciones basales de corticosterona más altas que los machos y una respuesta al estrés agudo más robusta que se evidencia con niveles más elevados de corticosterona y ACTH después de exponer a los animales a un estresor psicológico como la restricción de movimiento. Así mismo, las hembras presentan un regreso tardío a los niveles basales de corticosterona y ACTH, lo que indica una diferencia en la regulación de la retroalimentación negativa del eje HPA debido al sexo de los animales<sup>37</sup>.

Otra diferencia sexual se encuentra en la distribución del tejido adiposo: las hembras presentan una mayor deposición de grasa en la región subcutánea, mientras que los machos tienden a acumular más grasa en la región abdominal o visceral<sup>38</sup>. Los estrógenos juegan un papel importante en la remodelación del tejido adiposo abdominal, pues tienen un efecto anorexigénico y al unirse al receptor de estrógeno ( $ER\alpha$  o  $ER\beta$ ) regulan a la baja la expresión de  $PPAR\gamma$  un gen adipogénico, disminuyen la expresión de la lipoproteínlipasa (LPL) fundamental para la captura de grasas en los adipocitos e hidrolizar los triglicéridos de los quilomicrones e incrementan la expresión de la lipasa sensible a hormonas (HSL) que también se encarga de hidrolizar triglicéridos<sup>39</sup>.

El balance energético también presenta diferencias sexuales relacionadas con la ingesta energética. En mamíferos, los machos tienden a consumir más alimento que las hembras y aunque se asume que el aumento de la ingesta apoya su mayor masa muscular, su estrategia evolutiva de supervivencia después de un periodo de privación de alimentos aumenta las reservas de grasa al incrementar la ingesta de alimentos. Por el contrario, las hembras reducen la pérdida de los depósitos de grasa al disminuir el gasto de energía<sup>40</sup>. Este último mecanismo coincide con la capacidad de las hembras para resistir la pérdida de las reservas de energía a pesar de la escasez de alimento. En condiciones de gasto energético, como lo es el ejercicio,

cuando incrementan los requerimientos energéticos, las hembras oxidan una mayor proporción de lípidos en relación con los carbohidratos, mientras que los machos utilizan preferentemente los carbohidratos como fuente de energía<sup>41</sup>.

## **1.6 Neurobiología de la pubertad y la adolescencia**

Aunque la pubertad y la adolescencia son periodos que se superponen, siendo la pubertad parte de la adolescencia, los términos no se deben usar indistintamente. La pubertad se refiere exactamente al periodo de tiempo durante el cual se alcanza la madurez sexual y se inicia con una mayor secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo lo cual conlleva a un incremento de los niveles de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) que controlan la síntesis de las hormonas sexuales y generan la madurez gonadal<sup>42</sup>. En contraste, la adolescencia se refiere al periodo gradual de transición de la niñez a la adultez y es cuando se desarrollan y maduran las habilidades cognitivas y sociales, aunque los límites de este periodo no están definidos con precisión<sup>43</sup>. En ratas hembra el periodo de pubertad comprende del día posnatal (DPN) 30 al 40, mientras que en ratas macho abarca desde el DPN 40 hasta el 60. De acuerdo con Tirelli, E., et al, 2003, la adolescencia en roedores se puede clasificar en tres intervalos: adolescencia temprana o prepuberal (DPN 21 al 34), adolescencia media o periadolescencia (DPN 34-46) y adolescencia tardía (DPN 46-59)<sup>44</sup>.

Después del periodo neonatal, la adolescencia es el periodo más importante del neurodesarrollo. Las regiones límbicas como el hipocampo, importante para ciertos tipos de memoria y aprendizaje; la amígdala, región que media las respuestas fisiológicas y del comportamiento asociadas con el miedo y las emociones; y la corteza prefrontal involucrada en las funciones ejecutivas del pensamiento como la capacidad de realizar juicios sobre el bien y el mal, predecir consecuencias a largo plazo y capacidad de inhibir comportamientos impulsivos<sup>45</sup>, continúan madurando durante la adolescencia y son áreas del cerebro asociadas al circuito del estrés<sup>46</sup>. Típicamente se encuentra una sobreproducción de axones y sinapsis durante la adolescencia temprana, seguida de una poda sináptica rápida, indicando que las conexiones y la comunicación entre las regiones límbicas se encuentran en un estado altamente transitorio durante la adolescencia<sup>43</sup>.

Este periodo del desarrollo es susceptible a daño que afecte la formación adecuada de los circuitos. En esta etapa, muchos desórdenes neuropsiquiátricos emergen por primera vez, siendo que la psicopatología de estos desordenes se ha ligado con anomalías en el desarrollo normal del cerebro. Además, trastornos como la depresión o trastornos de ansiedad (en particular el trastorno de ansiedad generalizada y el trastorno de ansiedad social) tienen mayores tasas de prevalencia en las mujeres que en los hombres durante la adolescencia, persistiendo diferencias en la edad adulta<sup>47</sup>. Los trastornos de ansiedad están asociados con trastornos del estado de ánimo, comportamientos disruptivos, trastornos alimenticios y de abuso de sustancias<sup>48</sup>. Los estudios en humanos y los modelos animales respaldan un mayor riesgo de desórdenes del comportamiento y el neurodesarrollo en los machos cuando están expuestos al estrés durante el desarrollo fetal y el periodo neonatal mientras que en las hembras el riesgo de presentar desordenes afectivos es mayor cuando el estrés se presenta en la adolescencia. En los roedores, el estrés crónico experimentado durante la pubertad y adolescencia produce resultados sexo-específico en la sensibilidad del eje adrenal y disminución en la neurogénesis del giro dentado (parte del hipocampo), particularmente en las hembras<sup>47</sup>.

### **1.7 El aislamiento social como modelo de estrés crónico**

El aislamiento social se considera como un potente estresor tanto en humanos como en animales. El grado e intensidad de los efectos del aislamiento social dependen de la organización social de cada especie<sup>49</sup>. En humanos, la falta de contacto social se asocia con un mayor riesgo de deterioro cognitivo y trastornos neuronales, y la percepción del aislamiento social (soledad) es un factor de riesgo de la mortalidad<sup>50</sup>.

En roedores, el aislamiento social en la adolescencia induce alteraciones en las funciones neuroquímicas, fisiológicas, neuroendocrinas, de comportamiento social que permanecen hasta la edad adulta. Si bien el trastorno de depresión no se puede modelar en animales, algunos síntomas clínicos como el estado de ánimo deprimido y la anhedonia se estudian en modelos de roedores utilizando la prueba de nado forzado y la prueba de preferencia de solución dulce<sup>49</sup>. Los estudios en ratas sugieren que el aislamiento social en la adolescencia afecta más a las hembras: induce hiperfagia, comportamientos depresivos<sup>51</sup>, una

hiperrespuesta del eje HPA al estrés<sup>52</sup> y una mayor preferencia por las soluciones azucaradas<sup>53</sup>.

## 2. Antecedentes

Nuestro laboratorio se ha centrado en el estudio del efecto del estrés sobre las neuronas TRHérgicas y la biosíntesis de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y la actividad del eje tiroideo bajo el efecto del estrés agudo o crónico en respuesta a distintas situaciones de demanda energética. Se han estudiado distintas condiciones de estrés agudo o crónico en ratas adultas, así como en etapas neonatales con modelos como el de separación materna durante la lactancia, o el aislamiento desde la pubertad a la adultez. Actualmente se estudia el efecto del estrés en otra etapa vulnerable del desarrollo como es la adolescencia.

### 2.1 Efecto del estrés agudo en el eje tiroideo

La exposición al frío activa rápidamente el sistema nervioso autónomo, el eje adrenal y el eje tiroideo que estimulan la termogénesis e incrementan el gasto energético. En cambio, la actividad del eje HPT está inhibida por exposición aguda a estresores psicogénicos mientras que la del HPA está activada. Por ejemplo, una sesión de restricción de movimiento (RES) durante 30 minutos activa rápidamente el eje HPA, con un pico en los niveles de corticosterona en suero 15 min después de terminada la prueba, pero inhibe la expresión de proTRH en el NPV, la liberación de TRH del hipotálamo medio basal y los niveles de TSH disminuyen en suero<sup>54</sup>.

El estrés agudo o la inyección de corticosterona previa a la exposición al frío pueden restringir la activación del eje tiroideo. Esto fue demostrado mediante una inyección de corticosterona en ratas macho adultas una hora previa a la exposición al frío. El pretratamiento reprimió la respuesta del eje HPT inhibiendo la liberación de TSH y T4, así como la actividad de Dio2 en tejido adiposo pardo. La inyección de corticosterona incrementó los niveles del ARNm de pro-TRH en la zona media y caudal del núcleo paraventricular de ratas que permanecieron a temperatura ambiente, pero no en aquellas expuestas al frío<sup>33</sup>. El frío estimula la vía noradrenérgica que incide en neuronas TRHérgicas y estimula la fosforilación de CREB, en ratas expuestas 1h al frío; pCREB se detecta en el NPV y en parte, en neuronas TRHérgicas. Las neuronas hipotalámicas en cultivo incubadas con NE o con estimuladores de la PKA mostraron que pCREB es fundamental para la transcripción basal de TRH<sup>55</sup> y la corticosterona interfiere con la unión de pCREB al promotor del gen de TRH mediante la unión del GR

activado con la PKAc impidiendo su translocación a núcleo<sup>56</sup>. Este mecanismo explica la interferencia que ejerce la corticosterona en la fosforilación de CREB en las neuronas TRHérgicas del PVN de animales expuestos al frío <sup>56</sup>.

## **2.2 Efecto del estrés crónico en el adulto en la respuesta del eje tiroideo a demandas energéticas**

### *2.2.1 Demanda energética: una hora de frío*

Una vez que se demostró que la respuesta del eje tiroideo se inhibe ante el estrés agudo o una inyección previa de corticosterona, se investigó si el estrés crónico interfiere también en la respuesta del eje tiroideo al frío. Para comprobarlo se usaron dos modelos: el estrés crónico homotípico por restricción de movimiento (RES) ya que se sabe que las ratas se habitúan a este tipo de estrés después de dos semanas<sup>30</sup>, y el estrés crónico heterotípico usando el modelo de estrés crónico variable (CVS), esto debido a que este modelo de estrés disminuye la actividad basal del eje HPT<sup>57</sup> y altera la variación circádica de las hormonas tiroideas T4 y T3<sup>58</sup>. En este estudio se utilizaron ratas macho adultas que fueron sometidas diariamente durante 15 días a 30 minutos de RES o dos veces al día a CVS y en el día 16 los animales fueron introducidos en jaulas individuales a una hora de frío (5°C) o en un cuarto cercano a temperatura ambiente (21°C). El estrés crónico provocado por RES provocó la habituación reportada del eje HPA: la concentración en suero de corticosterona disminuyó gradualmente a lo largo de los 15 días de estrés y para el día 15 se había normalizado, en cambio, en las ratas con CVS la concentración de CORT incrementó después de cada estresor y a lo largo del tiempo.

El frío incrementó los niveles de corticosterona en suero tanto en los animales controles como en los estresados, así como la expresión de *Crh* en los controles sometidos a frío y en los grupos CVS a TA o a 5°. En cuanto a la actividad del eje tiroideo, incrementaron los niveles del ARNm de *Trh* en el NPV de los controles que permanecieron en frío, así como los niveles de TSH en suero. Sin embargo, esto no ocurrió en los animales sometidos a RES o CVS. La expresión de genes involucrados en la termogénesis en tejido adiposo pardo, *Dio2* y *Ucp1* se estimuló por el frío en los controles, pero no en los grupos RES o CVS. Los resultados demuestran que independientemente del tipo de estresor crónico (homotípico o heterotípico),

la respuesta del eje tiroideo y la expresión de genes termogénicos ante una hora de frío se altera y presenta una respuesta atenuada<sup>59</sup> (Artículo publicado, anexo 4).

### *2.2.2 Demanda energética: ejercicio voluntario*

Si bien el ejercicio crónico genera una demanda energética que altera la homeostasis del organismo y activa el eje HPA incrementando los niveles de corticosterona en sangre al igual que durante el estrés crónico, el ejercicio no produce los efectos adversos de los altos niveles circulantes de corticosterona, ya sea porque el ejercicio incrementa los niveles basales de corticosterona que actúa como un amortiguador ante un nuevo estresor o porque, a diferencia del estrés crónico en el que se regula a la baja la expresión de GR<sup>60,61</sup>, el ejercicio puede incrementar la expresión de GR en el hipocampo o revertir el decremento de GR después del estrés crónico<sup>62</sup>. Estas son sólo algunas de las diferencias que al final producen los efectos benéficos del ejercicio: mejora el manejo del estrés, previene la depresión y mejora la cognición y la memoria<sup>63</sup>.

Para evaluar los efectos de una situación de demanda energética de mayor duración en la actividad del eje tiroideo se utilizó el paradigma de ejercicio voluntario en ratas macho adultas durante 14 días<sup>30</sup>. El modelo de ejercicio voluntario en una rueda de ejercicio (WR: Wheel running) es útil porque asemeja la actividad física diaria en humanos no sedentarios y es menos estresante en las ratas que el ejercicio forzado en una cinta de correr. Aun cuando el ejercicio voluntario no se consideran un evento crónicamente estresante, incrementa los niveles de corticosterona<sup>63</sup> y las ratas macho disminuyen la ingesta de alimento por lo que puede causar una inhibición en el eje HPT. Por esta razón, los experimentos incluyen un grupo de ratas a las que se les pareo el alimento con la cantidad consumida por las ejercitadas.

Después de dos semanas de ejercicio voluntario los animales ejercitados disminuyeron sus niveles de la grasa corporal, lo que condujo a una caída proporcional de los niveles de leptina circulante, además disminuyó la expresión de proTRH en el NPV y los niveles de TSH y corticosterona en suero. Por el contrario, el grupo pareado al alimento presentó un incremento de sus niveles de corticosterona circulante y una caída de los niveles de T3, pero no disminuyeron sus depósitos de grasa ni los niveles de leptina en suero. Estos resultados apoyan una relación positiva entre el ejercicio y la actividad del eje HPT y una relación negativa entre la actividad del eje HPT y la cantidad de grasa<sup>30</sup>.

Ya que el eje tiroideo se activa durante el ejercicio y su activación es necesaria para disminuir los depósitos de grasa, se estudió si la exposición previa a estrés crónico atenúa la respuesta del eje tiroideo al ejercicio<sup>34</sup>. Para comprobarlo se utilizaron dos paradigmas de estrés crónico: un estrés crónico homotípico como es la restricción de movimiento por 14 días en el adulto y el aislamiento social (ISO) desde la adolescencia (DPN 30), un fuerte estresor psicosocial que causa una hiperactivación del eje adrenal y que previene la habituación en los animales. Estos tipos de estresores involucran distintos circuitos neuronales<sup>11</sup>. Ambos tipos de estresores se aplicaron en machos y hembras y al término del periodo de estrés crónico se sometió a las ratas a un periodo de ejercicio voluntario por 14 días en el caso del estrés por restricción de movimiento o por 16 días de manera alternada (por no tener suficientes cajas de ejercicio) en el caso del estrés por aislamiento social.

Se encontró que las hembras corrieron mucho más que los machos, lo que les permitió perder grasa independientemente de si hicieron ejercicio diario o de manera alternada. En machos, el estrés por restricción de movimiento disminuyó la cantidad de ejercicio realizada, ya sea por fatiga o falta de motivación. El ejercicio incrementó la expresión de *Trh* en el NPV en machos y los niveles de TSH y T4 en suero en las hembras en los grupos controles, sin observarse estos cambios en los grupos estresados. Los cambios encontrados en el eje tiroideo se relacionaron con la pérdida de grasa en los controles, lo que no sucedió con los estresados, que pueden tener problemas con la disponibilidad y movilización de sus reservas energéticas por los eventos de estrés previo alterando la lipólisis en el tejido adiposo. Estos resultados demuestran que una historia de estrés crónico disminuye la respuesta metabólica adecuada al ejercicio voluntario, que se caracteriza por una pérdida de los depósitos de grasa tanto en machos como en hembras<sup>34</sup>.

Los resultados obtenidos en animales aislados desde el fin de la lactancia hasta adultez no permiten distinguir si son efectos recientes o durante la etapa crítica. Debido a que las hembras son más susceptibles al estrés durante la adolescencia, nos proponemos estudiar el efecto a largo plazo del estrés por aislamiento social durante este periodo del desarrollo y evaluaremos si la reactividad ante un estresor afecta la respuesta a las demandas energéticas en la actividad del eje HPT y en órganos blanco de hormonas tiroideas.

### **3. Justificación**

Se sabe que el estrés durante la adolescencia provoca alteraciones en la respuesta del eje adrenal del adulto cuando es expuesto a un nuevo estresor. Estas alteraciones pueden inhibir la activación del eje tiroideo en situaciones de demandas energéticas como el frío o el ejercicio. La falta de incremento en hormona tiroidea evitará el flujo adecuado de sustratos metabólicos a sus órganos blanco que será detectado como un estado de balance energético negativo, lo que puede provocar una disminución de la actividad física y/o un mayor consumo de alimento.

Con base en lo anterior, proponemos que, si la respuesta del eje HPT es deficiente ante demandas energéticas, a la larga, el individuo puede presentar mayor ganancia de peso y eventualmente obesidad.

## 4. Objetivos

### General

Estudiar el efecto del estrés crónico durante la adolescencia en la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides al ejercicio voluntario de ratas hembra adultas y su repercusión en la homeostasis energética.

### Específicos

1. Monitorear el consumo de alimento y la ganancia de peso en la adolescencia y la adultez.
2. Evaluar si el estrés altera el estado conductual y la locomoción mediante la prueba de campo abierto (OFT) y si modifica el estado metabólico midiendo los niveles séricos de corticosterona en el periodo de estrés en adolescencia.
3. Evaluar el estado emocional con la prueba de anhedonia después de terminar el periodo de aislamiento cuando la rata ya es adulta y dos semanas después para comprobar si hay secuelas debido al estrés.
4. Asegurar si hay alteraciones metabólicas debidas al paradigma de estrés en la adolescencia sometiendo a un grupo de ratas a un reto metabólico en la etapa adulta (una hora a 5°C) y medir los pesos del tejido adiposo blanco, glándulas adrenales, así como medir niveles de hormonas séricas y expresión de genes regulables del eje tiroideo y del eje adrenal.
5. Evaluar el efecto del estrés en el ejercicio voluntario en la rata adulta mediante el registro de la cantidad de revoluciones realizadas, consumo de alimento y la ganancia de peso.
6. Determinar cambios en la actividad del eje tiroideo y la activación del eje adrenal midiendo niveles séricos de hormonas (corticosterona, TSH, T3 y T4) así como la expresión de *Trh* y *Crh* en PVN y de genes que participan en la termogénesis y la lipólisis en tejido adiposo pardo y blanco, que son órganos blancos de HT.

## 5. Métodos

### 5.1 Animales

Se utilizaron 44 ratas hembra de la cepa Wistar de la colonia del Instituto de Biotecnología para cada experimento (dos experimentos en total), con un peso de 77-100 g de 30 días de edad con acceso a una dieta estándar (Teklad 2018SX, Envigo, USA) y agua purificada *ad libitum*. Se mantuvieron en el bioterio del instituto con un periodo de luz/oscuridad de 12 h (luces encendidas de 7 a 19 h) y con temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ ). Los animales se recibieron una semana antes del inicio del experimento y fueron llevados a la sala dónde permanecerían para que se habituaran a ella. Los cambios de cama se realizaban los lunes y jueves entre 8 y 9 am. El día de inicio del experimento se pesaron y se formaron los grupos experimentales, procurando que el peso promedio de ambos grupos fuera similar. El consumo de alimento se midió cada dos días y el peso corporal cada semana.

### 5.2 Paradigma de estrés

El aislamiento social es un modelo de estrés en roedores que tiene validez para entender el impacto del estrés social en la adolescencia ya que, como los humanos, los roedores exhiben altos niveles de interacción social en esta etapa, por lo que el aislamiento social les resulta aversivo y les produce efectos a largo plazo tanto en las interacciones sociales como en el comportamiento<sup>64</sup>, además de alteraciones neuroendocrinas<sup>65</sup>.

El protocolo de estrés por aislamiento social se basó y modificó de Parra-Montes de Oca et al, 2019<sup>34</sup> y fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología (Proyecto No. 374). El paradigma de estrés crónico por aislamiento social consistió en tener dos grupos con 22 ratas cada uno: el grupo control (C) en el que se mantuvieron dos ratas por caja y el grupo aislado (ISO) con una rata por caja, iniciando al día posnatal 30, en el periodo de adolescencia temprana o prepúberes<sup>66,67</sup> y hasta el día posnatal 63 cuando las ratas ya han alcanzado la adultez; las ratas ISO regresaron entonces a estar dos por jaula, con una rata que también había sido aislada. Los DPN 45 y 60, que corresponden a la mitad y al final del periodo de aislamiento se obtuvo sangre de la cola de cada rata para lo cual se realizó un corte en la punta de la cola que se acariciaba presionando para recolectar la gota en un tubo eppendorf

de 1.5 ml que permaneció 30 minutos a temperatura ambiente y después en hielo. Para obtener el suero (aproximadamente 100  $\mu$ l) se centrifugó a 825 xg por 25 minutos y se guardó a -20°C para su posterior análisis.

Durante el periodo de aislamiento ambos grupos permanecieron en la misma sala para que el grupo aislado estuviera expuesto al contacto visual, auditivo y olfatorio del el grupo control<sup>68</sup>. Al término del periodo de aislamiento se colocó al grupo control en una sala distinta para evitar estresarlos, puesto que en el periodo de estrés intermitente iba a haber una mayor manipulación del grupo aislado, causando estrés por ruido.

El grupo ISO fue sometido a un periodo de estrés intermitente, que consistió en un estresor diferente cada tres días y a distintas horas del día, para evitar que las ratas generaran resiliencia después del estrés por aislamiento. Los estresores aplicados se seleccionaron con base en el protocolo de estrés crónico variable previamente estandarizado<sup>59</sup> y evitando aquéllos que suponen una demanda energética que pueda alterar el eje tiroideo.

- ✓ Ruido blanco: en un cuarto aislado se colocó un altavoz a 90 dB aproximadamente con un audio que se repite por una hora.
- ✓ Plataforma elevada: las ratas fueron trasladadas a un cuarto separado y se colocaron en una plataforma de madera de 20 cm de diámetro unida a un tubo metálico de un metro de altura que se fija a una base cuadrada de 45 x 45 cm, durante un periodo de 15 minutos y posteriormente fueron regresadas a su sala.
- ✓ Restricción de movimiento: cada rata fue introducida a un tubo de acrílico transparente de 23.5 cm de longitud y 7 cm de diámetro con agujeros que permiten una adecuada aireación y manteniendo la cola fuera durante 30 minutos. En la Figura 5 se muestra el protocolo completo del experimento.

