



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINAMICA CELULAR

“Como el estrés durante la adolescencia regula la respuesta muscular al ejercicio”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN CIENCIAS

PRESENTA

ULISES BARRERA ELIZALDE

DIRECTOR DE TESIS

DR. MARCO ANTONIO PARRA MONTES DE OCA

CUERNAVACA, MORELOS

04 de mayo de 2023

Jurado Evaluador

Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla

CIDC-UAEM

Presidente

Dr. Iván Martínez-Duncker

CIDC-UAEM

Secretario

Dr. Marco Antonio Parra Montes de Oca

IBT-UNAM

Vocal

Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo

IBT-UNAM

Suplente

Dra. Roberta Salinas Marín

CIDC-UAEM

Suplente

Este proyecto de tesis fue realizado en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Parra Montes de Oca y la asesoría de la Dra. Patricia Joseph Bravo. Financiado por CONACyT 284883 y DGAPA IN204316 e IN213419. Además, durante la estancia se contó con el Apoyo para Ayudante de Investigador SIN III No. CVU: 1187230

Agradecimientos

Al Dr. Marco Parra Montes de Oca, por dirigir mi proyecto de investigación, darme sus consejos y enseñarme las técnicas de investigación requeridas para el cumplimiento de los objetivos, así como el apoyo moral para seguir a pesar de las dificultades que estaba enfrentado.

A la Dra. Patricia Joseph, por haberme permitido la estancia en el laboratorio de neurobiología celular y molecular además de su guía, apoyo y comentarios para poder desarrollar mi proyecto de manera adecuada.

A la Dra. Roberta Salinas Marín, la Dra. Verónica Mercedes Narváez y el Dr. Iván Martínez Duncker, quienes formaron parte de mi comité tutorial y me dieron sus consejos y observaciones para poder mejorar mi proyecto de investigación.

A la Dra. Antonieta cote, la Dra. Rosa María Uribe y la Dra. Lorraine James, que también integran el laboratorio de neurobiología celular y molecular quienes me apoyaron para que mi estancia fuera más amena con sus comentarios y sugerencias para optimizar y mejorar mi proyecto, además de la ayuda con temas administrativos y de gestión de recursos.

A la Quim. Fidelia Romero, técnico académico de laboratorio quien me ayudo a mejorar mis técnicas de biología molecular, además de sus comentarios para la interpretación de resultados.

DEDICATORIA

A MIS PADRES FELIPE BARRERA Y VERENICE ELIZALDE, MI HERMANO FRANCISCO BARRERA, Y A MIS ABUELOS QUIENES ESTUVIERON CONMIGO EN ESTE CAMINO, ME APOYARON EN LAS DECISIONES QUE TOMÉ Y ME DIERON UNA RAZÓN PARA PODER LLEGAR A DONDE ESTOY Y QUE ESTARÁN CONMIGO EN ESTA CARRERA QUE HE ESCOGIDO.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides	11
2.2. Músculo esquelético	12
2.2.1 Clasificación del músculo esquelético	13
2.2.2 Regulación de la señalización de hormonas tiroideas en músculo esquelético	14
2.2.3 Expresión genética muscular dependiente de T3.....	15
2.3. Ejercicio voluntario y sus efectos en el organismo	16
2.4. Estrés	17
2.4.1. La adolescencia como etapa crítica del desarrollo ante el estrés	18
3. ANTECEDENTES.....	19
3.1. Efectos del ejercicio sobre la regulación mediada por hormonas tiroideas en músculo esquelético....	19
3.2. Efectos del estrés sobre el músculo esquelético.....	19
3.3. Efectos del estrés sobre la regulación mediada por hormonas tiroideas en músculo esquelético	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS.....	21