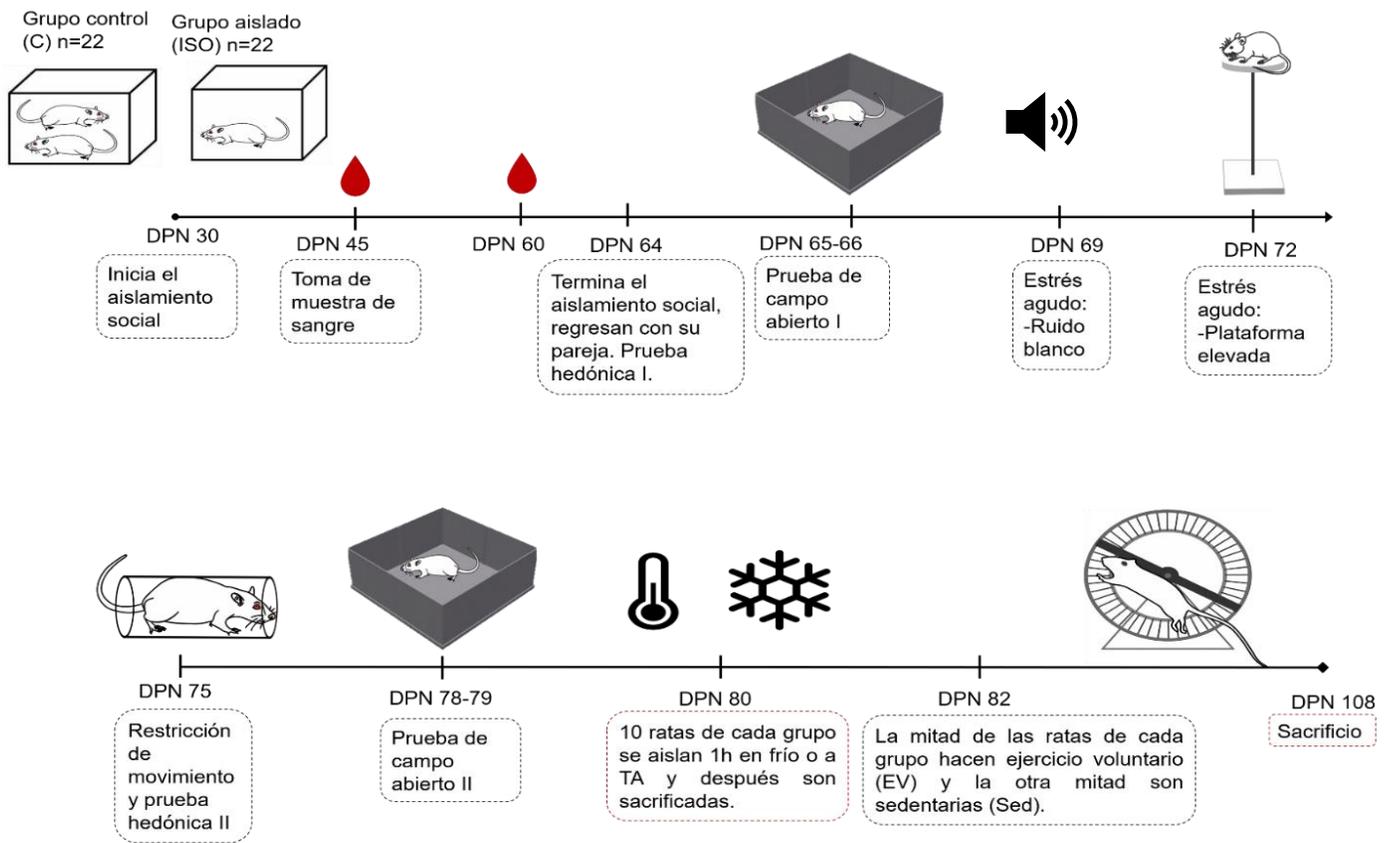


Figura 5. Línea del tiempo del protocolo experimental desde el DPN 30, fecha de inicio del aislamiento social, hasta el DPN 108, cuando se sacrificaron las ratas que se sometieron a ejercicio voluntario.

### 5.3 Prueba de hedonismo

Esta prueba se basa en el estudio de Bekker L., et al, 2014, con una modificación basada en el protocolo de Enkel T. et al., 2010 y consiste en ofrecerle a las ratas un alimento azucarado (Leche condensada, dilución 1:3) por un periodo de dos horas y medir el consumo de este alimento a la primera y segunda hora<sup>69</sup>. Para realizarla se usaron tubos de 50 ml graduados con un tapón y un popote metálico previamente esterilizados (Figura 6A). Las ratas fueron colocadas en cajas individuales limpias sin alimento ni agua (Figura 6B), en una sala distinta y al terminar la prueba fueron regresadas a su sala con su compañera. Esta prueba se realizó dos veces, la primera en el DPN 64, que fue el último día de aislamiento, antes de ser regresadas con otra rata que también estuvo aislada y la segunda; el DPN 75, justo después del estrés agudo.



Figura 6. **Fotografías de la prueba de hedonismo.** A) Tubos cónicos de 50 ml con la solución dulce. B) Ratas en cajas individuales y limpias, sin alimento ni agua más que la solución dulce.

### 5.4 Prueba de campo abierto

Para evaluar los efectos del aislamiento social en los niveles de locomoción y ansiedad se utilizó la prueba de campo abierto (Open field test OFT). De acuerdo a lo previamente publicado<sup>54</sup>, los animales se colocaron en una caja negra con una superficie de 1 m<sup>2</sup> con paredes de 50 cm de alto (San Diego Instruments., CA) y se registró, por medio de una cámara sujeta al techo, el tiempo, la distancia y el número de entradas que hacen los animales a dos

zonas: el centro y la periferia y que son delimitadas en un software (SMART 2.5)<sup>54</sup>. El animal se situó en el centro de la arena y se dejó que explorara libremente durante cinco minutos (Figura 7). La distancia y el tiempo que las ratas pasan en la periferia (zona que limita la arena con paredes de 50 cm de altura) miden el grado de locomoción, mientras que los niveles de ansiedad se determinan por el tiempo y la distancia que las ratas pasan en el centro de la arena, así como el número de cruces que hacen en esta zona. Esta prueba se realizó dos veces: la primera en el DPN 65-66, al día siguiente de que terminaron el aislamiento social y la segunda en el DPN 78-79, después del periodo de estrés intermitente. Debido al número de animales en cada experimento (n=44), la prueba se tuvo que realizar en dos días, sometiendo a 22 animales por día, la mitad de ellos del grupo C y la otra mitad del grupo ISO. La arena en la que se realiza la prueba se limpió entre cada animal con una solución de agua y ácido acético (1% v/v) para eliminar cualquier rastro de olor.

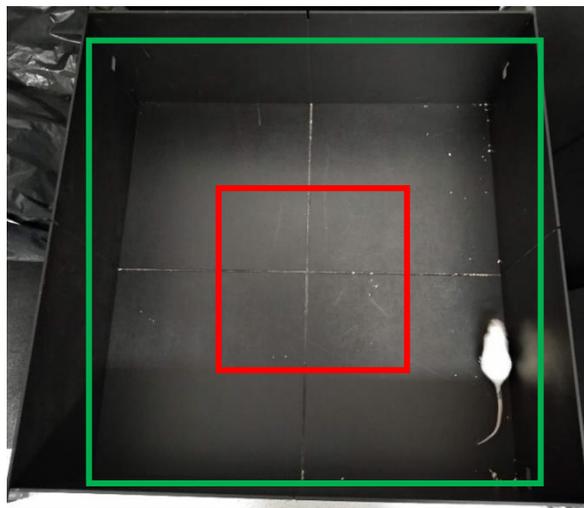


Figura 7. **Rata durante la prueba de campo abierto.** Cada rata se colocó al centro y se dejó explorar por 5 minutos. Una cámara sujeta al techo permite registrar los movimientos de la rata y el tiempo que permanece en cada zona. La zona delimitada por el cuadro rojo indica el centro de la caja, mientras que el verde la periferia. Debido a que las ratas muestran preferencia por los espacios cerrados, cruzar por el centro de la arena se relaciona con menores niveles de ansiedad y un comportamiento exploratorio.

## 5.5 Reto metabólico

El eje tiroideo se activa ante situaciones de demanda energética, como el frío o el ejercicio<sup>14</sup>. La manera de evaluar el efecto del estrés causado por aislamiento social en la adolescencia y los estresores agudos en la etapa adulta en la respuesta rápida del eje tiroideo se hizo sometiendo a un grupo de ratas a una hora de frío. En el día posnatal 80, 10 ratas de cada grupo (n=20) con pesos heterogéneos se colocaron en jaulas limpias sin agua ni alimento a

las 9:00 AM; cinco se introdujeron al cuarto frío, permaneciendo una hora a 5°C, mientras que las otras cinco se en un cuarto contiguo a temperatura ambiente (TA). Una jaula de cada grupo se introdujo cada dos minutos, al cuarto frío o al de temperatura ambiente. Se registraron los tiempos para sacrificar a las ratas una hora después de la exposición al frío.

## 5.6 Ejercicio voluntario

En el DPN 82, seis ratas de cada grupo (n=24) fueron sometidas a ejercicio voluntario por 26 noches, mientras que el resto permaneció en condiciones de sedentarismo. El protocolo de ejercicio voluntario<sup>30,34</sup> (Figura 8) consiste en colocar a los animales a las 19:00 h, cuando se apagan las luces, en jaulas individuales con acceso a una rueda de ejercicio, con agua y comida *ad libitum*. Las ratas sedentarias se colocan en jaulas individuales y se les proporciona la cantidad de alimento promedio que consume su grupo ejercitado, por lo que el alimento se pesa todos los días en la mañana y en la tarde. Debido al ruido que producen las ruedas de ejercicio, las ratas ejercitadas y las ratas sedentarias fueron colocadas en salas distintas solamente durante la noche, etapa de actividad de las ratas y por la mañana se llevaban a de regreso a su sala habitual y se regresaban con su pareja. Cada caja de ejercicio cuenta con un contador de revoluciones así que diariamente se registraba el número que hacía cada rata, mientras que el peso se registraba cada semana. Después de 26 noches de ejercicio, en el DPN 108 y tres horas después del cambio de luces (10:00 am) las ratas se sacrificaron.



Figura 8. **Ratas durante la fase de ejercicio voluntario.** A) Ratas en cajas de ejercicio voluntario justo antes del cambio de luces. Cada rata se colocaba en una jaula individual justo antes del cambio de luces a las 19:00 h y permanecía ahí hasta las 7:00 h cuando se prendían las luces, posteriormente era regresada con su compañera que también era del grupo ejercitado. B) Ratas del grupo sedentario, se aislaban en cajas estándar y se les daba la cantidad de alimento que había consumido el grupo ejercitado la noche anterior. A las 7:00 h eran regresadas con su respectiva compañera que también pertenecía al grupo sedentario.

## **5.7 Eutanasia y extracción de tejidos**

Las ratas se sacrificaron como se describe<sup>34</sup> con una guillotina filosa, por un técnico experimentado, quien además extrajo la sangre troncal y les hizo un frotis vaginal a las ratas para determinar la fase del ciclo estral en que se encontraban al momento del sacrificio. Un equipo de cinco a seis personas se encargó de disecar y pesar los tejidos. Se pesó el tejido adiposo blanco (TAB) gonadal, retroperitoneal e interescapular y las glándulas adrenales, además, se disecaron e inmediatamente se pusieron en hielo seco el cerebro, la adenohipófisis, el tejido adiposo pardo, el hígado, el músculo esquelético, el TAB interescapular y gonadal, y en animales ejercitados, el músculo gastrocnemio, una vez congelados se guardaron a -70°C. La sangre troncal se centrifugó a 825 x g por 25 min, se hicieron 3 alícuotas de suero y se guardó a -20°C para su análisis.

## **5.8 Disecciones de cerebros**

Los cerebros congelados se disecaron cómo se describe<sup>59</sup>. Primero se desinfectó el cuarto con luz UV durante 30 min, posteriormente se limpió a profundidad el Criostato HM525 NX (Thermo Fisher Scientific) con etanol al 70% y después con RNaseZAP (Sigma-Aldrich) para minimizar al máximo la contaminación y degradación del ARN en el tejido. Se tomaron cerebros al azar en una bandeja con hielo seco y se colocaron en el criostato durante 2 h para que se atemperaran. Se realizaron rebanadas de los cerebros de 200 µm de grosor. Con base en el Atlas de Paxinos & Watson<sup>70</sup> se obtuvo el NPV anterior (Bregma -1.08 a -1.48) y el NPV medio y posterior (Bregma -1.48 a -2.08) se acomodaron sobre cajas Petri llenas de hielo seco triturado y con un sacabocados de 1 mm de diámetro se extrajo la región deseada. El tejido fue colocado en tubos cónicos de seguridad de 1.5 ml previamente marcados e inmediatamente se guardaron en una hielera con hielo seco para evitar que se descongelara el tejido.

## **5.9 Radioinmunoensayos**

El principio del radioinmunoensayo (RIA) consiste en la competencia entre un antígeno marcado radioactivamente (Ag\*) y su equivalente sin marca (Ag) que se unen a una cantidad limitada de un anticuerpo específico (Ab). Ya que la cantidad de anticuerpo y antígeno marcado se mantienen constantes, un aumento en el antígeno sin marcar da como resultado que menos

especies marcadas sean capaces de unirse al anticuerpo. Gracias a la alta sensibilidad y especificidad de esta técnica es posible detectar concentraciones de pg/ml en tejidos o fluidos biológicos<sup>71</sup>. Aunque el principio del RIA es el mismo, el protocolo varía dependiendo de la sustancia que se quiere medir. En este caso se midió la concentración de tirotopina y corticosterona en suero.

Todos los radioinmunoensayos contuvieron (en tubos de ensayo de 12x75 mm Fisher Brand):

- a) Curva estándar por triplicado de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 pg de la hormona a medir.
- b) Estándar interno hipotalámico o suero control por triplicado en cantidades que van de los 20 a los 500 ul resuspendidos en amortiguador RIA
- c) Controles: tres tubos conteniendo cpm totales (T) con la cantidad de marca radioactiva usada en cada tubo, tres tubos conteniendo el amortiguador RIA y la marca radioactiva corresponden a unión inespecífica (NSB) y, tres tubos que representan la unión de anticuerpo y antígeno marcado (Bo) conteniendo el amortiguador RIA, la marca radioactiva, y el anticuerpo. Todos los tubos deben tener el mismo volumen total que se regula con el amortiguador.

#### *5.9.1 Radioinmunoensayo de corticosterona*

Se hizo una dilución de los sueros 1:500 en amortiguador de RIA (10 mM de fosfatos pH 7.5, 150 mM de NaCl y 0.1% de gelatina grado inmunoensayo Biorad). Los tubos con el suero diluido se colocaron en un baño de agua a 90°C durante 10 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente, se tomaron 500 µl y se colocaron en tubos de ensayo. A cada uno se le adicionó 100 µl de anticuerpo anti-CORT (ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) diluido 1/9000 y 100 µl de <sup>3</sup>H-CORT (Perkin Elmer) equivalente a 10 000 cpm. Para la curva estándar, a los tubos de cpm totales, por triplicado se les colocó 800 µl de amortiguador RIA +100 µl de <sup>3</sup>H-Corticosterona, a los de NSB; 600 µl de amortiguador +100 µl de <sup>3</sup>H-Corticosterona, mientras que a los de Bo, la curva estándar y el suero control; 500 µl de amortiguador +100 µl de <sup>3</sup>H-Corticosterona + 100 µl de Ab contra CORT. Todos los tubos se incubaron a 4°C por 24 h y posteriormente se les adicionaron (excepto a los T) 200 µl de una solución de carbón-dextrán para separar el antígeno no unido al anticuerpo (Sigma-Aldrich 4g/250 ml de amortiguador), se agitaron y se incubaron a 4°C por 20 min. Después se centrifugaron a 3000 xg 4°C por 15 min y el

sobrenadante se transfirió a viales de centelleo, se les agregaron 4 ml de líquido de centelleo (Ecolite de MP Biomedicals) a todos los viales y se determinaron las cpm de cada vial en el contador de emisiones beta (Beckman).

#### *5.9.2 Radioinmunoensayo de tirotropina*

Para el RIA de TSH se usaron reactivos y protocolos del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). A la curva estándar y Bo se les añadieron 200 µl de amortiguador RIA (50 mM de fosfatos pH 7.5 + NaCl 150 mM + BSA al 1% + EDTA 50 mM) y 100 µl de Ab contra TSH, mientras que para las muestras se utilizó 50 µl de suero+ 100 µl de Ab vs TSH+ 150 µl de amortiguador RIA y a todos los tubos se les adicionaron 100 µl de <sup>125</sup>I-TSH (NIDDK), se dejaron incubar a temperatura ambiente por 24 h, después de eso se les añadieron a todos los tubos, excepto a los totales, 100 µl de Ab vs IgG de conejo diluido al 2.5% en PBS (50 mM de fosfatos pH 7.5 y 150 mM de NaCl), posteriormente se les añadió a los tubos 100 µl de suero normal de conejo al 2% en PBS y se incubaron a TA por 2 h. Después de incubarse se les añadieron, excepto a los T, 1 ml de polietilenglicol al 4% en PBS, se centrifugaron a 5000 xg por 30 min, se aspiró el sobrenadante y se determinaron las cuentas por minuto en el contador gamma.

#### **5.10 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)**

Para la determinación cuantitativa de tiroxina total (T4) y triyodotironina (T3) en suero de rata se utilizaron kits de ELISA (Diagnóstica Internacional, Zapopan, Jalisco, México). Todos los reactivos deben de estar a temperatura ambiente (18-22°C). En los pozos de la curva estándar fueron añadidos 25 µl de suero de rata hipotiroidea como se recomienda<sup>72</sup> y 25 µl de los estándares, en los pozos de las muestras se añadieron 25 µl de suero de cada rata por duplicado. A la curva estándar se le añaden 100 µl del Reactivo Conjugado de trabajo, mientras que a las muestras se les añaden 125 µl de dicho reactivo, para que todos los pozos tuvieran un volumen de 150 µl. Se mezcló perfectamente durante 10 segundos y se dejó incubando durante 45 minutos (para T4) o 60 minutos (para T3). La mezcla de incubación se desechó en un recipiente y se golpeó ligeramente la placa sobre papel absorbente para retirar las gotas residuales. El exceso de enzima se quitó con buffer de lavado (1x) cinco veces y el exceso es retirado golpeando la placa sobre papel absorbente. Se depositaron 100 µl de reactivo TMB

en cada pozo, se mezcló suavemente por 5 segundos y se dejó incubando a temperatura ambiente en la oscuridad por 15 minutos (T4) y 20 minutos (T3). Pasado el tiempo de incubación, la reacción se detuvo agregando 100 µl de solución de paro a cada pozo y mezclando de 5 a 15 segundos. La absorbancia se leyó en un lector de micro pozos Multiskan FC (ThermoFisher Scientific) a 450 nm durante los primeros 15 minutos después de que la reacción se detuvo.

## **5.11 Extracción de ARN**

El ARN de los tejidos se extrajo por el método de tiocianato de guanidina modificado de Chomczynski<sup>73</sup>.

### *5.11.1 Extracción de ARN de NPV*

Las muestras congeladas se homogenizaron con 150 µl de Solución D (Tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, sarcosyl 0.5%, 2-mercaptoetanol 0.1 M). Después de homogenizarlas se mantuvieron en el hielo y se les agregaron 15 µl de Acetato de Na<sup>+</sup> 2M pH 4 y se agitaron con vórtex unos segundos, se les agregaron 150 µl de fenol saturado en agua, frío y se agitaron por 1 minuto, se dejaron reposar un minuto en el hielo y se les añadieron 40 µl de cloroformo:alcohol isoamílico 49:1 y se agitaron nuevamente con vórtex por un minuto. Las muestras se dejaron reposar en el hielo por 15 minutos y se centrifugaron a 10 000 xg (Centrífuga Eppendorf 5403) por 22 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa (aprox. 130 µl), a la cual se agregó el mismo volumen de isopropanol y las muestras se guardaron a -20°C toda la noche.

Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 16700 xg por 30 minutos a 4°C, se obtuvo el sobrenadante y se colocó en otro tubo, la pastilla precipitada se lavó con 250 µl de etanol frío al 70% y se centrifugó a 16700 xg por 15 min a 4°C y se repitió el lavado. Las pastillas se resuspendieron en 20 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC y se les añadieron 2 µl de acetato de Na<sup>+</sup> 3M pH 5 y 40 µl de etanol absoluto frío, se mezcló y se guardaron a -20°C toda la noche.

El tercer día se centrifugaron las muestras a 16700 xg por 30 minutos a 4°C y se hicieron dos lavados de etanol al 70% como en el día anterior. Después del último lavado se quitó el exceso de etanol dándoles una centrifugación rápida (10 segundos aproximadamente) en la centrífuga Eppendorf 5415D y quitando el exceso con la pipeta de 10 µl y puntas blancas. La pastilla

precipitada se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O con DEPC y se tomó 1 µl de este volumen para hacer la lectura de las muestras en el NanoDrop Thermo Scientific 2000c. Debido a la porción tan pequeña de tejido se obtuvieron alícuotas de 0.1 µg ARN/12 µl de H<sub>2</sub>O con DEPC para la RT-qPCR.

#### *5.11.2 Extracción de ARN de Tejido adiposo pardo y blanco*

La extracción de ARN de TAP sigue los mismos pasos que para la extracción de ARN de NPV, con excepción de algunas modificaciones: Día 1) Con un sacabocados de 1 mm de diámetro, se extrajo una porción del tejido congelado a -70°C; el tejido se homogenizó en 350 µl de Solución D, se centrifugaron inmediatamente después de sonicarlas a 755 xg por 10 minutos a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5403) y se agregan 300 µl en lugar de 40 µl de cloroformo:alcohol isoamílico 49:1. Día 2) Después de centrifugar a 16700 xg por 30 minutos a 4°C la pastilla precipitada se disolvió en 120 µl (aprox. 1/3 del volumen del homogenado inicial) de Solución D y 120 µl de isopropanol frío al 100% y se guardan a -20°C toda la noche. Día 3) Se hicieron los lavados de etanol y las muestras se resuspendieron en 75 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC, se hizo la lectura de las muestras en el Nanodrop y se obtuvieron 3 alícuotas de 1 µg de ARN y una de ellas se usó para el gel de agarosa al 1%, mientras que el resto se guardó para la RT-PCR.

### **5.12 Análisis de la expresión genética**

#### *5.12.1 Retro transcripción*

Las alícuotas de ARN (1 µg de ARN en 12 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC) se calentaron en un baño con agua en el Multiblock a 65°C por 5 minutos y se dejaron reposar en hielo 5 minutos. La mezcla de reacción de cada muestra contenía 8.9 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC, 6 µl de amortiguador RT, 3 µl de DTT, 1 µl de oligo dT, 0.6 µl de dNTPs y 0.5 µl de enzima RT. Se incubaron en un baño a 37°C por dos horas y se guardaron a -20°C.

#### *5.12.2 PCR de punto final*

El análisis de la expresión genética en el tejido adiposo blanco y pardo se hizo con la PCR de punto final en el termociclador Benchmark TC9639. Cada reacción de la PCR contenía 4 µl (o 2 µl, dependiendo el caso) de ADNc obtenido en la RT, 35 µl de H<sub>2</sub>O estéril, 5 µl de

amortiguador de PCR, 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de Oligo sentido, 1 µl de Oligo antisentido, 1 µl de dNTPs y 0.5 µl de ADN polimerasa termoestable (Amplificasa de BioTecMol 5 U/ µl). El análisis semicuantitativo de la expresión genética se hizo con el software Image Lab de Biorad para calcular por medio de densitometría la relación entre el gen de interés y el gen control, usando ciclofilina como gen control.

### 5.12.3 PCR cuantitativa

La expresión genética en el núcleo paraventricular se analizó por la técnica de PCR en tiempo real en el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen). Se diluyó el ADNc tomando 5 µl de ADNc+45 µl de agua estéril quedando una dilución 1:10. Los oligonucleótidos también se diluyeron para quedar a una concentración final de 10 mM. La mezcla de reacción que se añade a cada muestra se prepara añadiendo 7.5 µl de Kit para qPCR KAPA SYBR FAST Universal, 1.5 µl de oligonucleótido sentido, 1.5 µl de oligonucleótido antisentido, 1.5 µl de agua estéril y 3 µl de ADNc para tener un volumen final de 15 µl en cada tubo. Se trabaja en la campana de flujo laminar para asegurar las mayores condiciones de esterilidad.

#### 5.12.3.1 Estandarización de los oligonucleótidos y elección del control interno

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados por la Dra. Lorraine Jaimes-Hoy y sintetizados en IDT (Integrated DNA technologies). Para evaluar la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) y elegir la adecuada para llevar a cabo la PCR cuantitativa (qPCR) se realizó un gradiente de temperaturas mediante la PCR de punto final. Se probaron cinco controles internos o “Housekeeping genes (HKG)”: *Gapdh*, *Hprt1*, *18s*, *CycA* y *Rplp0* y dos genes de interés: *Trh* y *Crh*. Las secuencias de los oligonucleótidos y las imágenes de los geles se encuentran en el Anexo 1. La T<sub>m</sub> usada para realizar la qPCR fue de 60°C. Para elegir el gen de referencia más estable para el experimento se hicieron las qPCRs de los cinco HKG en las muestras experimentales y se usó el software “BestKeeper” para elegir el adecuado. Este software se basa principalmente en dos parámetros: 1) La desviación estándar [ $\pm$ CP] debe ser <1 y 2) El coeficiente de correlación [r] debe ser lo mayor posible. Sólo el gen *18s* no cumplió estos parámetros (Anexo 2), así que para elegir entre los otros cuatro genes se tomó en cuenta el que mostrara mayor estabilidad entre los grupos experimentales y se encontró que el *CycA* y *Rplp0* tenían menor variación entre grupos, sin embargo, la *CycA* es un gen control que ya se

había usado antes en esta misma región en el laboratorio por la técnica de PCR de punto final por lo que se decidió usarlo como estándar interno.

### **5.13 Análisis estadístico**

Los resultados fueron calculados como % del promedio del grupo control a temperatura ambiente (C-TA) o control sedentario (C-SED). Los datos corresponden a dos experimentos independientes que fueron agrupados y normalizados respecto a su control y fueron analizados con ANOVA de medidas repetidas o ANOVA de efectos mixtos cuando se midió la misma variable a lo largo de los días en la misma muestra o ANOVA de dos vías seguida de la prueba de comparación múltiple de Tuckey o la prueba t de student para ver las diferencias entre los grupos. Los resultados se analizaron con el software GraphPad Prism 8.0.2.

## 6. Resultados

### 6.1 Efecto del aislamiento social durante la adolescencia

#### 6.1.1 Ganancia de peso y el consumo de alimento

Desde el inicio del aislamiento monitoreamos el consumo de alimento y la ganancia de peso y como era lo esperado, estos parámetros aumentaron gradualmente a lo largo del tiempo en ambos grupos. Sin embargo, no observamos alguna alteración por efecto del estrés crónico provocado por el aislamiento social en ninguna de estas variables.

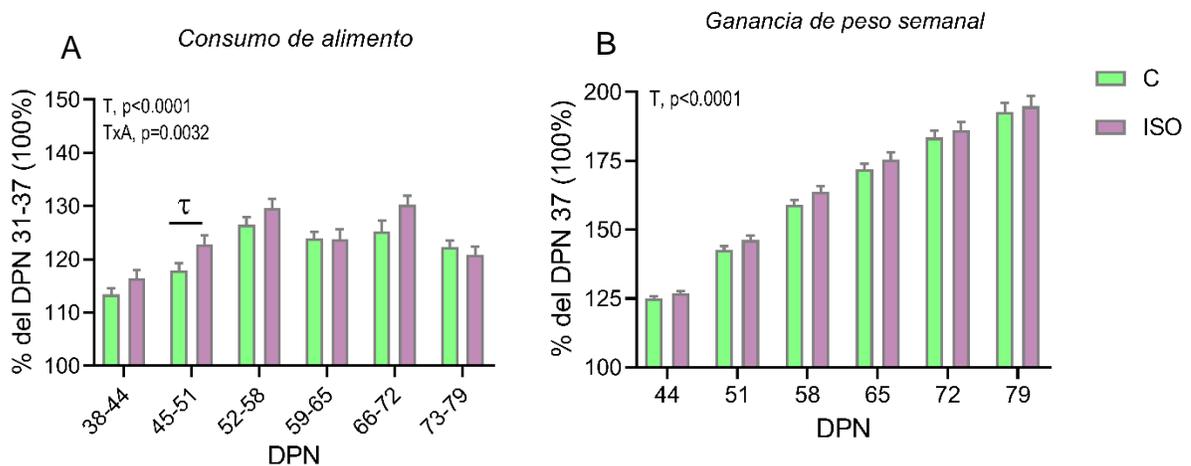


Figura 9. Efecto del aislamiento social en la adolescencia en el A) consumo de alimento y B) en la ganancia de peso semanal. Los datos se presentan como la media  $\pm$  ESM de dos experimentos independientes. T: efecto del tiempo en la prueba de ANOVA de medidas repetidas, TxA: interacción entre el efecto del tiempo y el aislamiento, DPN: día posnatal; C: Control; ISO: Aislado.  $\tau$ :  $p=0.023$  C vs ISO en el DPN 45-51 por prueba de t de student.

#### 6.1.2 Efecto del aislamiento en los niveles de corticosterona y en la prueba de hedonismo

En el DPN 45 y 60 (15 y 30 días de aislamiento, respectivamente) se tomó una alícuota de sangre de la cola para medir los niveles de corticosterona de ambos grupos. A los 15 días de aislamiento los niveles de corticosterona fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, a los 30 días de aislamiento, el grupo ISO presentó niveles de corticosterona mayores que el grupo C en ese día y respecto a sí mismo a los 15 días de aislamiento (Figura 10A). Este resultado confirma que después de un periodo de 30 días de aislamiento social durante la adolescencia, las ratas adultas tienen niveles más elevados de corticosterona, lo que se relaciona con un estado de estrés crónico.

También realizamos una prueba de hedonismo a las ratas justo antes de terminar el aislamiento social en el día posnatal 64, y otra el día posnatal 75, después de haberles aplicado una serie de estresores agudos en los días previos. En la primera prueba (Figura 10B) el consumo total de la solución dulce no mostró diferencias entre los grupos, sin embargo, en la segunda prueba, el grupo aislado consumió menos solución dulce que el control. Además, se encontró que el grupo control consumió más solución dulce en la segunda prueba comparada con la primera. El que no se hayan visto diferencias entre grupos en el consumo de la primera prueba, pero sí en la segunda sugiere que el estrés crónico causado por el aislamiento sumado con estrés intermitente pudo haber inducido un estado de anhedonia, característico de la depresión.

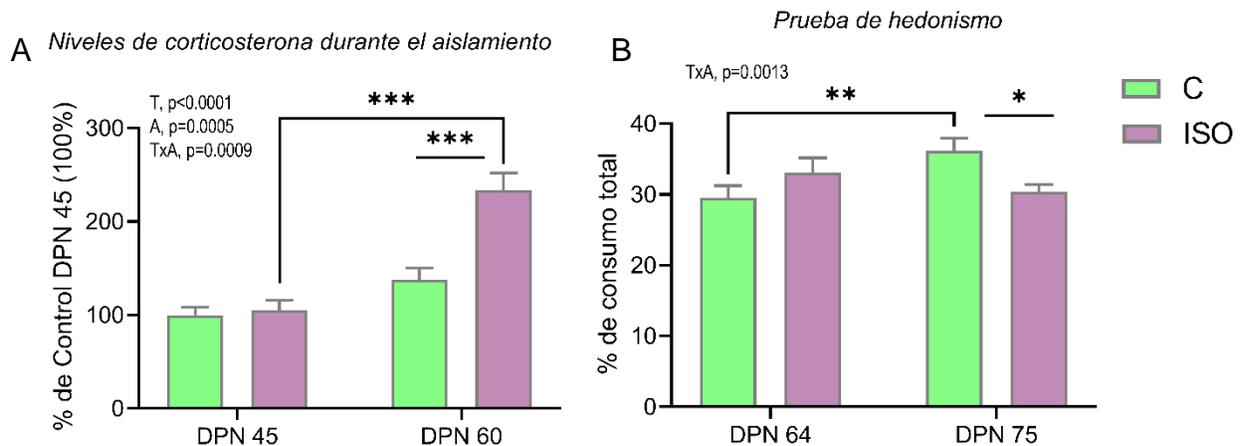


Figura 10. **Efecto del aislamiento en la adolescencia en los niveles de corticosterona y en la prueba de hedonismo.** 9A) Se midieron los niveles de CORT a los 15 y 30 días de aislamiento social. Los datos se presentan como % del C en el DPN 45 ± ESM de dos experimentos independientes. 9B) Porcentaje de consumo total de solución dulce en la primera prueba en el DPN 64 y en la segunda prueba en el DPN75. Los datos se presentan como la media ± ESM de dos experimentos independientes. El análisis estadístico fue hecho con ANOVA de medidas repetidas T: efecto del tiempo; A: efecto del aislamiento; TxA: interacción entre el efecto del tiempo y el aislamiento; C: Control; ISO: Aislado; DPN: día posnatal. \*\*\*p<0.0001, \*\*p<0.005, \*p<0.05

### 6.1.3 Efecto del aislamiento en la prueba de campo abierto (OFT)

Para evaluar los niveles de ansiedad y la locomoción después del aislamiento social y del estrés intermitente realizamos la prueba de campo abierto (OFT). Encontramos que los dos grupos tuvieron valores similares en las dos pruebas realizadas tanto en el tiempo como en la distancia recorrida en el centro y en la periferia de la arena. El análisis de ANOVA de medidas

repetidas muestra un efecto del tiempo que transcurrió entre una prueba y otra, en los parámetros de tiempo ( $p=0.0088$ ) y distancia ( $p=0.0070$ ) que las ratas recorrieron en la periferia, siendo mayor en la segunda prueba que en la primera, lo que sugiere una mayor locomoción y un comportamiento exploratorio en la segunda prueba, sin embargo, la prueba *post hoc* no mostró diferencias entre los grupos. El tiempo que las ratas controles pasaron en el centro fue mayor en la primera prueba, lo que indica que tenían una menor ansiedad que en la segunda. En conclusión, el aislamiento no afectó los niveles de ansiedad o locomoción puesto que el comportamiento de los grupos es similar en las dos pruebas realizadas.

	1° Prueba		2° Prueba	
	DPN 65-66		DPN 78-79	
	C	ISO	C	ISO
<b>Locomoción</b>				
<b>Tiempo periferia (s)</b>	274 ± 3.1	275 ± 2.9	279 ± 2.3	279 ± 2.6
<b>Distancia periferia (m)</b>	79 ± 1.9	77 ± 1.8	82 ± 2.6	81 ± 2.0
<b>Distancia total (m)</b>	88 ± 1.9	88 ± 2.1	89 ± 3.3	88 ± 1.9
<b>Ansiedad</b>				
<b>Tiempo centro (s)</b>	26 ± 3.1	21 ± 1.9	21 ± 2.3 <sup>&amp;</sup>	22 ± 2.3
<b>Distancia centro (m)</b>	9.1 ± 0.8	8.5 ± 0.7	8.0 ± 0.8	7.6 ± 0.8

Tabla 1. **Parámetros medidos en la prueba de campo abierto.** Los datos se presentan como la media ± ESM de dos experimentos independientes. El análisis estadístico fue hecho con ANOVA de medidas repetidas. C: Control; ISO: Aislado; <sup>&</sup>  $p=0.0350$  1° Prueba vs 2° Prueba.

## 6.2 Efecto del aislamiento social y el estrés intermitente en la respuesta del eje tiroideo al frío.

Para evaluar el efecto combinado del aislamiento social en la adolescencia y de los estresores agudos aplicados en la etapa adulta en la respuesta del eje tiroideo a un reto metabólico sometimos a una cohorte de 10 ratas de cada grupo a una hora de frío a 5°C. Como control,

el mismo número de ratas se aisló a temperatura ambiente (TA). Todos los animales se sacrificaron inmediatamente.

Se disecaron y pesaron tres depósitos de grasa: ovárica, retroperitoneal e interescapular. El peso del tejido adiposo blanco ovárico y total (Figura 11A) fue mayor en el grupo ISO comparado con el control, lo que muestra un efecto del aislamiento en la cantidad de tejido adiposo. En el caso de las glándulas adrenales (Figura 11B), se disecó y pesó tanto la izquierda como la derecha, pero no se encontraron diferencias entre los grupos.

La temperatura de las ratas (Figura 11C) que permanecieron a temperatura ambiente se mantuvo sin diferencias entre los grupos. En cambio, en las ratas que se sometieron a frío disminuyó la temperatura en el grupo ISO comparado con el C, demostrando una incapacidad de las ratas aisladas para mantener su temperatura corporal.

El frío incrementó los niveles de corticosterona (Figura 11D) del grupo control sometido a frío, lo que no sucedió con el aislado sometido a frío. Además, se evaluó la actividad del eje tiroideo (Figura 11E) midiendo los niveles de TSH y HT. En el caso de TSH el análisis de varianza reveló que el frío tuvo efecto en los niveles de TSH, pero en la prueba *post hoc* no se encontró significancia estadística entre grupos. Los niveles de hormonas tiroideas T4 y T3 no se alteraron por el efecto del frío o del aislamiento social.

## Respuesta a una hora de frío

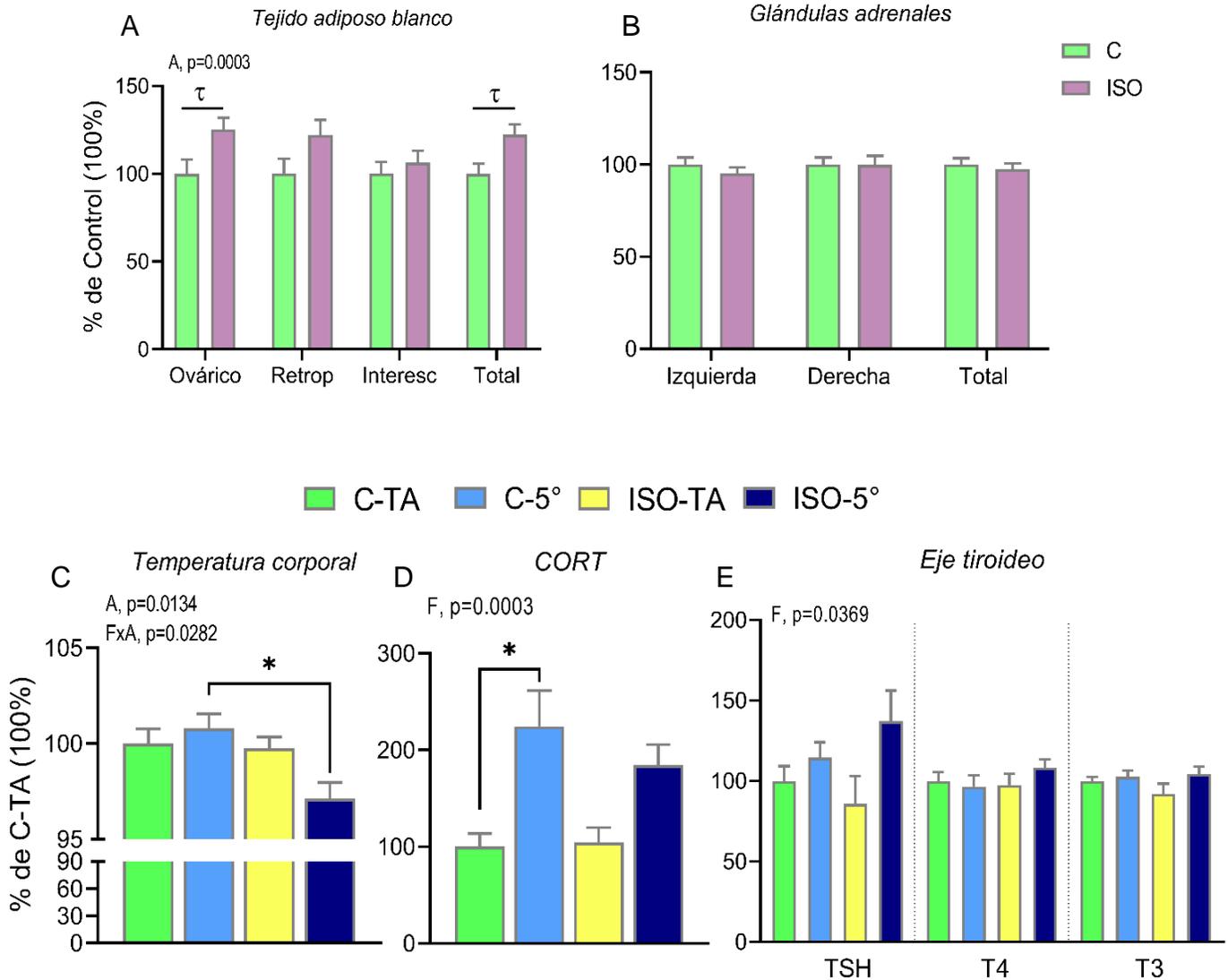


Figura 11. **Efecto del aislamiento en la respuesta a una hora de frío.** A) Peso del tejido adiposo blanco B) Peso de las glándulas adrenales C) Temperatura corporal después de 1 h de frío D) Niveles de corticosterona en suero E) Parámetros de la actividad del eje tiroideo: TSH, T4 y T3 en suero. En el caso del peso de los tejidos los datos se presentan como la media  $\pm$  ESM del peso relativo (gramos de tejido adiposo/kg de peso corporal) normalizados respecto al control de dos experimentos independientes. El análisis estadístico fue hecho con ANOVA de efectos mixtos y las comparaciones entre grupos con la prueba de Tuckey y con prueba de t de student. Los datos de temperatura, CORT, TSH y HT están normalizados con respecto al C-TA y se presentan como la media  $\pm$  ESM de dos experimentos independientes. El análisis estadístico fue hecho con ANOVA de dos vías. C: Control; ISO: Aislado; C-TA: Control a temperatura ambiente; C-5°: control a 5° C; ISO-TA: aislado a temperatura ambiente; ISO-5°: aislado a 5°C; CORT: corticosterona; TSH: tiotropina; T4: tiroxina; T3: triyodotironina; A: efecto del aislamiento; F: efecto del frío; FxA: interacción entre el efecto del frío y el aislamiento. Grasa ovárica  $\tau$ :  $p=0.022$ , grasa total  $\tau$ :  $p=0.0095$ , \* $p<0.05$ .

### 6.2.1 Respuesta en el tejido adiposo pardo y en el tejido adiposo blanco

Se evaluó la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo midiendo la expresión de genes que se regulan por el frío y por hormonas tiroideas (Figura 12A) y además se evaluó la expresión genética en el tejido adiposo blanco (Figura 12B) ya que provee sustratos para la termogénesis y también es blanco de las hormonas tiroideas. En el TAP el frío estimuló la expresión de *Ucp1* y *Dio2* en el grupo aislado sometido a frío y *Pgc1α* se expresó a la alta en los dos grupos sometidos a frío. Tanto *Dio2*, el receptor *Adrb3* como el receptor de glucocorticoides *Gr* están expresados a la baja en el grupo ISO-TA comparado con el C-TA, siendo este efecto propio del aislamiento. En el TAB, el frío estimuló la expresión de *Adrb3* en el grupo C sometido a frío y de *Pparγ* en el grupo ISO-5°. En cambio, el aislamiento inhibió la expresión de *Dio2* y del receptor *Adrb3* en los grupos ISO, tanto en el grupo que permaneció a TA como el que fue sometido a frío.

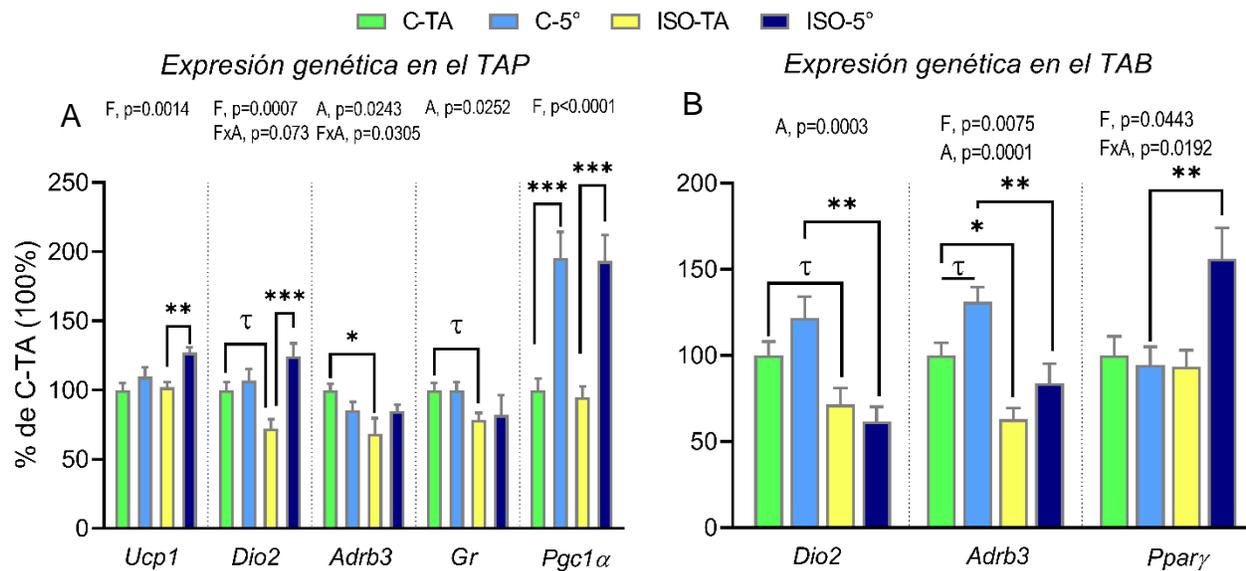


Figura 12. Efecto del aislamiento y del frío en los niveles expresión genética en el A) tejido adiposo pardo y en el B) tejido adiposo blanco. Los datos están normalizados con respecto al C-TA y se presentan como la media  $\pm$  ESM de dos experimentos independientes para el caso de la expresión en el TAP y de un experimento en el caso del TAB. El análisis estadístico fue hecho con ANOVA de dos vías y para las comparaciones entre grupos se utilizó la prueba *post hoc* de Tuckey o la prueba t de student. C-TA: Control a temperatura ambiente; C-5°: control a 5° C; ISO-TA: aislado a temperatura ambiente; ISO-5°C: aislado a 5°C; *Ucp1*: Proteína desacopladora 1; *Dio2*: Desyodasa 2; *Adrb3*: Receptor adrenérgico beta 3; *Gr*: receptor a glucocorticoides; *Pgc1α*: proteína coactivadora 1α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas; *Pparγ*: receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas; F: efecto del frío; A: efecto del aislamiento; FxA: Interacción entre el frío y el aislamiento. En TAP: *Dio2*  $\tau$ :  $p=0.0064$ , *Gr*  $\tau$ :  $p=0.0082$ . En TAB: *Dio2*  $\tau$ :  $p=0.05$ , *Adrb3*:  $\tau$ :  $p=0.02$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.005$ , \*\*\* $p<0.0001$ .

## **6.3 Efecto del aislamiento social en la adolescencia en la respuesta del eje tiroideo al ejercicio voluntario**

### *6.3.1 Consumo de alimento, ganancia de peso y ejercicio realizado*

Durante la fase de ejercicio voluntario, el consumo de alimento se monitoreó dos veces al día (por la mañana y por la tarde) mientras que el peso de los animales se registró semanalmente. La figura 13A muestra el consumo de alimento promedio semanal y se observa un efecto del tiempo en el consumo, siendo este mayor conforme pasan los días, aunque no se observan diferencias entre grupos, ya que a los grupos sedentarios se les dio la cantidad de alimento que comía su grupo ejercitado. La ganancia de peso después de 26 noches de ejercicio se muestra en la figura 13C siendo que, a pesar de que no se observan diferencias entre grupos, el ejercicio sí tuvo efecto en la ganancia de peso.

Durante la primera semana de ejercicio (Figura 13B), los dos grupos ejercitados corrieron una distancia similar pero a partir de la segunda semana, el grupo control corrió más que el aislado y desde el día 15, aumentó significativamente la distancia y esta diferencia permaneció hasta el último día de ejercicio. El tiempo tuvo efecto en la distancia que las ratas corrieron, siendo mayor conforme pasaban los días, pero el aislamiento social tuvo efecto en la cantidad de ejercicio realizada, pues las ratas aisladas corrieron menos que las controles.

### *6.3.2 Efecto del aislamiento y del ejercicio en el peso de los tejidos*

El ejercicio provocó la pérdida de grasa tanto en el grupo control como en el aislado. El tejido adiposo ovárico y total (Figura 13D) disminuyó en los grupos ejercitados, pero sólo el grupo C-EV disminuyó sus depósitos de grasa retroperitoneal, mientras que la grasa interescapular se mantuvo sin diferencias entre grupos. El peso del músculo esquelético (Figura 13E) disminuyó por efecto del aislamiento tanto en el grupo sedentario como ejercitado, las diferencias entre grupos se encontraron al comparar por prueba de T pareada el C-SED contra el ISO-SED. El peso de las glándulas adrenales (Figura 13F) aumentó por efecto del ejercicio, pero no se alcanzó la significancia estadística entre grupos en la prueba de comparaciones múltiples.

## Respuesta al ejercicio

■ C-SED ■ C-EV ■ ISO-SED ■ ISO-EV

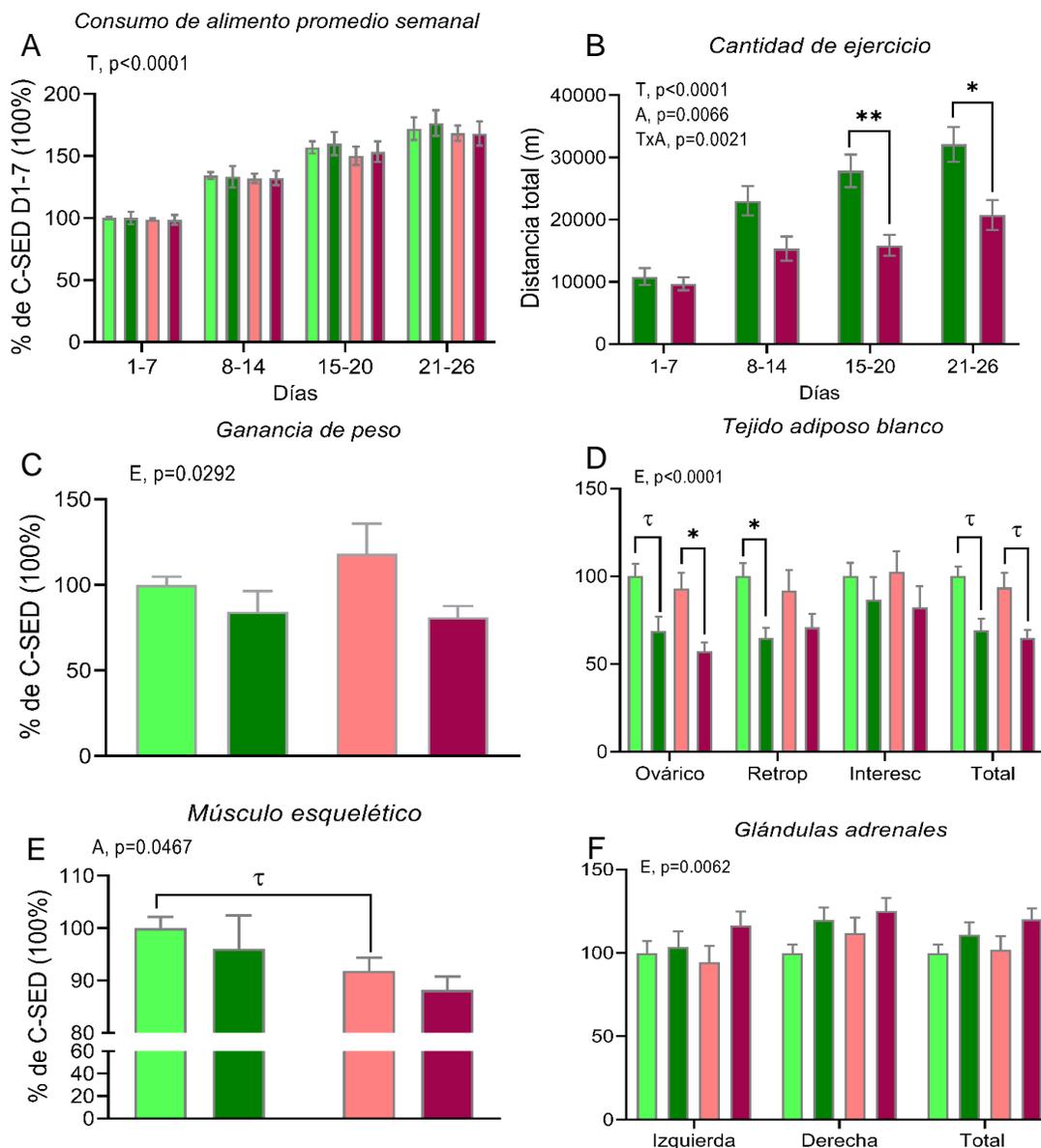


Figura 13. Efecto del aislamiento y del ejercicio voluntario en el A) consumo de alimento B) el ejercicio realizado C) la ganancia de peso, D) el peso del tejido adiposo blanco, E) el peso del músculo esquelético y F) el peso de las glándulas adrenales. Los datos se presentan como la media  $\pm$  ESM de dos experimentos independientes. Los datos del peso de los tejidos se presentan como la media  $\pm$  ESM del peso relativo (gramos de tejido/kg de peso corporal) y normalizados respecto al C-SED de dos experimentos independientes. El análisis estadístico fue hecho con ANOVA de medidas repetidas en el consumo de alimento y en la cantidad de ejercicio, por ANOVA de dos vías en los demás parámetros y para la comparación entre grupos con prueba de Tuckey y por prueba t de student. T: efecto del tiempo; A: efecto del aislamiento; TxA: interacción entre el efecto del tiempo y del aislamiento; E: efecto del ejercicio. DPN: día posnatal; C-SED: Control sedentario; C-EV: Control ejercitado; ISO-SED: Aislado sedentario; ISO-EV: Aislado ejercitado. Grasa ovárica  $\tau$ : p=0.0091, grasa retroperitoneal  $\tau$ : p=0.0012, grasa total C-SED vs C-EV:  $\tau$ : p=0.0018, ISO-SED vs ISO-EV:  $\tau$ : p=0.0071, músculo  $\tau$ : p=0.0424, \*p<0.05, \*\*p<0.005.

### 6.3.3 Efecto del aislamiento y el ejercicio en la actividad del eje adrenal

Para evaluar la actividad del eje adrenal se midió la expresión de *Crh* en el NPV y se encontró que aumentó en el grupo C-EV comparado con el C-SED y con el ISO-EV, y en el grupo ISO-SED respecto al C-SED. Este efecto se debe al ejercicio, pero también hay una interacción entre el ejercicio y el aislamiento. Además, se midieron los niveles de corticosterona en suero, pero no se hallaron diferencias entre grupos ni se encontró efecto del ejercicio o el aislamiento en la concentración de esta hormona.

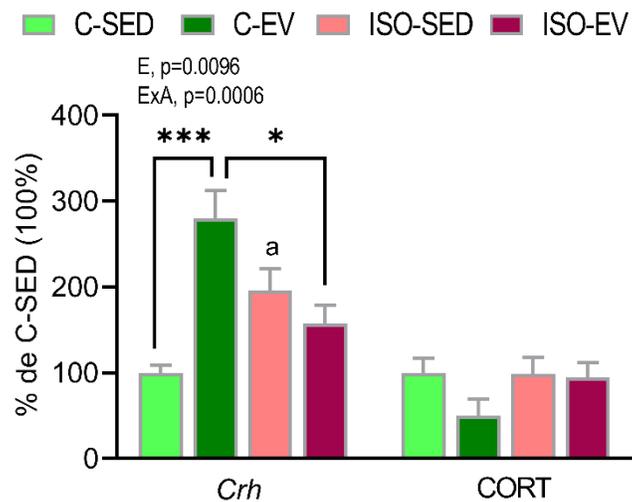


Figura 14. **Efecto del aislamiento y del ejercicio voluntario en parámetros de la actividad del eje adrenal.** Los datos están normalizados respecto al C-SED y se presentan como la media  $\pm$  ESM de dos experimentos independientes en el caso de CORT y de un experimento en el caso de *Crh*. El análisis estadístico fue hecho con ANOVA de dos vías. C-SED: Control sedentario; C-EV: Control ejercitado; ISO-SED: Aislado sedentario; ISO-EV: Aislado ejercitado; *Crh*: hormona liberadora de corticotropina; CORT: corticosterona; E: efecto del ejercicio; ExA: interacción entre el ejercicio y el aislamiento. \*\*\* $p < 0.0001$ , \* $p < 0.05$ , <sup>a</sup>:vs C-SED  $p = 0.0491$ .

### 6.3.4 Efecto del aislamiento social y el ejercicio en la actividad del eje tiroideo

Para evaluar la actividad del eje tiroideo medimos los niveles de expresión de *Trh* en el núcleo paraventricular del hipotálamo y los niveles de tirotropina y hormonas tiroideas en suero. *Trh* se expresó de manera similar en todos los grupos, sin encontrarse efecto del aislamiento o el ejercicio. Los niveles de TSH en los grupos aislados tendieron a aumentar, con un efecto del aislamiento en los niveles de esta hormona, la diferencia máxima se presenta entre el grupo ISO-SED y el C-SED, que se comprueba con la prueba de T. En T4 no hubo efecto del ejercicio o del aislamiento ni diferencias entre grupos; en T3, la forma activa de las hormonas tiroideas, hubo un incremento de sus niveles por efecto del ejercicio: el grupo C-EV tiene niveles altos de T3 comparado con el C-SED, pero el ISO-EV no logró aumentar sus niveles como el grupo C-EV por lo que el aislamiento social inhibió el aumento esperado de T3 con el ejercicio en el grupo ISO-EV.

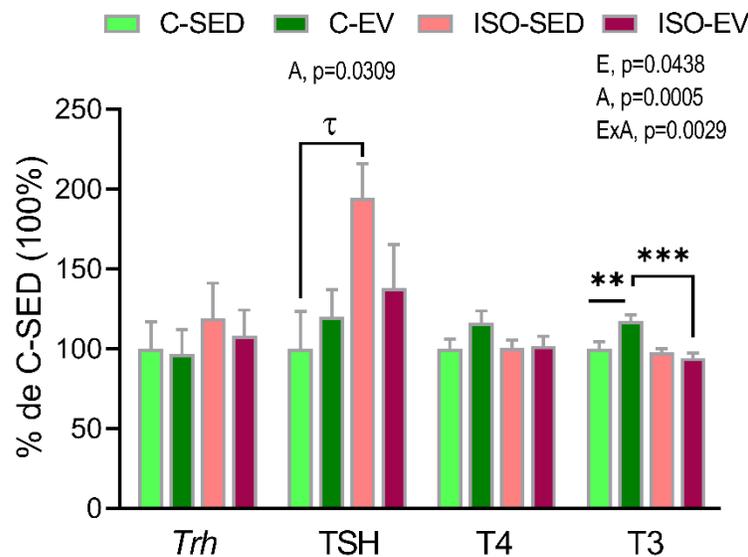


Figura 15. **Efecto del aislamiento y del ejercicio voluntario en la actividad del eje tiroideo.** Los datos están normalizados respecto al C-SED y se presentan como la media  $\pm$  ESM de dos experimentos independientes excepto en *Trh* y TSH que corresponde sólo a 1 experimento. El análisis estadístico fue hecho con ANOVA de dos vías y las comparaciones entre grupos con prueba de comparaciones múltiples de Tuckey y con la prueba de t de student. C-SED: Control sedentario; C-EV: Control ejercitado; ISO-SED: Aislado sedentario; ISO-EV: Aislado ejercitado; *Trh*: hormona liberadora de tirotropina, TSH: tirotropina; T4: Tiroxina; T3: triyodotironina; A: efecto del aislamiento; E: efecto del ejercicio; ExA: interacción entre el ejercicio y el aislamiento. TSH:  $\tau$ :  $p=0.0313$  T3:  $***p<0.0001$ ,  $**p<0.005$ .

### 6.3.5 Efecto del aislamiento y el ejercicio en la expresión genética en el tejido adiposo pardo y blanco

El tejido adiposo pardo es blanco de hormonas tiroideas y contribuye al gasto energético, por lo que se midió la expresión de genes involucrados en estas funciones (Figura15A). La expresión de la *Ucp1* se mantuvo sin alteraciones. El ejercicio incrementó la expresión de *Dio2*, de *Adrb3* y de *Gr* en el grupo C-EV pero esto no sucedió en el ISO-EV. En cambio, el aislamiento inhibió la expresión de *Gr* en el grupo ISO-EV comparado con el C-EV y de *Pgc1α*, aunque en este último no hubo diferencias entre grupos. También se midió la expresión de algunos genes que se regulan durante el ejercicio en el tejido adiposo blanco subcutáneo (Figura16B) y se encontró que, como en el tejido adiposo pardo, el grupo C-EV incrementó la expresión de *Dio2* y del receptor *Adrb3* por efecto del ejercicio, pero en *Pparγ* el aislamiento tuvo un efecto en la sobreexpresión de este gen, encontrándose una diferencia entre el grupo ISO-EV comparado con el C-EV. En la figura 17 se muestra un esquema que resume los efectos del aislamiento observados en el eje tiroideo y adrenal, así como en el tejido adiposo pardo y blanco bajo las condiciones de ejercicio voluntario y frío.

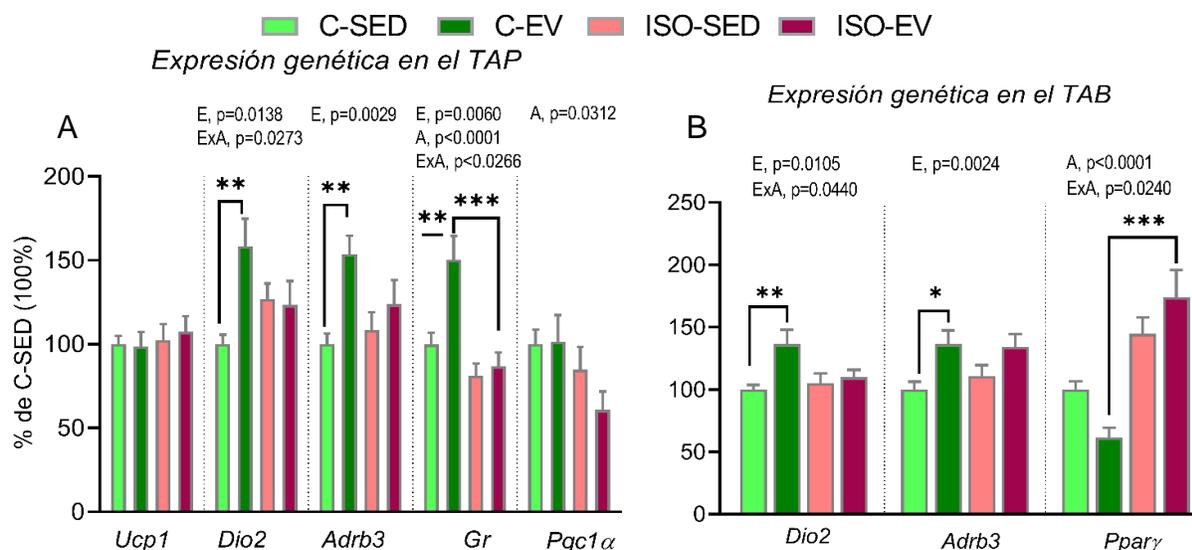


Figura 16. Efecto del aislamiento y del ejercicio voluntario en la expresión genética en el A) tejido adiposo pardo y en B) tejido adiposo blanco. Los datos están normalizados con respecto al C-SED y se presentan como la media  $\pm$  ESM de dos experimentos independientes. El análisis estadístico fue hecho con ANOVA de dos vías. C-SED: Control sedentario; C-EV: control ejercitado; ISO-SED: aislado sedentario; ISO-EV: aislado ejercitado; *Ucp1*: Proteína desacopladora 1; *Dio2*: Desyodasa 2; *Adrb3*: Receptor adrenérgico beta 3; *Gr*: receptor a glucocorticoides; *Pgc1α*: proteína coactivadora 1α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas; *Pparγ*: receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas; E: efecto del ejercicio; A: efecto del aislamiento; ExA: Interacción entre el ejercicio y el aislamiento. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

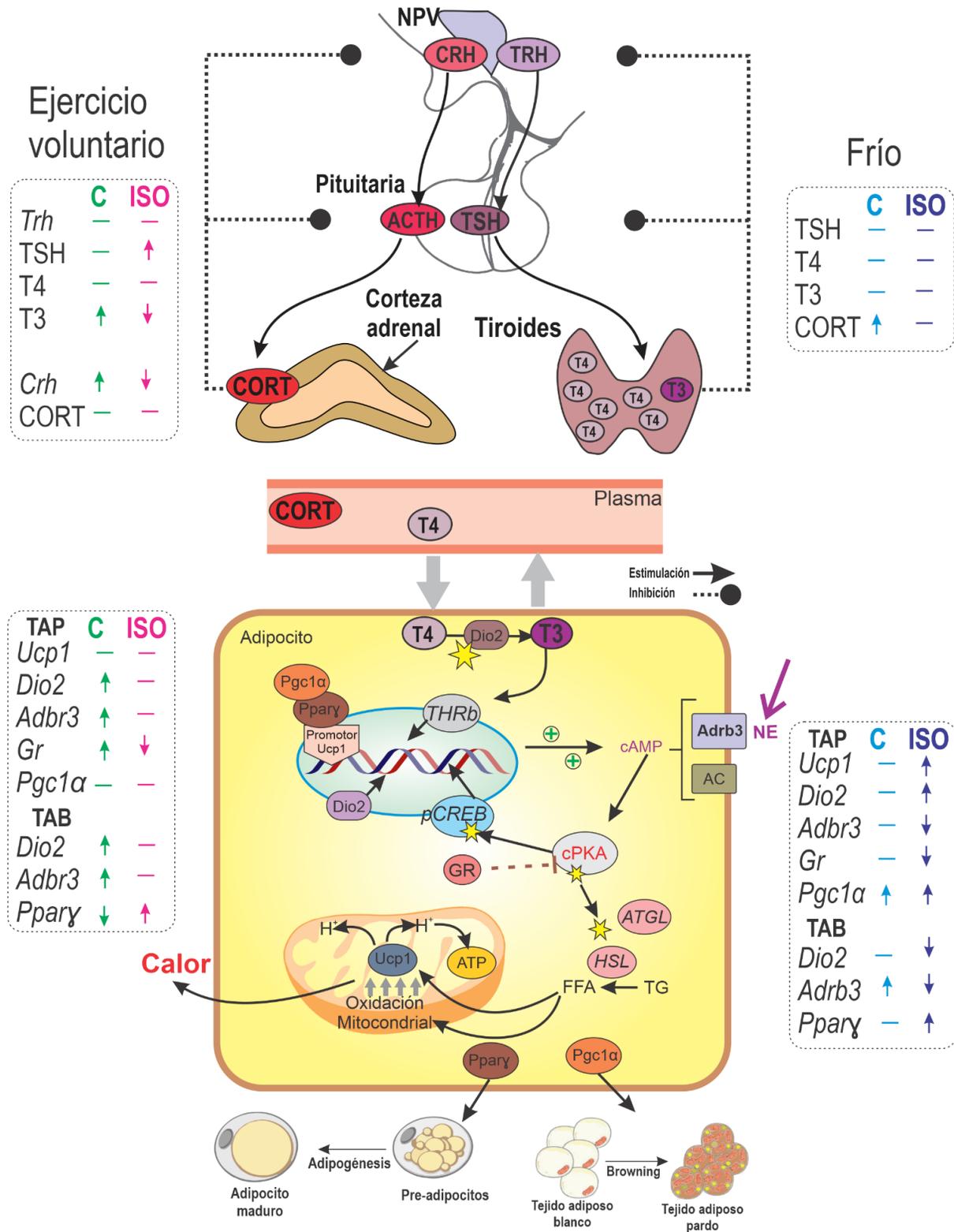


Figura 17. Esquema de resumen de los cambios observados en el eje HPT, HPA y órganos periféricos inducidos por el ejercicio voluntario o por una hora de frío. ACTH, adrenocorticotropina; Adrb3: Receptor adrenérgico beta 3; C: grupo control; CORT, corticosterona; CRH, hormona liberadora de corticotropina; D2, desyodasa 2; GR, receptor de glucocorticoides; ISO: Grupo aislado; NE, norepinefrina; NPV, núcleo paraventricular del hipotálamo; Pgc1α: proteína coactivadora 1α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas; Pparγ: receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas; T3, triyodotironina; T4, Tiroxina; TRH, hormona liberadora de tirotropina; TSH, tirotropina; TAB; tejido adiposo blanco; TAP, tejido adiposo pardo; Ucp1: Proteína desacopladora 1.

## 7. Discusión

El objetivo del presente proyecto fue estudiar el efecto del estrés crónico durante la adolescencia de ratas hembra en la respuesta del eje tiroideo al ejercicio voluntario en etapa adulta, y sus consecuencias en la homeostasis energética. Usando como modelo de estrés crónico el paradigma de aislamiento social en la adolescencia, encontramos las que alteraciones reportadas<sup>52,64</sup> perduran hasta la vida adulta de las ratas: una hiperreactividad del eje HPA, con mayores niveles basales de corticosterona después de 30 días de aislamiento, y un comportamiento tipo depresivo observado al aplicar la prueba de hedonismo<sup>74</sup>. Las ratas aisladas y posteriormente sometidas a estresores agudos por varios días tuvieron menor consumo de solución dulce que refleja un comportamiento de anhedonia, característico de un estado depresivo.

En este estudio, el aislamiento social no afectó el consumo de alimento ni la ganancia de peso corporal. Así mismo, no se encontraron diferencias en los niveles de ansiedad en la prueba de campo abierto (OFT), ni en los niveles de corticosterona sérica en el DPN 45. En cambio, al DPN 60, cuatro días antes del término del aislamiento, la corticosterona sérica aumentó. Nuestros datos concuerdan parcialmente con reportes sobre aislamiento social en ratas hembras desde el DPN 28 al 53, en los que se reporta mayor inmovilidad en la prueba de nado de Porsolt, lo que se asocia con un comportamiento depresivo, sin encontrar cambios en la ingesta de alimento ni mayores niveles de ansiedad en la prueba de laberinto en cruz elevado (EPM)<sup>1</sup> pero si un comportamiento de atracción cuando se les ofrecieron galletas durante una hora<sup>68</sup>. Recientemente se reportó que ratas macho y hembras, aislados desde el destete (DPN 21) hasta el DPN 49 y, posteriormente re-socializados, desarrollan un fenotipo anhedónico en la edad adulta que se comprueba con la prueba de preferencia de sacarosa<sup>75</sup>. La diferencia en los niveles de corticosterona y el comportamiento depresivo confirman que el aislamiento social causó estrés crónico en las hembras con efectos que perduraron en la vida adulta.

### *Respuesta al frío agudo.*

En el proyecto realizado en la tesis de licenciatura<sup>59</sup> (anexo 4) sometimos a ratas macho adultas a 15 días de estrés crónico homotípico (restricción de movimiento rRes) o heterotípico (estrés crónico variable CVS) y posteriormente a una hora de frío a 5°C. Los resultados

mostraron que independientemente del tipo de estrés que se aplique, se altera la regulación de la temperatura, la respuesta del eje HPT y la expresión de genes importantes para la respuesta termogénica en el tejido adiposo pardo a una hora de frío.

Sabiendo que el estrés crónico inhibe la respuesta del eje HPT al frío decidimos someter a una cohorte de 10 ratas por grupo a una hora de frío a 5°C y sacrificar inmediatamente. Encontramos que las ratas aisladas acumularon más tejido adiposo blanco por efecto del aislamiento y una tendencia a no regular su temperatura corporal, y, ni las aisladas ni las controles activaron el eje HPT en respuesta al frío. En contraste con machos de las mismas camadas, ha sido difícil mostrar activación del eje por frío en ratas hembras vírgenes, en parte por la alta dispersión observada en las hembras<sup>76</sup>.

La respuesta atenuada del eje HPT en hembras ante el estímulo de frío en hembras se puede explicar por el efecto de estrógenos que afectan la respuesta central y periférica involucrada en la termorregulación<sup>77</sup> e incrementan la tolerancia al frío<sup>78</sup> como se pudo comprobar en ratas ovariectomizadas y con inyecciones de reemplazo de estradiol (OVX-E), estas no incrementan expresión de *Trh* ni la concentración sérica de TSH y T3 después de una hora de frío<sup>5</sup>. En nuestro estudio, el 70% de ratas C y el 89% de ISO sometidas a frío se encontraban en la fase de proestro (el mayor nivel de estrógenos) (Anexo 3), lo que explica la tolerancia al frío observada en las ratas control. La mayoría de las ratas ISO también se encontraban en la fase de proestro pero mostraron una tendencia a disminuir su temperatura corporal que pudiera deberse a efectos del estrés por aislamiento.

Las ratas aisladas tuvieron una menor liberación de corticosterona por exposición al frío, comparadas a controles, lo que sugeriría una hiporreactividad del eje HPA observado en hembras deprimidas<sup>79</sup>. Sorprendentemente, la exposición al frío estimuló la expresión de *Dio2* y de *Ucp1* en tejido adiposo pardo de las ratas aisladas y no en los controles, respuesta opuesta a la que se había observado en machos control o estresados<sup>59</sup>. Sin embargo, no se puede relacionar con un efecto de estimulación diferencial del SNS ya que no se observan diferencias en la expresión del receptor adrenérgico. Los estrógenos estimulan la expresión de *Pgc1 $\alpha$* <sup>39</sup>, un coactivador transcripcional que coordina la biogénesis mitocondrial y la termogénesis adaptativa en TAP<sup>80</sup>, cómo sucedió en los dos grupos sometidos a frío.

Es difícil explicar las diferencias encontradas entre sexos en la respuesta al frío ya que las hembras presentan diferencias en respuesta a estrés, en la disposición y metabolismo de grasas y en la capacidad termogénica.

El tejido adiposo blanco es la reserva más importante de sustratos energéticos y provee al TAP de energía para termogénesis. La producción exagerada de glucocorticoides favorece un balance energético positivo<sup>81</sup> y por consecuencia el desarrollo de obesidad y la acumulación de tejido adiposo visceral<sup>82</sup>. En cambio otras hormonas que se liberan ante el estrés como las catecolaminas afectan el metabolismo en una dirección opuesta en la que lo hacen los glucocorticoides: promueven la lipólisis en los adipocitos a través de la activación de los receptores adrenérgicos ( $\beta$ -AR), que en el TAP están involucrados directamente con un incremento en la termogénesis<sup>83</sup>. Esto coincide con los altos niveles de tejido adiposo blanco que acumularon las ratas aisladas, con la baja expresión del receptor adrenérgico  $\beta$ 3 en el tejido adiposo pardo y blanco y con la alta expresión de *Ppar $\gamma$*  (que participa en lipogénesis), en el TAB ya que este es un regulador de la adipogénesis y la diferenciación de adipocitos<sup>84</sup> lo que concuerda con una actividad lipogénica debido al estrés crónico al que fue sometido este grupo.

#### *Respuesta al ejercicio voluntario.*

El ejercicio voluntario es un modelo de demanda energética crónica, apropiado para estudiar el efecto del estrés crónico en la respuesta del eje HPT, sin causar un estrés adicional a los animales, como sucede en otros modelos como el de ejercicio o nado forzado<sup>85,86</sup>. Debido a que el ejercicio disminuye la ingesta de alimento, usamos un grupo sedentario pareado al que se le daba la cantidad de alimento que consumía el grupo ejercitado para poder distinguir la contribución al estrés y la disminución de la ingesta energética de los datos de ejercicio como se había utilizado previamente<sup>34,87</sup>.

En la fase de ejercicio voluntario, los resultados más interesantes que encontramos fueron en la cantidad de ejercicio realizada, puesto que, mientras que el grupo control aumentó la cantidad de ejercicio proporcional al tiempo, en el grupo aislado la cantidad de ejercicio se estabilizó a partir de la segunda semana y ya no incrementó con el tiempo como en las ratas controles. Este resultado contrasta con los resultados obtenidos por Parra-Montes de Oca, M., et al, 2019 debido a que, a diferencia de las dos semanas de ejercicio a las que sometieron a

los animales, nosotros extendimos el tiempo de ejercicio a casi cuatro semanas, por lo que nos fue posible observar este estado de falta de motivación y que coincide con el comportamiento depresivo que observamos previamente en la prueba de atracón. En coincidencia con el estudio de Eller, C., et al, 2020 en el que sometieron a ratones macho a estrés neonatal usando la separación materna desde el DPN 1 al 21 y posteriormente a ejercicio voluntario hasta las 27 semanas de edad y encontraron que los grupos con separación materna redujeron la distancia recorrida, lo que puede deberse a la interacción del sistema dopaminérgico con el eje HPA y la sobreproducción de glucocorticoides y de receptores de glucocorticoides que se encuentran en áreas del cerebro involucradas con el procesamiento de recompensas<sup>88</sup>.

A pesar de que no encontramos diferencias entre grupos ni en el consumo de alimento ni en la ganancia de peso, observamos que los dos grupos ejercitados disminuyeron la cantidad de tejido adiposo blanco ovárico y total, pero que el grupo aislado no disminuyó sus depósitos de grasa retroperitoneal como el control. Este tipo de grasa es la que expresa el receptor de glucocorticoides que, en respuesta a un aumento de cortisona, incrementa la lipogénesis<sup>89</sup> y se asocia con estados patológicos como enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, dislipidemia y diabetes tipo II<sup>90,91</sup>. El peso del músculo esquelético disminuyó por efecto del aislamiento, siendo menor en el grupo aislado sedentario comparado con el control, lo que puede indicar que se está iniciando un proceso de degradación y atrofia del músculo debido a los efectos catabólicos de la corticosterona<sup>92</sup>.

Evaluamos la actividad del eje adrenal por medio del peso de las glándulas adrenales y la expresión de *Crh* en NPV y corticosterona en suero, encontrando que el ejercicio provocó un aumento en el peso de las glándulas adrenales, resultado que indica un estado de estrés crónico y coincide con el estudio de Droste, S., 2007 en el que ratas macho con acceso a rueda de ejercicio por 4 semanas presentan un incremento del peso relativo de las glándulas adrenales, sin encontrar cambios en CRH, AVP ni en los niveles de Gr en la región parvocelular del NPV<sup>93</sup>; estos autores hipotetizan que este incremento en el peso de las adrenales puede deberse a un aumento de la capacidad simpática de estas glándulas.

Nosotros encontramos un incremento de *Crh* en el NPV del grupo control ejercitado que podría deberse a un incremento transitorio de la actividad del eje HPA debido al ejercicio realizado la noche anterior al sacrificio y además, que el grupo control mantenía en ascenso la cantidad de

ejercicio que hacía, como sucede en protocolos de ejercicio de entrenamiento como el nado con peso añadido, que tiene el propósito de mantener una intensidad de ejercicio constante durante todo el periodo de entrenamiento, en dónde también encuentran un incremento de los niveles de *Crh* en el NPV a las cuatro semanas de entrenamiento pero que a regresan a niveles similares al del control a las seis semanas<sup>94</sup>.

La actividad del eje tiroideo se alteró por efecto del aislamiento y del ejercicio. En el grupo control ejercitado incrementaron los niveles de T3 circulante, sin cambios en *Trh* o TSH, por lo que T3 puede estar ejerciendo un efecto de retroalimentación negativa en *Trh*, razón por la cual no se observaron incrementos en esta hormona. En el caso de los grupos aislados se observa un incremento en los niveles de TSH y un decremento de T3, sin cambios en *Trh* ni T4. Tener niveles basales de altos de TSH y niveles normales de hormonas tiroideas sugieren una condición de hipotiroidismo subclínico, lo que concuerda con la incapacidad de regular la temperatura corporal que se observó en las ratas ISO sometidas a frío o su fatiga a incrementar su cantidad de ejercicio<sup>84</sup>.

El ejercicio provocó adaptaciones metabólicas en el tejido adiposo que no necesariamente se reflejaron con una pérdida de peso<sup>91</sup>. En el tejido adiposo pardo y blanco encontramos un incremento en la expresión de *Dio2* y del receptor *Adrb3* en el grupo control ejercitado, que reflejan una activación del sistema nervioso simpático con una mayor termogénesis en el TAP así como un incremento de vías involucradas en la oxidación de ácidos grasos en el TAB<sup>95</sup>. En contraste, en el grupo aislado ejercitado no se observaron ninguno de estos efectos y en cambio, se estimuló la expresión de *Pparγ* en el tejido adiposo blanco, indicando nuevamente una mayor proliferación y diferenciación de adipocitos<sup>84</sup>.

## 8. Conclusiones

El estrés crónico afecta la calidad de vida del individuo y conduce a patologías emocionales, mentales y metabólicas. Cuando sucede en etapas críticas del desarrollo produce efectos que persisten hasta la edad adulta, entre ellos, una respuesta deficiente del eje tiroideo ante demandas energéticas que puede generar a la larga en el individuo una mayor ganancia de peso y eventualmente obesidad.

La actividad del eje tiroideo se regula de forma multifactorial: por impulsos neuronales que estimulan o inhiben las neuronas TRHérgicas hipofisiotróficas en el hipotálamo, por la enzima que degrada al TRH (PPII) en la eminencia media, por el TRH en la pituitaria que estimula la liberación de TSH y por las desyodasas que convierten T4 a T3 en los órganos blanco. Por esta razón medir únicamente los niveles de HT y TSH en suero no refleja fielmente la actividad del eje. Para poder concluir si el aislamiento en la adolescencia tuvo efectos a largo plazo en el eje tiroideo, es necesario incluir los parámetros arriba mencionados y las respuestas de los órganos blanco.

Los resultados obtenidos demuestran que el aislamiento en la adolescencia modificó la actividad del eje tiroideo en la rata adulta. Las disfunciones generadas por el aislamiento abarcan desde el estado emocional de los animales con comportamientos que reflejan un estado depresivo, hasta alteraciones metabólicas como acumulación del tejido adiposo y una incapacidad de controlar la temperatura corporal. A pesar de que el ejercicio produce efectos benéficos en el organismo, no se pudieron revertir los efectos adversos del aislamiento. Por el contrario, las ratas aisladas se encontraban en un estado de balance energético negativo lo que les provocó una menor actividad física que pudo haber generado una condición de hipotiroidismo subclínico. Sumado con la falta de respuesta del tejido adiposo pardo y blanco al ejercicio, podemos concluir que el estrés crónico en una etapa vulnerable del desarrollo cómo es la adolescencia provocó alteraciones que perduraron hasta la vida adulta de las ratas hembra.

## 9. Perspectivas

- ✓ Analizar la expresión genética en el músculo esquelético, ya que es un órgano blanco de hormonas tiroideas y además el ejercicio induce adaptaciones metabólicas relacionadas con el metabolismo mitocondrial, reduce las concentraciones de lípidos circulantes e incrementa la tolerancia a la glucosa, entre otras.
- ✓ Procesar y analizar en el hipotálamo mediobasal la expresión del POMC, que origina al  $\alpha$ MSH y estimula la expresión de *Trh*; además, la expresión de la enzima que degrada al TRH (TRHDE) y la *Dio2* que convierte T4 a T3, expresada en tanicitos de la eminencia media.
- ✓ Analizar la expresión de moléculas involucradas con la inflamación en el tejido adiposo debido al estrés crónico.

## 10. Bibliografía

1. Dalla, C., Pitychoutis, P. M., Kokras, N. & Papadopoulou-Daifoti, Z. Sex Differences in Response to Stress and Expression of Depressive-Like Behaviours in the Rat. in *Current Topics in Behavioral Neurosciences* **8**, 97–118 (2011).
2. Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R. & Heim, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 434–445 (2009).
3. Herman, J. P. *et al.* Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology. Compr. Physiol.* **6**, 603–621 (2016).
4. Myers, B., McKlveen, J. M. & Herman, J. P. Neural regulation of the stress response: The many faces of feedback. *Cell. Mol. Neurobiol.* **32**, 683–694 (2012).
5. Armario, A. Studying Chronic Stress in Animals : Purposes , Models and Consequences. in *Neuroendocrinology of Stress* 143–167 (2015).
6. Ulrich-Lai, Y. M. & Herman, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 397–409 (2009).
7. Oakley, R. H. & Cidlowski, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 1033–1044 (2013).
8. de Kloet, E. R., Joëls, M. & Holsboer, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 463–475 (2005).
9. Herman, J. P. *et al.* Regulation of the hypothalamic-pituitary- adrenocortical stress response. *Compr. Physiol.* **6**, 603–621 (2016).
10. Herman, J. P. & Tasker, J. G. Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **7**, 137 (2016).
11. Rabasa, C. & Dickson, S. L. Impact of stress on metabolism and energy balance. *Curr. Opin. Behav. Sci.* **9**, 71–77 (2016).
12. Radley, J. J. & Sawchenko, P. E. Evidence for involvement of a limbic paraventricular hypothalamic inhibitory network in hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptations to

- repeated stress. *J. Comp. Neurol.* **523**, 2769–2787 (2015).
13. Mcaninch, E. A. & Bianco, A. C. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1311**, 77–87 (2014).
  14. Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L. & Charli, J. L. Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress. *J. Endocrinol.* **224**, R139–R159 (2015).
  15. Ortiga-Carvalho, T. M., Chiamolera, M. I., Pazos-Moura, C. C. & Wondisford, F. E. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Compr. Physiol.* **6**, 1387–1428 (2016).
  16. Nillni, E. A. Regulation of the hypothalamic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Front. Neuroendocrinol.* **31**, 134–156 (2010).
  17. Helmreich, D. L., Parfitt, D. B., Lu, X. Y., Akil, H. & Watson, S. J. Relation between the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) axis and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology* **81**, 183–192 (2005).
  18. Zhang, J. *et al.* Thyroid Dysfunction, Neurological Disorder and Immunosuppression as the Consequences of Long-term Combined Stress. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
  19. Moog, N. K. *et al.* Review influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development. *Neuroscience* **342**, 68–100 (2017).
  20. Rodríguez-Rodríguez, A. *et al.* Tanycytes and the control of thyrotropin-releasing hormone flux into portal capillaries. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10**, 1–16 (2019).
  21. Ikegami, K. & Yoshimura, T. The hypothalamic–pituitary–thyroid axis and biological rhythms: The discovery of TSH’s unexpected role using animal models. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **31**, 475–485 (2017).
  22. Braun, D. & Schweizer, U. *Thyroid Hormone Transport and Transporters. Thyroid Hormone* **106**, (Elsevier Inc., 2018).
  23. Zhang, Z., Boelen, A., Bisschop, P. H., Kalsbeek, A. & Fliers, E. Hypothalamic effects of thyroid hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* **458**, 143–148 (2017).
  24. Seoane-Collazo, P. *et al.* Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine* **50**, 276–291 (2015).

25. Mullur, R., Liu, Y.-Y. & Brent, G. A. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.* **94**, 355–382 (2014).
26. Oppenheimer, J. H., Schwartz, H. L., Lane, J. T. & Thompson, M. P. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J. Clin. Invest.* **87**, 125–132 (1991).
27. Tupone, D., Madden, C. J. & Morrison, S. F. Autonomic regulation of brown adipose tissue thermogenesis in health and disease: potential clinical applications for altering BAT thermogenesis. *Front. Neurosci.* **8**, 1–14 (2014).
28. Silva, J. Physiological importance and control of non-shivering facultative thermogenesis J. Enrique Silva. *Front Biosci (School Ed)* **3**, 352–371 (2011).
29. Bloise, F. F., Cordeiro, A. & Ortiga-Carvalho, T. M. Role of thyroid hormone in skeletal muscle physiology. *J. Endocrinol.* **236**, R57–R68 (2018).
30. Uribe, R. M. *et al.* Voluntary exercise adapts the hypothalamus- Pituitary-Thyroid axis in male rats. *Endocrinology* **155**, 2020–2030 (2014).
31. Uribe, R. M., Redondo, J. L., Charli, J. L. & Joseph-Bravo, P. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* **58**, 140–145 (1993).
32. Jaimes-Hoy, L. *et al.* Neonatal Maternal Separation Alters, in a Sex-Specific Manner, the Expression of TRH, of TRH-Degrading Ectoenzymes in the Rat Hypothalamus, and the Response to the Thyroid Axis to Starvation. *Endocrinology* **157**, 3253–3265 (2016).
33. Sotelo-Rivera, I. *et al.* 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. *J. Neuroendocrinol.* **26**, 861–869 (2014).
34. Parra-Montes De Oca, M. A. *et al.* Voluntary exercise-induced activation of thyroid axis and reduction of white fat depots is attenuated by chronic stress in a sex dimorphic pattern in adult rats. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **10**, 1–13 (2019).

35. Klein, L. C. & Corwin, E. J. Seeing the unexpected: how sex differences in stress responses may provide a new perspective on the manifestation of psychiatric disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* **4**, 441–448 (2002).
36. Heck, A. L. & Handa, R. J. Sex differences in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis' response to stress: an important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology* **44**, 45–58 (2019).
37. Viau, V., Bingham, B., Davis, J., Lee, P. & Wong, M. 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).
38. Palmer, B. F. & Clegg, D. J. The sexual dimorphism of obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **402**, 113–119 (2015).
39. Moreira-Pais, A. *et al.* Sex differences on adipose tissue remodeling: from molecular mechanisms to therapeutic interventions. *J. Mol. Med.* **98**, 483–493 (2020).
40. Shi, H., Strader, A. D., Woods, S. C. & Seeley, R. J. Sexually dimorphic responses to fat loss after caloric restriction or surgical lipectomy. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **293**, 316–326 (2007).
41. Mauvais-Jarvis, F. Sex differences in metabolic homeostasis , diabetes , and obesity. *Biol. Sex Differ.* **6**, 14 (2015).
42. Schneider, M. Puberty as a highly vulnerable developmental period for the consequences of cannabis exposure. *Addict. Biol.* **13**, 253–263 (2008).
43. Schneider, M. Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior. *Cell Tissue Res.* **354**, 99–106 (2013).
44. Tirelli, E., Laviola, G. & Adriani, W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **27**, 163–178 (2003).
45. Chrousos, G. P. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.* **5**, 374–

81 (2009).

46. McEwen, B. S. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: Structural remodeling in the brain. *Metabolism*. **54**, 20–23 (2005).
47. Bale, T. L. & Epperson, C. N. Sex differences and stress across the lifespan. *Nat. Neurosci.* **18**, 1413–1420 (2015).
48. Merikangas, K. R., Nakamura, E. F. & Kessler, R. C. M. K. Epidemiology of mental disorders in children and adolescents. *Dialogues Clin. Neurosci.* **11**, 7–20 (2009).
49. Mumtaz, F., Khan, M. I., Zubair, M. & Dehpour, A. R. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **105**, 1205–1222 (2018).
50. Cacioppo, J. T., Cacioppo, S., Capitanio, J. P. & Cole, S. W. The Neuroendocrinology of Social Isolation. *Annu. Rev. Psychol.* **66**, 733–767 (2015).
51. Jahng, J. W., Yoo, S. B., Ryu, V. & Lee, J. H. Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **30**, 47–53 (2012).
52. Weintraub, A., Singaravelu, J. & Bhatnagar, S. Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. *Brain Res.* **1343**, 83–92 (2010).
53. Hong, S. *et al.* Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. *Physiol. Behav.* **105**, 269–275 (2012).
54. Gutiérrez-Mariscal, M. *et al.* Acute response of hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone neurons and thyrotropin release to behavioral paradigms producing varying intensities of stress and physical activity. *Regul. Pept.* **179**, 61–70 (2012).
55. Cote-Vélez, A. *et al.* Creb and Sp/Krüppel response elements cooperate to control rat TRH gene transcription in response to cAMP. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1809**, 191–199 (2011).
56. Sotelo-Rivera, I., Cote-Vélez, A., Uribe, R.-M., Charli, J.-L. & Joseph-Bravo, P.

Glucocorticoids curtail stimuli-induced CREB phosphorylation in TRH neurons through interaction of the glucocorticoid receptor with the catalytic subunit of protein kinase A. *Endocrine* **55**, 861–871 (2017).

57. Armario, A., Garcia-Marquez, C. & Jolin, T. The effects of chronic intermittent stress on basal and acute stress levels of TSH and GH, and their response to hypothalamic regulatory factors in the rat. *Psychoneuroendocrinology* **12**, 399–406 (1987).
58. Guo, T. Y. *et al.* Alterations of the daily rhythms of HPT axis induced by chronic unpredicted mild stress in rats. *Endocrine* **48**, 637–643 (2015).
59. Castillo-Campos, A., Gutiérrez-Mata, A., Charli, J.-L. & Joseph-Bravo, P. Chronic stress inhibits hypothalamus–pituitary–thyroid axis and brown adipose tissue responses to acute cold exposure in male rats. *J. Endocrinol. Invest.* (2020).
60. Kitraki, E., Karandrea, D. & Kittas, C. Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain. *Neuroendocrinology* **69**, 331–338 (1999).
61. Paskitti, M. E., McCreary, B. J. & Herman, J. P. Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: Time-course analysis. *Mol. Brain Res.* **80**, 142–152 (2000).
62. Zheng, H. *et al.* Beneficial effects of exercise and its molecular mechanisms on depression in rats. *Behav. Brain Res.* **168**, 47–55 (2006).
63. Chen, C. *et al.* The exercise-glucocorticoid paradox: How exercise is beneficial to cognition, mood, and the brain while increasing glucocorticoid levels. *Frontiers in Neuroendocrinology* **44**, 83–102 (2017).
64. Hong, S. *et al.* Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. *Physiol. Behav.* **105**, 269–275 (2012).
65. Vidal, J., Buwalda, B. & Koolhaas, J. M. Differential long-term effects of social stress during adolescence on anxiety in Wistar and wild-type rats. *Behav. Processes* **87**, 176–182 (2011).

66. Tirelli, E., Laviola, G. & Adriani, W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. in *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **27**, 163–178 (Elsevier Ltd, 2003).
67. Lukkes, J. L., Watt, M. J., Lowry, C. A. & Forster, G. L. Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **3**, 18 (2009).
68. Jahng, J. W., Yoo, S. B., Ryu, V. & Lee, J. H. Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **30**, 47–53 (2012).
69. Enkel, T. *et al.* Ambiguous-cue interpretation is biased under stress-and depression-like states in rats. *Neuropsychopharmacology* **35**, 1008–1015 (2010).
70. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press* **53**, (2005).
71. Bailey, G. S. Radioimmunoassay of Peptides and Proteins. in *Basic Protein and Peptide Protocols* 449–459 (Humana Press, 1994).
72. Bianco, A. C. *et al.* American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. *Thyroid* **24**, 88–168 (2014).
73. Chomczynski, P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. **159**, 156–159 (1987).
74. Eiland, L., Ramroop, J., Hill, M. N., Manley, J. & McEwen, B. S. Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 39–47 (2012).
75. Begni, V., Zampar, S., Longo, L. & Riva, M. A. Sex Differences in the Enduring Effects of Social Deprivation during Adolescence in Rats: Implications for Psychiatric Disorders. *Neuroscience* **437**, 11–22 (2020).
76. Sánchez, E. *et al.* 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).

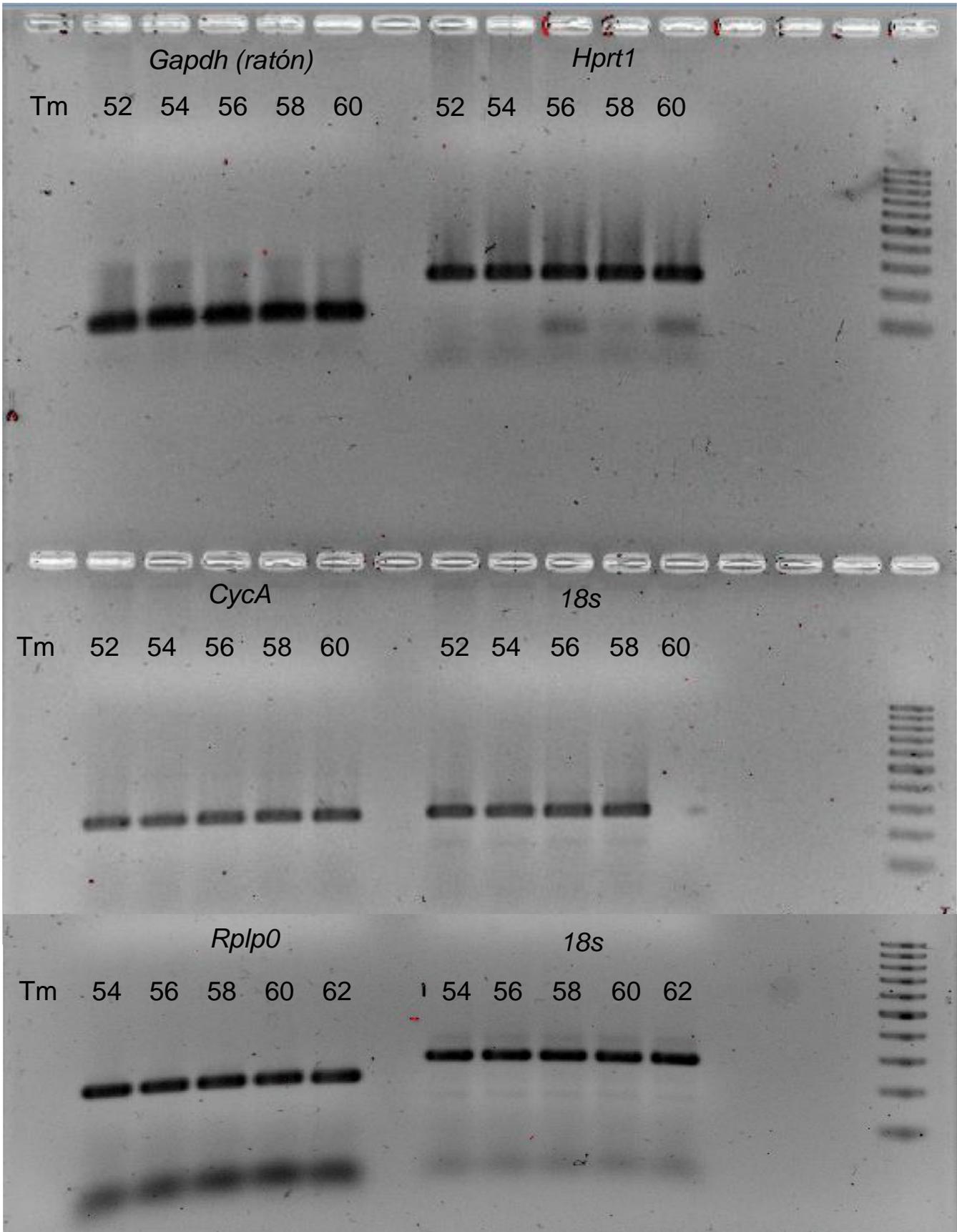
77. Uchida, Y. *et al.* Estrogen modulates central and peripheral responses to cold in female rats. *J. Physiol. Sci.* **60**, 151–160 (2010).
78. Uribe, R. M. *et al.* 17  $\beta$ -Oestradiol indirectly inhibits thyrotrophin-releasing hormone expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of female rats and blunts thyroid axis response to cold exposure. *J. Neuroendocrinol.* **21**, 439–448 (2009).
79. Wulsin, A. C., Wick-carlson, D., Packard, B. A., Morano, R. & Herman, J. P. Psychoneuroendocrinology Adolescent chronic stress causes hypothalamo – pituitary – adrenocortical hypo-responsiveness and depression-like behavior in adult female rats. *Psychoneuroendocrinology* **65**, 109–117 (2016).
80. Rodríguez-Cuenca, S., Monjo, M., Gianotti, M., Proenza, A. M. & Roca, P. Expression of mitochondrial biogenesis-signaling factors in brown adipocytes is influenced specifically by 17 $\beta$ -estradiol, testosterone, and progesterone. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **292**, 340–346 (2007).
81. Razzoli, M. & Bartolomucci, A. The Dichotomous Effect of Chronic Stress on Obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 504–515 (2016).
82. Asensio, C., Muzzin, P. & Rohner-Jeanrenaud, F. Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *Int. J. Obes.* **28**, S45–S52 (2004).
83. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **84**, 277–359 (2004).
84. Ahmadian, M. *et al.* Ppar $\gamma$  signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nat. Med.* **19**, 557–566 (2013).
85. Contarteze, R. V. L., Manchado, F. D. B., Gobatto, C. A. & De Mello, M. A. R. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **151**, 415–422 (2008).
86. Radahmadi, M., Alaei, H., Sharifi, M. R. & Hosseini, N. Stress biomarker responses to

- different protocols of forced exercise in chronically stressed rats. *J. Bodyw. Mov. Ther.* **21**, 63–68 (2017).
87. Uribe, R. M. *et al.* Voluntary exercise adapts the hypothalamus- Pituitary-Thyroid axis in male rats. *Endocrinology* **155**, 2020–2030 (2014).
  88. Craenenbroeck, K. Van, Bosscher, K. De, Berghe, W. Vanden, Vanhoenacker, P. & Haegeman, G. Role of glucocorticoids in dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Mol. Cell. Endocrinol.* **245**, 10–22 (2005).
  89. Kalsbeek, A., Su, Y., Fliers, E. & la Fleur, S. The Hypothalamic – Pituitary – Adrenal Axis : Circadian Dysregulation and Obesity. 219–243 (2015).
  90. Solomon, M. B., Jankord, R., Flak, J. N. & Herman, J. P. Chronic stress, energy balance and adiposity in female rats. *Physiol. Behav.* **102**, 84–90 (2011).
  91. Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W. & Goodyear, L. J. Exercise effects on white adipose tissue: Beiging and metabolic adaptations. *Diabetes* **64**, 2361–2368 (2015).
  92. Delano, M. J. & Moldawer, L. L. The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases. *Nutr. Clin. Pract.* **21**, 68–81 (2006).
  93. Droste, S. K., Chandramohan, Y., Hill, L. E., Linthorst, A. C. E. & Reul, J. M. H. M. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level. *Neuroendocrinology* **86**, 26–37 (2007).
  94. Park, E. *et al.* Changes in basal hypothalamo-pituitary-adrenal activity during exercise training are centrally mediated. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, 1360–1371 (2005).
  95. Dewal, R. S. & Stanford, K. I. Effects of exercise on brown and beige adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1864**, 71–78 (2019).
  96. Ahmed, H., Ali, F., Ahmed, A. E., Ahmed, A. I. & Abdelhameed, E. Excitatory and inhibitory influence of exogenous neurotransmitters on reproduction in female rats. *J. Exp. Appl. Anim. Sci.* **2**, 286–298 (2018).

## Anexo 1 Secuencias, condiciones y estandarización de los oligonucleótidos

Tabla 2. Condiciones usadas para probar y optimizar los oligonucleótidos en el NPV. Para la  $T_m$  se hizo un gradiente de temperaturas, como se especifica en las imágenes de los geles, sin embargo, para la qPCR se usó una  $T_m$  de 60°C en todos los genes. Los ciclos usados para la optimización se obtuvieron de condiciones previas que ya se tenían probadas en el laboratorio.

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	$T_m$ °C	Ciclos	ADNc ( $\mu$ L)
<i>Trh</i>	GCTAGTGAAGGGAACAGGATAG	AGAGGGAGAGGGTGTCTTAAT	60	21	4
<i>Crh</i>	TCTGAGGGAAGTCTTGAAATG	GGTATATAGGCTCTCTCCCTGT	60	27	4
<i>CycA</i>	GCTGGACCAAACACAAATGG	CTCCTGAGCTACAGAAGGAATG	60	21	4
<i>Rplp0</i>	CTTTGTCTGTGGAGACTGACTAC	GAAGAGACCGAATCCCATGTC	60	24	4
<i>18s</i>	CGTCGTAGTTCCGACCATAAA	CGGAATCGAGAAAGAGCTATCA	60	21	4
<i>Hprt1</i>	GGCCAGACTTTGGATTTG	TAGATGGCCACAGGACTAGAA	60	26	4
<i>Gadph</i>	GGTCGGTGTGAACGGATTT	TGGAAGATGGTGTATGGGTTTC	60	26	4
<i>Dio2</i>	GATGCTCCCAATTCCAGTGT	AGGCTGGCAAGTTGCCTAGTA	64	26	2
<i>Ucp1</i>	GGATCAAACCCCGCTACACTG	CAGGATCCGAGTCGCAGAAA	58	17	4
<i>Adrb3</i>	TCTGTGCTGGCTGCCCTTCTT	CTTCTCCTCCCCCAACCCTCAA	54	27	4
<i>Pgc1<math>\alpha</math></i>	ATGGAGTGACATAGAGTGTGC	GTGCTAAGACCGCTGCATTC	64°	28	4
<i>Gr</i>	AAAAAGCACATCACACATAAATCTG	TAAATAAGAGGGAGCAAACACTACTGG	64	29	4
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	CCCTTTACCACGGTTGATTTCTC	GCAGGCTCTACTTTGATCGCACT	68	27	4
<i>Cyc</i>	CGAGCTGTTTGCAGACAAAGTTCC	GATGGGGTGGGGGTGCTCTC	64	20	4



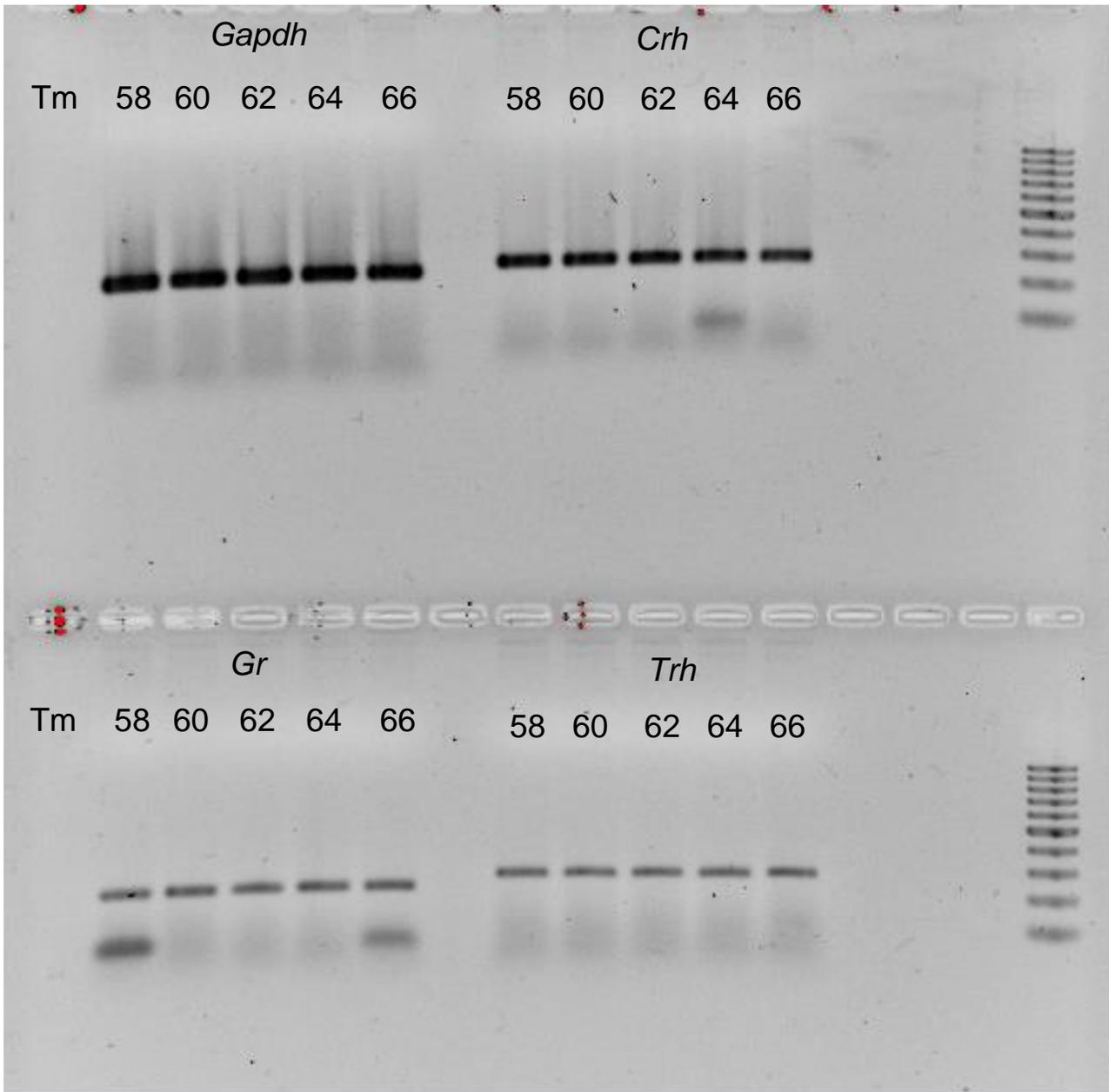


Figura 18. Geles de agarosa con las distintas Tm que se probaron en los oligonucleótidos, en la primera imagen, por error se tomaron los oligonucleótidos de *Gapdh* de ratón, sin embargo, se probaron los de rata y se verificó que amplificaban adecuadamente. El gen *18s* se probó dos veces ya que en la primera amplificación no hubo producto en una Tm de 60 °C por lo que se decidió repetirlo y se comprobó que si se amplificaba correctamente a esa temperatura.

## Anexo 2 Elección del estándar interno para la qPCR

Tabla 3. Resultados del software Bestkeeper en el que se probaron 5 genes “Housekeeping” o Controles internos, de acuerdo con el software el gen 18s no es un buen control ya que la desviación estándar es >1. Se decidió usar *CycA* como control interno ya que cumplía con los parámetros descritos previamente y además es un control que ya ha sido probado en múltiples ocasiones en el laboratorio en la misma región del hipotálamo con buenos resultados.

### CP data of housekeeping Genes:

	Hprt HKG 1	Gapdh HKG 2	18s HKG 3	CycA HKG 4	Rplp0 HKG 5
n	18	18	18	17	17
geo Mean [CP]	22.98	18.64	14.28	15.95	18.19
ar Mean [CP]	23.00	18.67	14.39	16.00	18.22
min [CP]	21.90	17.09	10.99	14.72	16.70
max [CP]	26.41	21.96	16.99	19.95	22.08
std dev [± CP]	0.70	0.89	1.48	0.88	0.77
CV [% CP]	3.05	4.75	10.32	5.47	4.25
min [x-fold]	-2.11	-2.92	-9.81	-2.35	-2.80
max [x-fold]	10.79	9.98	6.52	15.97	14.86
std dev [± x-fold]	1.63	1.85	2.80	1.83	1.71

### Pearson correlation coefficient ( r )

vs.	HKG 1	HKG 2	HKG 3	HKG 4	HKG 5
HKG 2	0.904	-	-	-	-
p-value	0.001	-	-	-	-
HKG 3	-0.028	0.170	-	-	-
p-value	0.914	0.500	-	-	-
HKG 4	0.984	0.936	-0.013	-	-
p-value	0.001	0.001	0.961	-	-
HKG 5	0.960	0.925	0.160	0.965	-
p-value	0.001	0.000	0.538	0.001	-
HKG 6					
p-value					
HKG 7					
p-value					
HKG 8					
p-value					
HKG 9					
p-value					
HKG 10					
p-value					

<b>BestKeeper vs.</b>	<b>HKG 1</b>	<b>HKG 2</b>	<b>HKG 3</b>	<b>HKG 4</b>	<b>HKG 5</b>
<b>coeff. of corr. [r]</b>	<b>0.829</b>	<b>0.891</b>	<b>0.520</b>	<b>0.841</b>	<b>0.911</b>
<b>p-value</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.027</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>

### Regression Analysis: HKG vs. BestKeeper

	<b>Hprt</b> HKG 1 vs. BK	<b>Gapdh</b> HKG 2 vs. BK	<b>18s</b> HKG 3 vs. BK	<b>CycA</b> HKG 4 vs. BK	<b>Rplp0</b> HKG 5 vs. BK
coeff. of corr. [r]	<b>0.83</b>	<b>0.89</b>	<b>0.52</b>	<b>0.84</b>	<b>0.91</b>
coeff. of det. [r <sup>2</sup> ]	<b>0.69</b>	<b>0.79</b>	<b>0.27</b>	<b>0.71</b>	<b>0.83</b>
intercept [CP]	<b>7.78</b>	<b>0.72</b>	<b>-1.89</b>	<b>-2.52</b>	<b>-0.77</b>
slope [CP]	<b>0.85</b>	<b>1.01</b>	<b>0.91</b>	<b>1.04</b>	<b>1.07</b>
SE [CP]	<b>±0.611</b>	<b>±0.544</b>	<b>±1.591</b>	<b>±0.707</b>	<b>±0.51</b>
p-value	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.027</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>
Power of HKG [x-fold]	<b>1.81</b>	<b>2.01</b>	<b>1.88</b>	<b>2.06</b>	<b>2.10</b>

### Anexo 3 Fase del ciclo estral al momento de la eutanasia

Tabla 4. Porcentaje de ratas que se encontraban en la fase del ciclo de proestro/estro o en la fase de diestro I o II al momento del sacrificio. Las laminillas se tiñeron con hematoxilina y eosina y la evaluación citológica de los frotis vaginales se realizó observando en el microscopio óptico y se identificaron con base en las micrografías publicadas previamente<sup>96</sup>.

Fase	Grupo	Frío 1 h				Ejercicio voluntario			
		C-TA	C-4°	ISO-TA	ISO-4°	C-SED	C-EV	ISO-SED	ISO-EV
Proestro- Estro (%)		90	70	67	89	50	92	50	67
Diestro I- Diestro II (%)		10	30	33	11	50	8	50	33

### Anexo 4 Artículo publicado



# Chronic stress inhibits hypothalamus–pituitary–thyroid axis and brown adipose tissue responses to acute cold exposure in male rats

A. Castillo-Campos<sup>1</sup> · A. Gutiérrez-Mata<sup>1</sup> · J.-L. Charli<sup>1</sup> · P. Joseph-Bravo<sup>1</sup>

Received: 26 December 2019 / Accepted: 5 June 2020  
© Italian Society of Endocrinology (SIE) 2020

## Abstract

**Purpose** Cold exposure activates the hypothalamus–pituitary–thyroid (HPT) axis, response blunted by previous acute stress or corticosterone administration. Chronic stressors can decrease serum T3 concentration, and thyrotropin-releasing hormone (*Trh*) expression in the paraventricular nucleus (PVN), but impact on the response to cold is unknown; this was studied in rats submitted to daily repeated restraint (rRes) that causes habituation of hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis response, or to chronic variable stress (CVS) that causes sensitization and hyperreactivity.

**Methods** Wistar male adult rats were submitted to rRes 30 min/day, or to CVS twice a day, for 15 days. On day 16, rats were exposed 1 h to either 5 or 21 °C. Parameters of HPT and HPA axes activity and of brown adipose tissue (BAT) cold response were measured; gene expression in PVN and BAT, by RT-PCR; serum hormone concentration by radioimmunoassay or ELISA.

**Results** Compared to naïve animals, *Crh* and corticosterone concentrations were attenuated at the end of rRes, but increased at the end of CVS treatments. Cold exposure increased mRNA levels of *Crh*, *Trh*, and serum concentration of thyrotropin in naïve, but not in rRes or CVS rats; corticosterone increased in all groups. Cold induced expression of thermogenic genes in BAT (*Dio2* and *Ucp1*) in naïve but not in stressed rats; *Adrb3* expression was differentially regulated.

**Conclusion** Both types of chronic stress blunted HPT and BAT responses to cold. Long-term stress effects on noradrenergic and/or hormonal signaling are likely responsible for HPT dysfunction and not the type of chronic stressor.

**Keywords** Thyrotropin-releasing hormone · Brown adipose tissue · Hypothalamus–pituitary–thyroid · Hypothalamus–pituitary–adrenal · Restraint · Chronic variable stress · Cold stress

## Abbreviations

ACTH Adrenocorticotropin  
*Adrb3* β3 Adrenergic receptor gene  
BAT Brown adipose tissue  
BWg Body weight gain  
cAMP Cyclic adenosine monophosphate

Cort Corticosterone  
Cpf Control pair-fed  
*Crh* Corticotropin-releasing hormone gene  
CRH Corticotropin-releasing hormone peptide  
CVS Chronic variable stress  
*Dio2* Deiodinase 2 gene  
DIO2 Deiodinase 2  
EPM Elevated plus maze  
Gr Glucocorticoid receptor gene (*Nr3c1*: nuclear receptor subfamily 3 group C member gene)  
HPA Hypothalamus–pituitary–adrenal axis  
HPT Hypothalamus–pituitary–thyroid axis  
N Naïve  
OFT Open field test  
pCREB Phosphorylated cAMP response element-binding protein  
PKA Protein kinase A  
PKAc Catalytic subunit of PKA

A. Castillo-Campos and A. Mata made equivalent contributions.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s40618-020-01328-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ P. Joseph-Bravo  
joseph@ibt.unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, México

PVN	Paraventricular nucleus of the hypothalamus
rRes	Repeated restraint stress
RT	Room temperature
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAS	Sympathoadrenal system
T3	3, 3', 5-Triiodo-L-thyronine
T4	Thyroxine
<i>Trh</i>	Thyrotropin-releasing hormone gene
TRH	Thyrotropin-releasing hormone peptide
TSH	Thyrotropin
<i>Ucp1</i>	Uncoupling protein 1 gene
UCP-1	Uncoupling protein 1
WAT	White adipose tissue

## Introduction

Cold exposure activates neuroendocrine and autonomic systems that induce thermogenesis in brown adipose tissue (BAT) and muscle [1, 2]. The neuroendocrine response initiates with a rapid increase of thyrotropin-releasing hormone (*Trh*) expression in neurons of the paraventricular nucleus (PVN) and TRH release from median eminence, thyrotropin (TSH) release from anterior-pituitary, followed by T4 from thyroid [3–7]. The thermogenic response of the sympathetic system initiates in the preoptic area that through multi-synaptic relays stimulates BAT, the main thermogenic organ in rodents [1, 2]. BAT produces heat through the activity of the mitochondrial uncoupling protein1 (UCP-1), modulated by the concerted action of adrenergic stimulation and thyroid hormones [7, 8]. Stimulated  $\beta$ 3 adrenergic receptors (*Adrb3*) activate protein kinase A (PKA) that phosphorylates lipases producing the free fatty acids required for mitochondrial UCP-1 function, and activates deiodinase 2 (DIO2) that transforms T4 to T3; activated PKA (PKAc) phosphorylates the cAMP-response element binding-protein (CREB) that, in combination with T3, increases the expression of *Ucp1* and *Adrb3* [2, 7]. These latter events are also stimulated by TSH acting directly through its receptor in BAT [8].

HP–adrenal (HPA) axis is activated with physical or psychogenic stressors, including cold [9, 10]; HPT axis is modulated by the nutritional status, inhibited by many stressors but activated by energy demands as cold exposure or physical activity [11, 12]. Fast and precise responses of HPA or HPT axes rely on the accuracy of signal decoding by PVN neurons and dynamics of feedback effects [9, 11]. Response of both axes to a stressor is modified by previous corticosterone administration which represses stress-induced increases in PVN-corticotropin-releasing hormone (*Crh*) expression and serum adrenocorticotropin (ACTH) concentration [13], or the cold-induced increases in PVN-*Trh* expression, number of pCREB-positive PVN-TRH neurons,

serum TSH concentration, DIO2 activity and expression in BAT [14, 15].

Chronic stress produces long-term changes at various levels in limbic and neuroendocrine systems leading to diverse psychological or metabolic diseases [9]. HPA axis and sympathoadrenal system become habituated to homotypic chronic stressors like repeated intermittent restraint (rRes), whereas heterotypic stressors like chronic variable stress (CVS) induce sensitization that may be long lasting [16–18]. Habituation or sensitization recruit different limbic circuits producing neuroplastic changes in networks that modulate CRH neurons in the PVN, albeit both may cause a hyperactive response to a novel stressor [17, 18].

HPT axis activity is inhibited by acute Res [19] but not by rRes [20], whereas it remains inhibited after CVS [21]; whether they blunt the response to cold is unknown. As HPA axis response to a novel stressor varies depending on the type of chronic stressor, we hypothesized that HPT axis and BAT responses to cold stress would depend on HPA response to chronic-stressor type. We characterized in male rats the effect of rRes and CVS on the initial responses of TRH neurons, responsible for triggering HPT axis activity, and of BAT, to an energy demanding situation such as 1 h of cold exposure [14]. The response to stress was monitored by measuring HPA axis activity.

## Material and methods

### Animals

Wistar male rats were raised at the Institute's breeding colony and kept (2/cage) under  $21 \pm 1$  °C, lights (7:00–19:00 h), food and water ad libitum. Animal conditions and treatments are detailed in [14, 22] and Online resource 1. At 10 weeks of age ( $328 \pm 4$  g), six groups of five to six non-sibling rats were formed for each experiment. Naïve rats were kept in one room and experimental groups in another, manipulated twice/week during cage change and once/week for weight measurement. As HPT axis activity is modified by nutritional status, and stress alters food intake [11, 23], control groups were pair-fed to intake of stressed groups (control pair-fed: Cpf). Cpf groups also accounted for stress due to intermittent housing change, and/or ultrasonic vocalizations and odors emitted by stressed rats [24]. Two independent experiments were performed for each stress paradigm.

### Chronic stress protocols

#### rRes

Rats were placed in individual cages; the rRes group was moved to the procedural room and restrained 30 min at

10:00 h for 15 days [20] (Online resource 1); simultaneously, the Cpf group was moved to another room. A blood aliquot was taken from the tail before and after Res at days stated in figures. Both groups were returned to the home room and housed with their cage mate.

## CVS

Rats were submitted every day at 10:00 h and 16:00 h to a different stressor during 15 days, including elevated plus maze and open field behavioral tests (Online resource 1).

## Cold exposure

On day 16, naïve, Cpf and stressed rats were placed at 9:00 h in individual empty cages, moved (one rat every 3 min) either to the procedural room at room temperature ( $21 \pm 1$  °C, RT), or to a nearby cold room ( $5 \pm 1$  °C). After 1 h, rats were individually moved to the laboratory for decapitation (Online resource 1). Rectal temperature was immediately measured with a thermocouple thermometer (Acorn Temp JKT; Oakton instruments, IL). Trunk blood was collected, serum aliquots were stored at  $-20$  °C, and brain and BAT tissues were dissected and stored at  $-70$  °C.

## Biochemical assays

Serum TSH and corticosterone concentrations were quantified by radioimmunoassay; TSH with NIDDK reagents and protocols; corticosterone, with Merck-Millipore, PerkinElmer, and Sigma reagents (detection limit 25 ng/ml). Total T3 and T4 were determined with ELISA kits (Diagnóstica Internacional Zapopan, JAL, México) as in [22] (limit 0.75 ng/ml T4, 1 ug/dl T3). Samples were measured in duplicate: intra-variation coefficients < 10%, inter-assay variability within duplicates < 6%.

Total RNA was extracted from PVN excised with a sample corer (1 mm internal diameter) from coronal slices of 200  $\mu$ m sectioned on a cryostat (bregma  $-0.84 - 2.2$  mm); RT-PCR reactions were performed and target gene levels normalized against cyclophilin A cDNA verified as described (Online resource 1, Supplementary Table 1).

## Statistical analyses

The mean of duplicates equals one determination. For each experiment, results were calculated as % of mean values of naïve group at RT and pooled for analyses with either repeated measures, one or two-way ANOVAs (Online resource 2, Supplementary Table 2), followed, if  $p < 0.05$ , by Tukey's multiple comparison test using GraphPad Prism 8.0.2. Student's *t* test between two groups was additionally

performed for some comparisons and reported when  $p < 0.05$  in figures. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

## Results

### Response of ponderal and hormonal variables to chronic stressors

Compared to naïve group, rRes decreased total food intake by  $7 \pm 1\%$ ; in rRes rats, food intake decreased on days 2 and 8 when a blood aliquot was taken. Body weight gain (BWg) was reduced in pair-fed and stressed groups by 25% (Fig. 1a, c). CVS diminished food intake by 20% compared to naïve. BWg was highest in naïve, and lower in CVS than in Cpf (Fig. 1b, d). Weight of BAT or white adipose tissue (WAT) did not change in either paradigm, consistent with stress-induced loss of lean mass [25, 26]; weight of adrenal glands increased in rRes and CVS compared to the naïve and Cpf groups (Online resource 2, Supplementary Table 3).

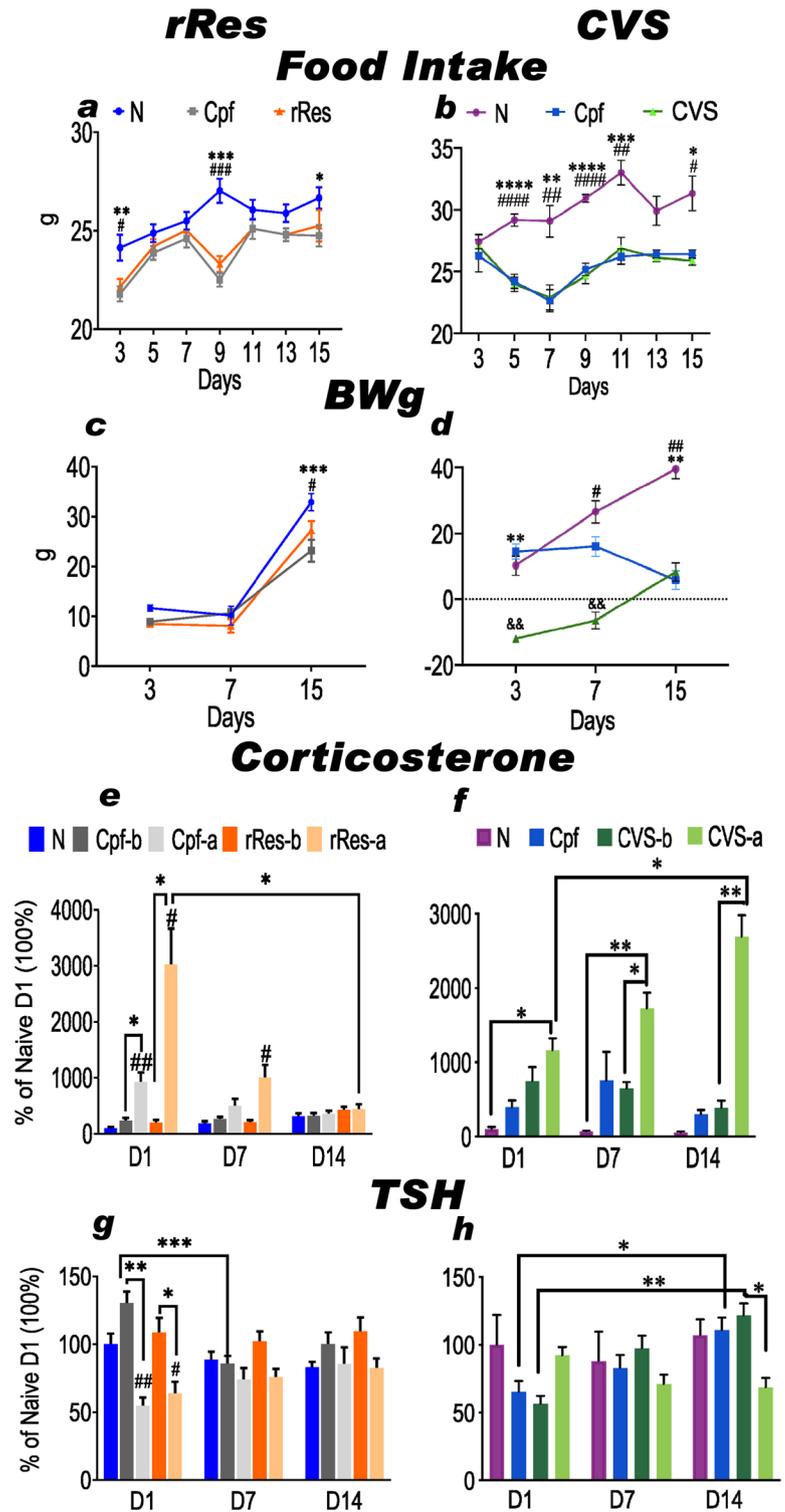
Serum corticosterone concentration increased in restrained rats on day 1 and to a lesser degree in Cpf, probably due to the stress caused by food restriction and isolation for 30 min; afterward, the concentration gradually diminished normalizing by day 14 (Fig. 1e), as expected for habituation [18, 27]. Serum thyrotropin concentration was reduced after the first episode of food restriction and isolation (Cpf), and after rRes; but no longer by the 14th day, when body weight gain had diminished (Fig. 1g) [22].

In the CVS paradigm, Cpf serum corticosterone concentration tended to increase compared to naïve, but a high variability in basal values impeded statistical significance; corticosterone concentration increased after the stressor, more intensely as time increased (Fig. 1f). Cpf basal serum TSH concentration was initially lower than naïve, normalizing at the end, suggesting some habituation; however, stress-induced decrease in serum TSH concentration was observed at day 14 (Fig. 1h). The inverse pattern between TSH and corticosterone serum concentrations supports stress/corticosterone induced inhibition of TSH secretion [11, 21]. Behavioral tests (OFT, EPM) performed during CVS routine showed increased anxiety as time progressed (Online resource 1, Supplementary Fig. 2).

### Temperature response to acute cold exposure

Rectal temperature of rats kept at 21 °C tended to be higher in Cpf and rRes than in naïve groups, whereas CVS, Cpf and naïve groups showed no difference. Cold exposure lowered temperatures in Cpf, rRes and CVS groups, but not in naïve rat (Online resource 2, Supplementary Fig. 3).

**Fig. 1** Ponderal and hormonal changes during 14 days of repeated restraint (rRes) or chronic variable stress (CVS). Food intake, body weight gain (BWg), serum corticosterone and thyrotropin (TSH) concentrations in male rats after repeated restraint (rRes) or chronic variable stress (CVS). Corticosterone and TSH were measured before (-b) or after (-a) a stress session, and results are expressed as % of naïve values. Repeated measures ANOVA. Post hoc: for **a-d**: \*-\*\*\*\*: N vs. Cpf, #-####: N vs. stressed, && Cpf vs. stressed; for panels **e, h**: \*-\*\*\*\*, #-###: vs. N, \*, #, p < 0.05, \*\*, ##, &&: p < 0.005, \*\*\*, ###, p < 0.0005, \*\*\*\*, ####: p < 0.0001. D day, N naïve, Cpf control pair-fed



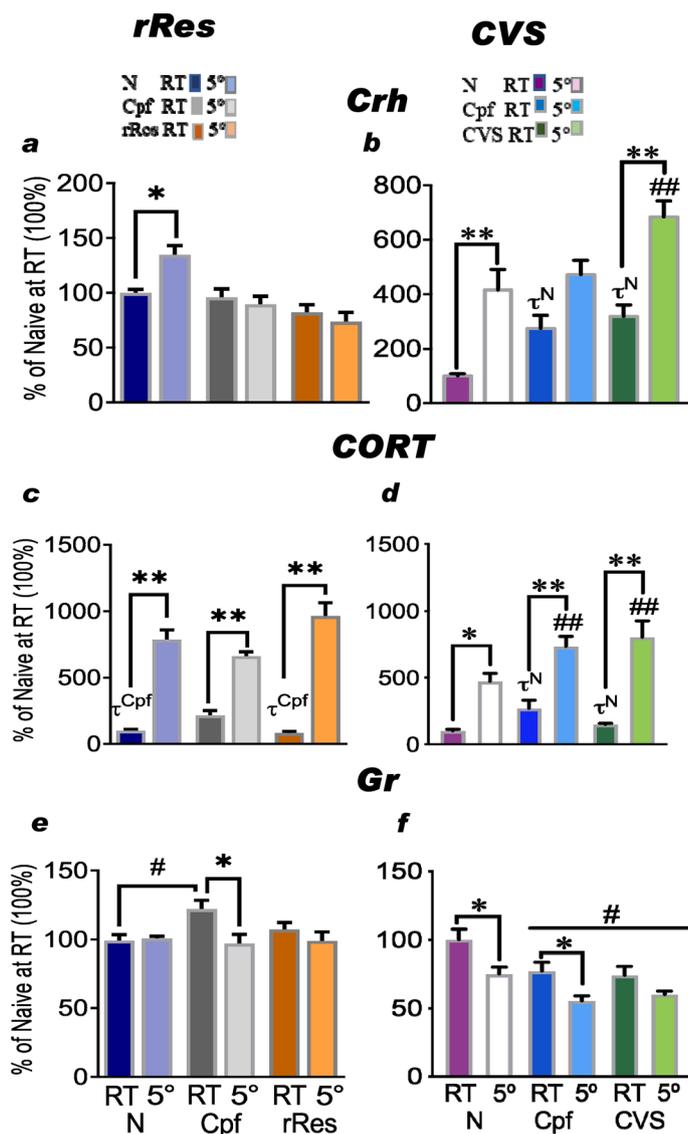
### HPA axis response to acute cold exposure

**rRes.** PVN *Crh* mRNA levels were similar in all groups kept at RT, and increased by cold only in naïve rats (Fig. 2a). In contrast, cold increased serum corticosterone concentration in all groups, more in rRes than in Cpf (Fig. 2c).

PVN *Gr* expression was higher in Cpf at RT than in naïve rats (Fig. 2e).

**CVS.** Basal expression of PVN-*Crh* and serum corticosterone concentration were higher in both Cpf and CVS than in naïve rats, supporting augmented stress of both experimental groups. Cold increased *Crh* expression in all,

**Fig. 2** Response of the HPA axis to 1 h cold exposure after 14 days of chronic stress. *Crh* and glucocorticoid receptor (*Gr*) expression in PVN, corticosterone (Cort;  $N = 48.5 \pm 5.9$  ng/ml) concentration in serum in male rats after rRes or CVS experiments. 2 W-ANOVA. Post hoc: *p* values and abbreviations as in Fig. 1; \*-\*\*\*: RT vs. 5°, #-###: vs. N-RT.  $\tau^N$ : *t* test  $p < 0.05$  against N,  $\tau^{Cpf}$ : *t* test  $p < 0.05$  against Cpf. RT room temperature



although not significant in the Cpf due to the high levels at RT (Fig. 2b). Serum corticosterone concentration increased after cold in all, highest in CVS (Fig. 2d), consistent with reported adrenal sensitization [17]. PVN *Gr* mRNA levels at RT showed an opposite tendency to that of *Crh*, consistent with corticosterone feedback [9], highest in naïve and lowest in CVS rats; cold exposure diminished them in naïve and Cpf compared to RT (Fig. 2f).

## HPT axis response to acute cold exposure

### rRes

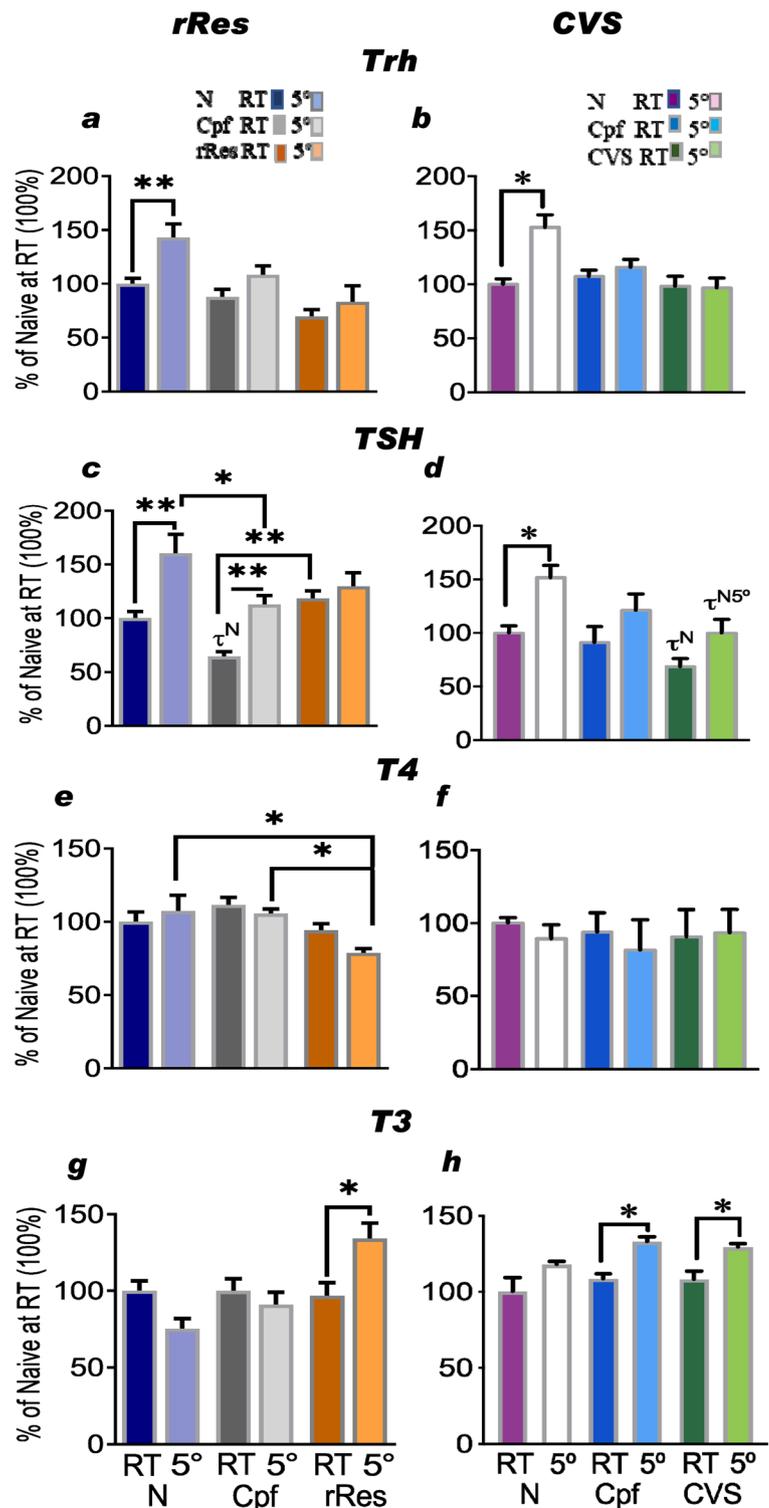
No difference was detected at RT in either PVN *Trh* expression or serum T4 and T3 concentrations (Fig. 3a, e, g), while that of TSH was lowest in Cpf (Fig. 3c), which had the highest serum corticosterone concentration (Fig. 2c).

The reported cold-induced increase in PVN *Trh* expression [5, 6, 14] was detected only in naïve rats (Fig. 3a), and serum TSH concentration increased in naïve and Cpf, but not in rRes (Fig. 3c). Cold did not increase serum T4, but enhanced T3 concentration in the rRes group (Fig. 3e, g).

### CVS

The basal parameters of the HPT axis activity did not differ in the CVS experiments at RT (Fig. 3b, d, f, h). Cold increased PVN *Trh* expression only in naïve rats, serum TSH concentration in naïve and Cpf rats (Fig. 3b, d); serum T4 concentration did not vary, whereas a slight but significant increase was observed on serum T3 concentration in Cpf and CVS groups (Fig. 3f, h).

**Fig. 3** Response of HPT axis to 1 h cold exposure after 14 days of chronic stress. *Trh* expression in PVN, serum TSH ( $N=3.15\pm 0.2$  ng/ml), T4 ( $N=3.75\pm 0.12$   $\mu$ g/dl) and T3 ( $N=4.6\pm 0.12$  ng/ml) concentrations in male rats after rRes or CVS. 2 W-ANOVA. Statistics and abbreviations as in Figs. 1 and 2



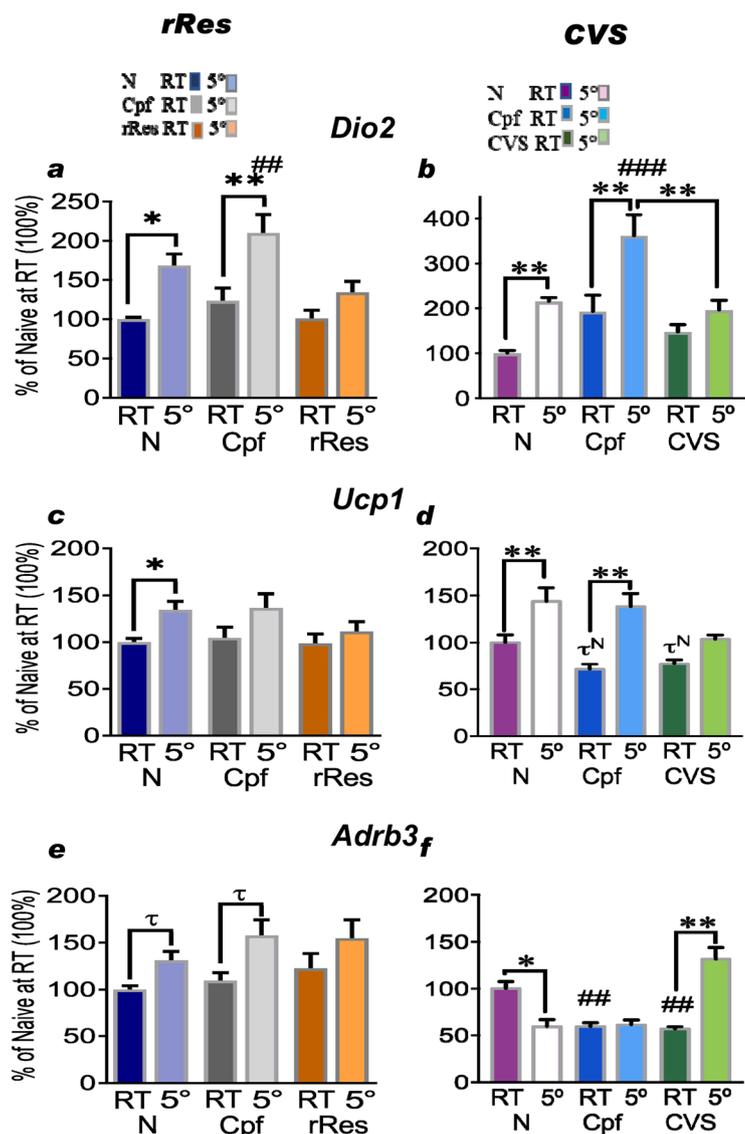
### BAT response to acute cold exposure

We evaluated gene expression of proteins relevant to thermogenesis and regulated by cold in BAT [2, 7].

*rRes*. Basal expression of *Dio2*, *Ucp1* and *Adrb3* were not affected by food restriction or stress (Fig. 4a, c, e).

Cold stimulated *Dio2* expression in naive and Cpf groups, but not in rRes rats (Fig. 4a), and *Ucp1* only in the naive group (Fig. 4c). There was a cold effect on mRNA levels of *Adrb3* by ANOVA analysis, but increases between cold and RT of naive and Cpf groups were valid only by *t* test (Fig. 4e).

**Fig. 4** Response of brown adipose tissue (BAT) to chronic stress and acute cold exposure. Deiodinase 2 (*Dio2*), uncoupling protein 1 (*Ucp1*) and  $\beta$ 3 adrenergic receptor (*Adrb3*) expression in BAT of male rats after rRes or CVS. Statistics and abbreviations as in Fig. 2



CVS. Food restriction (Cpf) and CVS decreased expression of *Ucp1* and *Adrb3* compared to naïve rats at RT; *Dio2* expression was unchanged (Fig. 4b, d, f). Cold increased *Dio2* and *Ucp1* expression in naïve and Cpf groups. In contrast, cold exposure decreased *Adrb3* expression in the naïve group, whereas it increased it in the CVS group (Fig. 4b, d, f).

## Discussion

Results showed that either homotypic or heterotypic chronic stressors disturb temperature regulation, HPT response, and expression of molecules important for the thermogenic response of rats to 1 h of cold exposure (Online Resource 2, Supplementary Fig. 4). The time chosen was due to the transient response in *Trh* transcription, but allowed to recognize

the blunting effects at the central and peripheral levels. As reported, rRes produced HPA habituation, whereas CVS produced sensitization [17, 18, 26, 27], validating the experimental conditions needed to evaluate the response of HPT axis to cold on rats previously exposed to distinct types of chronic stressor. The Cpf groups allowed to measure the additional stress produced by food restriction, moving, isolation or housing conditions, which is seldom considered. In naïve animals, 1 h of cold exposure stimulated the sympathetic and neuroendocrine systems increasing *Trh* and *Crh* expression in PVN, serum TSH and Cort concentrations, expression of *Dio2* and *Ucp-1* in BAT, maintaining body temperature [14]. In contrast, rats of both chronic stress paradigms were unable to control their temperature, had a blunted response of the central arm of the HPT axis and altered BAT thermogenic genes expression. Thus, although response of PVN-Crh expression to cold depended on the

type of previous chronic stress, response of HPT axis, and of Cort secretion, to acute cold stress was similarly modified in both models; in addition, chronic stress-dependent BAT gene expression was detected.

Cold is perceived as a physical stressor that increases PVN-*Crh* expression. Habituated rats to rRes were expected to have increased response to the novel stressor (cold), but instead the response was blunted supporting the proposal that if the novel stressor is not life threatening, the habituation of HPA axis could attenuate the response to the new stressor [17, 18, 27]. Cpf rats had a higher PVN-*Gr* expression that probably contributed to blunt cold-induced *Crh* response [13, 17]. In contrast, the CVS group, with the highest PVN-*Crh* expression and serum corticosterone concentration, showed the expected sensitization of the HPA axis response [17, 18].

PVN-*Trh* response to cold did not show the expected cold-induced increased expression in the rRes and Cpf groups, as for *Crh*, but neither in CVS or their Cpf in contrast to *Crh* suggesting that the blunted *Trh* response is not due to the type of stressor. Cold-exposed rats showed no significant differences in serum corticosterone concentration; for corticosterone to activate GR and interact with cPKA, a time difference in its release due to sympathetic activation of the adrenal in stressed rats [28] could explain the difference, since corticosterone entrance into the brain and intracellular traffic define a narrow time window [15 and references therein], but a more rapid increase in corticosterone in PVN could repress CREB phosphorylation required for induced *Trh* transcription [15].

Cold simultaneously stimulates the synthesis of TRH in PVN neurons and releases previously synthesized and processed TRH from axon terminals at the median eminence [3, 14]. Cpf-rRes, with the highest corticosterone, had decreased TSH concentration, but not of *Trh* measured in whole PVN containing the anterior zone deficient in GR, which is not susceptible to corticosterone inhibition [14]. Lack of cold-induced TSH release in stressed rats could be due to repressed TRH release caused by glucocorticoid-induced endocannabinoid release [29, 30] and/or direct effect of corticosterone on pituitary-TSH secretion [31]. Serum T4 concentration did not increase in naïve or any cold-exposed group, as is frequently observed at short times [14]. The slight decrease detected in the rRes group could be due to increased metabolic clearance [32], which in the case of serum T3 concentration increase, was probably due to enhanced sympathetic stimulation of thyroid production of T3 [33].

The body temperature of Cpf and rRes at killing was slightly higher than in naïve rats, consistent with stress-induced hyperthermia [34]; reduction after cold exposure suggested inability to regulate temperature. Thus, combined food restriction and short-term chronic isolation stress or

restraint can dampen the responses of the central arm of the HPA and HPT axes to cold stress and alter temperature control. This was paralleled by blunted response to cold in the expression of molecules involved in BAT thermogenesis [2, 7] which are subject to multiple regulation. *Dio2* and *Ucp1* expression and/or activity is stimulated by noradrenaline and T3, but inhibited by glucocorticoids [7, 35]. Repressed signaling by glucocorticoids of noradrenaline or cAMP stimulation occurs in murine and in human adipocytes [35–37]. Changes in *Adrb3* expression may relate to downregulation by calorie restriction, chronic stress and noradrenergic activation [38–40]. Glucocorticoids interference with the adrenergic stimulation of *Dio2* and *Ucp1* expression is proposed at the transcription level [35, 36]. Although the changes detected support repression by chronic stress of cold activation of BAT, 1 h of exposure is too short to expect changes in the concentrations of thermogenic proteins due to altered gene expression and explain the drop in temperature. More immediate effects involve the phosphorylation of lipases that produce the free fatty acids required to activate UCP-1 and serve as immediate substrates for thermogenesis, a process activated by cold-induced stimulation of ADRb3 receptors and PKAc [2, 7]. Albeit speculative at the moment, activated GR interference with PKA signaling by a GR:PKAc interaction [15] could contribute to the blunting effect of cold on the expression of thermogenic genes and to a concerted effect of rapid repression at different levels of thermogenic response. Studies on longer times of cold exposure are warranted to determine the factors involved in the dynamics of the effects of chronic stress on sustained cold responses, since hypothyroid animals do not survive under prolonged cold [7, 10].

To resume, chronic stress curtailed the expected activation of the HPT axis to an energy demanding situation as acute cold exposure, producing insufficient thermogenesis at least partially due to inhibition in BAT activity of young male rats. These findings may contribute to a better understanding of human physiology, since the role of BAT on thermogenesis and energy expenditure has been revealed through fluorodeoxyglucose positron emission tomography coupled to computed tomography (FDG/PET/CT) which demonstrated that BAT size and activity are increased upon mild cold exposure [41]. BAT activity is related to thyroid status in euthyroid or hypothyroid individuals [42], and after TRH injection [43], although associations between BAT activity, cold exposure and thyrotropin or thyroid hormones are controversial due to the different conditions studied [42]. In particular, the timing of sampling and cold exposure are relevant, as hormonal release follows transient dynamics in rodents [3–6]; in man, TSH, T4 and T3 are released transiently after 30–60 min at 4 °C but not under cold air [44]. A major contribution of our work is the demonstration of acute or chronic stress-induced inhibition of the HPT axis cold response, although, as for most

work with rodents, experiments were performed during the day, which is the inactive period of rodents. In this time frame, thyroid hormones are higher and corticosterone lower than at night. However, this does affect TSH or TH release in humans, differently in men and women [45, 46]. Stress response to the FDG/PET/CT test may vary [47] and, thus, glucocorticoid release. In contrast to the inhibitory role of glucocorticoids in BAT-*Ucp1* expression in rodents [36], their acute administration to humans stimulate BAT activity and *Ucp-1* expression in cultured human brown adipocytes; however, the stimulatory effect of an adrenergic agonist is repressed by glucocorticoids in both mouse and human brown adipocytes [37]. Measurements of glucocorticoid release before and after exposure to the machine and cold might facilitate interpretation of results on TSH release.

To conclude, chronic stress curtailed the cold response of the HPT axis, as reported with previous acute stress or corticosterone injection [14, 15]. For a more persistent energy-demanding situation as voluntary exercise, the deficient response of the HPT axis is accompanied by diminished amount of fat mass loss in a sexually dimorphic manner [22]. Due to the multifactorial regulation of all the parameters involved in the activity of the HPT axis that tend to preserve circulating hormonal levels with little variations [7], studying its response to a threat provides a better understanding of its function. Stress is a high burden of modern society, a culprit of many metabolic and mental pathologies; stress-caused dysfunction of the HPT axis capacity to respond to energy demands may contribute to these pathologies.

**Acknowledgements** The authors acknowledge the technical assistance of M. Gutiérrez-Mariscal, M. Cisneros, F. Romero, R. Rodríguez Bahena, S. Ainsworth and E. López Bustos.

**Funding** The present study was supported by UNAM-DGAPA (Grant no. IN213419), CONACYT (Scholarships for graduate studies), CONACYT (Grant no. 284883).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

**Ethical approval** Maintenance and work with animals followed the Guide for the care and use of laboratory animals (8th ed.), as well as the Mexican norm NOM-062-ZOO-1999. These experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute, approval No. 273 and 318.

**Informed consent** For these animal studies consent is not required.

## References

- Morrison SF (2018) Efferent neural pathways for the control of brown adipose tissue thermogenesis and shivering. *Handb Clin Neurol* 156:281–303. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00017-5>
- Nedergaard J, Cannon B (2018) Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector. *Handb Clin Neurol* 156:137–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00009>
- Rondeel JM, de Greef WJ, Hop WC, Rowland DL, Visser TJ (1991) Effect of cold exposure on the hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines. *Neuroendocrinology* 54:477–481. <https://doi.org/10.1159/000125940>
- Hefco E, Krulich L, Illner P, Larsen PR (1975) Effect of acute exposure to cold on the activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid system. *Endocrinology* 97:1185–1195. <https://doi.org/10.1210/endo-97-5-1185>
- Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P (1993) Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 58:140–145. <https://doi.org/10.1159/000126523>
- Perello M, Stuart RC, Vaslet CA, Nillni EA (2007) Cold exposure increases the biosynthesis and proteolytic processing of prothyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus via beta-adrenoreceptors. *Endocrinology* 148:4952–4964. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0522>
- Bianco AC, Dumitrescu A, Gereben B et al (2019) Paradigms of dynamic control of thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 40:1000–1047. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00275>
- Martinez-deMena R, Anedda A, Cadenas S, Obregon MJ (2015) TSH effects on thermogenesis in rat brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 404:151–158. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.028>
- Herman JP, McKlveen JM et al (2016) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comp Physiol* 6:603–621. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>
- Fukuhara K, Kvetnansky R, Cizza G, Pacak K, Ohara H, Goldstein DS, Kopin IJ (1996) Interrelations between sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-adrenocortical/thyroid systems in rats exposed to cold stress. *J Neuroendocrinol* 8:533–541. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1996.04877>
- Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Charli JL (2015) Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress. *J Endocrinol* 224:139–159. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0593>
- Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Charli JL (2016) Advances in TRH signaling. *Rev Endocr Metab Disord* 17:545–558. <https://doi.org/10.1007/s11554-016-9375-y>
- Osterlund C, Spencer R (2011) Corticosterone pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity via multiple actions that vary with time, site of action and de novo protein synthesis. *J Endocrinol* 208:311–322. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0413>
- Sotelo-Rivera I, Jaimes-Hoy L, Cote-Vélez A, Espinoza-Ayala C, Charli JL, Joseph-Bravo P (2014) An acute injection of corticosterone increases thyrotropin-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. *J Endocrinol* 26:861–869. <https://doi.org/10.1111/jne.12224>
- Sotelo-Rivera I, Cote-Vélez A, Uribe RM, Charli JL, Joseph-Bravo P (2017) Glucocorticoids curtail stimuli-induced CREB phosphorylation in TRH neurons through interaction of the glucocorticoid receptor with the catalytic subunit of protein kinase A. *Endocrine* 55:861–871. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1223-z>
- Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 89:535–606. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2006>

17. Herman JP, Tasker JG (2016) Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Front Endocrinol* 7:137. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00137>
18. Radley JJ, Sawchenko PE (2015) Evidence for involvement of a limbic paraventricular hypothalamic inhibitory network in hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptations to repeated stress. *J Comp Neurol* 523:2769–2787. <https://doi.org/10.1002/cne.23815>
19. Gutiérrez-Mariscal M, Sánchez E, García-Vázquez A, Rebolledo-Solleiro D, Charli JL, Joseph-Bravo P (2012) Acute response of hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone neurons and thyrotropin release to behavioral paradigms producing varying intensities of stress and physical activity. *Regul Pep* 179:61–70. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.08.010>
20. Uribe RM, Jaimes-hoy L, Ramírez-Martínez C, García-Vázquez A, Romero F, Cisneros M, Cote-Vélez A, Charli JL, Joseph-Bravo P (2014) Voluntary exercise adapts the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male rats. *Endocrinology* 155:2020–2030. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1724>
21. Armario A, García-Márquez C, Jolin T (1987) The effects of chronic intermittent stress on basal and acute stress levels of TSH and GH, and their response to hypothalamic regulatory factors in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 12:399–406. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(87\)90069-2](https://doi.org/10.1016/0306-4530(87)90069-2)
22. Parra-Montes de Oca MA, Gutiérrez-Mariscal M, Salmerón-Jiménez MF, Jaimes-Hoy L, Charli JL, Joseph-Bravo P (2019) Voluntary exercise-induced activation of the thyroid axis and reduction of white fat depots is attenuated by chronic stress in a sex dimorphic pattern in adult rats. *Front Endocrinol* 10:418. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00418>
23. Fekete C, Lechan RM (2014) Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev* 35:159–194. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1087>
24. Brudzynski SM (2013) Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr Opin Neurobiol* 23:310–317. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.014>
25. Harris RBS, Jun Z, Youngblood BD, Rybkin I, Smagin GN, Ryan DH (1998) Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low and high-fat diets. *Am J Physiol* 275:R1928–R1938. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.6.R1928>
26. Flack JN, Jankord R, Solomon MB, Krause EG, Herman JP (2011) Opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular, neuroendocrine and metabolic function. *Physiol Behav* 104:228–234. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.03.002>
27. Ma XM, Lightman SL, Aguilera G (1999) Vasopressin and corticotropin-releasing hormone gene responses to novel stress in rats adapted to repeated restraint. *Endocrinology* 140:3623–3632. <https://doi.org/10.1210/endo.140.8.6943>
28. Lowrance SA, Ionadi A, Douglas MEX, Johnson JD (2016) Sympathetic nervous system contributes to enhanced corticosterone levels following chronic stress. *Psychoneuroendocrinology* 68:163–170. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.02.027>
29. Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003) Non-genomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 23:4850–4857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-12-04850.2003>
30. Farkas E, Varga E, Kovács B, Szilvási-Szabó A, Cote-Vélez A, Péterfi Z, Matziari M, Tóth M, Zelena D, Mezriczky Z, Kádár A, Kővári D, Watanabe M, Kano M, Mackie K, Rózsa B, Ruska Y, Tóth B, Máté Z, Erdélyi F, Szabó G, Gereben B, Lechan RM, Charli JL, Joseph-Bravo P, Fekete C (2020) A glial-neuronal circuit in the median eminence regulates thyrotropin-releasing hormone-release via the endocannabinoid system. *iScience* 23:100921. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100921>
31. John CD, Christian HC, Morris JF, Flower RJ, Solito E, Buckingham JC (2003) Kinase-dependent regulation of the secretion of thyrotropin and luteinizing hormone by glucocorticoids and annexin I peptides. *J Neuroendocrinol* 15:946–957. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01081>
32. Cavalieri RR, Castle JN, McMahon FA (1984) Effects of dexamethasone on kinetics and distribution of triiodothyronine in the rat. *Endocrinology* 114:215–221. <https://doi.org/10.1210/endo-114-1-215>
33. Hotta H, Onda A, Suzuki H, Milliken P, Sridhar A (2017) Modulation of calcitonin, parathyroid hormone, and thyroid hormone secretion by electrical stimulation of sympathetic and parasympathetic nerves in anesthetized rats. *Front Neurosci* 11:375. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00375>
34. Oka T (2018) Stress-induced hyperthermia and hypothermia. *Handb Clin Neurol* 157:599–621. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64074-1.00035-5>
35. Martínez-de Mena R, Calvo RM, Garcia L, Obregon MJ (2016) Effect of glucocorticoids on the activity, expression and proximal promoter of type II deiodinase in rat brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 428:58–67. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.03.021>
36. Soumano K, Desbiens S, Rabelo R, Bakopanos E, Camirand E, Silva JE (2000) Glucocorticoids inhibit the transcriptional response of the uncoupling protein-1 gene to adrenergic stimulation in a brown adipose cell line. *Mol Cell Endocrinol* 165:7–15. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(00\)00276-8](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00276-8)
37. Ramage LE, Akyol M, Fletcher AM et al (2016) Glucocorticoids acutely increase brown adipose tissue activity in humans, revealing species-specific differences in UCP-1 regulation. *Cell Metab* 24:130–141. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.014>
38. Valle A, García-Palmer FJ, Oliver J, Roca P (2007) Sex differences in brown adipose tissue thermogenic features during caloric restriction. *Cell Physiol Biochem* 19:195–204. <https://doi.org/10.1159/000099207>
39. Laukova M, Tillinger A, Novakova M, Krizanova O, Kvetnansky R, Myslivcek J (2014) Repeated immobilization stress increases expression of beta3 adrenoceptor in the left ventricle and atrium of the rat heart. *Stress Health* 30:301–309. <https://doi.org/10.1002/smi.2515>
40. Bengtsson T, Cannon B, Nedergaard J (2000) Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes. *Biochem J* 347:643–651. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3470643>
41. Ong FJ, Ahmed BA, Oreskovich SM et al (2018) Recent advances in the detection of brown adipose tissue in adult humans: a review. *Clin Sci (Lond)* 132:1039–1054. <https://doi.org/10.1042/CS20170276>
42. Santhanam P, Ahima RS, Mammen JS, Giovannella L, Treglia G (2018) Brown adipose tissue (BAT) detection by <sup>18</sup>F-FDG PET and thyroid hormone level(s)-a systematic review. *Endocrine* 62:496–500. <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1698-x>
43. Heinen CA, Zhang Z, Klieverik LP et al (2018) Effects of intravenous thyrotropin-releasing hormone on <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose uptake in human brown adipose tissue: a randomized controlled trial. *Eur J Endocrinol* 179:31–38. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0966>
44. Leppäluoto J, Pääkkönen T, Korhonen I, Hassi J (2005) Pituitary and autonomic responses to cold exposures in man. *Acta Physiol Scand* 184:255–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2005.01464.x>
45. Fischer S, Ehlert U (2018) Hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis functioning in anxiety disorders. *Syst Rev* 7:22692. <https://doi.org/10.1002/da.22692>

46. Johansson G, Laakso ML, Karonen SL, Peder M (1987) Examination stress affects plasma levels of TSH and thyroid hormones differently in females and males. *Psychosom Med* 49:390–396. <https://doi.org/10.1097/00006842-198707000-00008>
47. Vogel WV, Valdés Olmos RA, Tijs TJ, Gillies MF, van Elswijk G, Vogt J (2012) Intervention to lower anxiety of 18F-FDG PET/CT patients by use of audiovisual imagery during the uptake phase before imaging. *J Nucl Med Technol* 40:92–98. <https://doi.org/10.2967/jnmt.111.097964>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.