6.1. Objetivos particulares	21
7. METODOLOGÍA	21
7.1. Animales y tratamiento	21
7.2. Obtención de las muestras.....	22
7.3. Extracción de RNA.....	22
7.4. Remoción de DNA genómico.....	23
7.5. Obtención de DNA complementario (cDNA)	23
7.6. PRC cuantitativa en tiempo real (qPCR)	24
7.7. Determinación de la eficiencia de la qPCR.....	24
7.8. Análisis <i>in silico</i> de cebadores	25
7.9. cuantificación de genes por PCR semicuantitativa	25
7.10. Análisis estadístico.....	26
8. RESULTADOS	27
8.1. Extracción de RNA.....	27
8.2. Eliminación de DNA genómico	27
8.3. Estandarización de las condiciones para el análisis de expresión de genes por PCR tiempo real y análisis <i>in silico</i> de cebadores	28
8.3.1. Curvas estándar	28

8.3.2. Análisis in silico de cebadores utilizados	30
8.4. Análisis de la expresión de genes en músculo esquelético por PCR semicuantitativa	31
8.4.1. Expresión de Dio2	31
8.4.2. Expresión de Pgc1a	32
8.4.1. Expresión de Pnpla2	33
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
9.1. Extracción de RNA y eliminación de RNA	33
9.2. Estandarización de las condiciones para análisis de expresión de genes por PCR en tiempo real y análisis in silico de cebadores	34
9.3. Análisis de la expresión de genes en músculo esquelético por PCR semicuantitativa	35
10. CONCLUSIONES	38
11. PERSPECTIVAS	38
11. RERERENCIAS	39

1. INTRODUCCIÓN

Durante la adolescencia el cerebro muestra una gran plasticidad a los cambios en el ambiente al que el organismo está expuesto, por lo que este órgano puede verse afectado de manera positiva o negativa dependiendo del ambiente donde se encuentre. Se ha demostrado que, durante la adolescencia, las ratas tienden a ser más vulnerables al estrés crónico y como resultado muestran alteraciones en la regulación homeostática a cargo del hipotálamo (Jankord et al., 2011). Estos cambios pueden tener repercusiones en la regulación del balance energético durante la etapa adulta. El hipotálamo es la base de la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-tiroideas (HPT) encargado de controlar la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas, que regulan la obtención y distribución de sustratos metabólicos a tejidos de demanda energética (Joseph-Bravo et al., 2015). Sin embargo, ya sea estrés crónico o agudo se ha observado que este atenúa o inhibe la actividad basal del eje HPT (Joseph-Bravo et al., 2015), así como su respuesta al frío y al ejercicio en ratas adultas (Castillo-Campos et al., 2021; Parra-Montes de Oca et al., 2019)

El ejercicio voluntario es una de las situaciones de demanda energética en la cual se ha demostrado que el eje HPT tiene un papel muy importante durante la regulación del uso de energía en donde participan diferentes tejidos con alta capacidad metabólica, siendo el músculo esquelético uno de los más relevantes ya que las hormonas tiroideas regulan algunas funciones fisiológicas en este tejido como la contracción, la miogénesis y el metabolismo bioenergético (Bloise et al., 2018). Sin embargo, la exposición al estrés en un periodo de gran plasticidad neuronal como la adolescencia puede causar alteraciones en la regulación neuroendocrina lo que puede conllevar a un desequilibrio en la actividad de las hormonas tiroideas en el músculo, ya sea de forma indirecta por una desregulación en el eje HPT o de forma directa alterando la homeostasis del tejido.

El conocer cómo es que el estrés o el ejercicio voluntario pueden alterar la expresión de genes involucrados en la actividad de las hormonas tiroideas en músculo esquelético nos dará un indicio de las posibles alteraciones que intervienen en la reducción de la homeostasis, la conexión con el eje HPT y su respuesta al ejercicio

voluntario. En este trabajo de tesis se analizó por PCR semicuantitativa la expresión de los genes *Dio2*, *Pgc1a* y *Pnpla2* en el músculo Soleus de ratas adultas que fueron sometidas a estrés crónico variable durante la adolescencia y que realizaron ejercicio voluntario de acuerdo con el protocolo descrito en Uribe et al., (2014). Esto realizado en ratas macho y hembras debido al dimorfismo sexual en el periodo de adolescencia (Schneider, 2013) y en la actividad del eje HPT (Parra-Montes de Oca et al., 2021).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides

El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) regula la tasa metabólica por medio de la síntesis y liberación de hormonas tiroideas que regulan la obtención y distribución de sustratos a tejidos de demanda energética (Joseph-Bravo et al., 2015). A nivel central, este eje neuroendocrino está regulado por neuronas hipofisiotróficas TRHérgicas, ubicadas en la zona media y caudal del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) en ratas (Kádár et al., 2010). Estas neuronas TRHérgicas traducen señales hormonales a señales neuronales que modulan la síntesis y liberación de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) que después es secretada en el espacio pericapilar de la zona externa de la eminencia media para el transporte a los tirótrofos en la pituitaria anterior (Fekete & Lechan, 2014), donde la TRH interactúa con su receptor regulando la síntesis y liberación de tirotrópina (TSH) que es liberada en la circulación sanguínea llegando a la tiroides donde por último esta actúa regulando la síntesis y liberación de tiroxina (T4) y triiodotironina (T3).

La entrada de T4 y T3 a la célula no es de forma pasiva, su entrada esta mediada por las proteínas de transmembrana denominadas transportadores de monocarboxilato 8 y 10 (MCT8 y MCT10) que se ha demostrado son unas de las principales vías de entrada de las hormonas tiroideas (Visser et al., 2011).

La tiroides sintetiza y secreta en una mayor proporción T4 con respecto a T3, pero debido a que la T3 es la forma biológicamente activa, la T4 es convertida a T3 por acción de enzimas denominadas deiodinasas (DIO), las cuales permiten la modulación pre-receptora de la señal hormonal específica del tiempo y del tejido.(Vaitkus et al., 2015).

Las hormonas tiroideas regulan el metabolismo energético y otras funciones fisiológicas en diferentes tejidos como el cerebro, los tejidos adiposos blanco y marrón, el hígado, el páncreas y músculo esquelético por mencionar algunos. Algunas de las acciones que ejercen en estos tejidos son la regulación de la gluconeogénesis, lipólisis, niveles de colesterol, termogénesis y el gasto energético en reposo (Mullur et al., 2014).

2.2. Músculo esquelético

El músculo esquelético se adhiere al hueso por tendones, y juntos producen todos los movimientos del cuerpo (Dave et al., 2022). Comprende aproximadamente el 40% del peso corporal total en humanos y contiene aproximadamente entre el 50% a 75% de las proteínas totales del cuerpo (Frontera & Ochala, 2015).

Desde un punto de vista mecánico, la función principal del músculo es la de convertir la energía química en energía mecánica para realizar acciones como las del mantenimiento de la postura y la generación de movimiento que influye en la actividad física y la independencia funcional. Desde una perspectiva metabólica el músculo esquelético contribuye en el metabolismo basal del organismo, como un reservorio de sustratos tales como aminoácidos y carbohidratos; tiene la capacidad de producir calor para la conservación de la temperatura corporal, además de que consume gran parte de las reservas energéticas y de oxígeno durante la actividad física (Frontera & Ochala, 2015).

El músculo está formado por varios haces de fibras musculares, que representan una célula muscular, las cuales contienen miofibrillas a su vez conformadas por miofilamentos de actina y miosina (Dave et al., 2022; Mukund & Subramaniam, 2020). Los haces de fibras musculares forman los fascículos, que a su vez forman haces que conforman el tejido muscular, con cada capa encapsulada sucesivamente por la matriz extracelular y apoyado por las redes citoesqueléticas. El músculo está rodeado por una capa de tejido conectivo llamado epimisio y el grupo de fibras dentro de ese músculo que están dispuestos en haces están redondeados por otra capa de tejido conectivo conocido como el perimisio (Figura 1) (Frontera & Ochala, 2015).

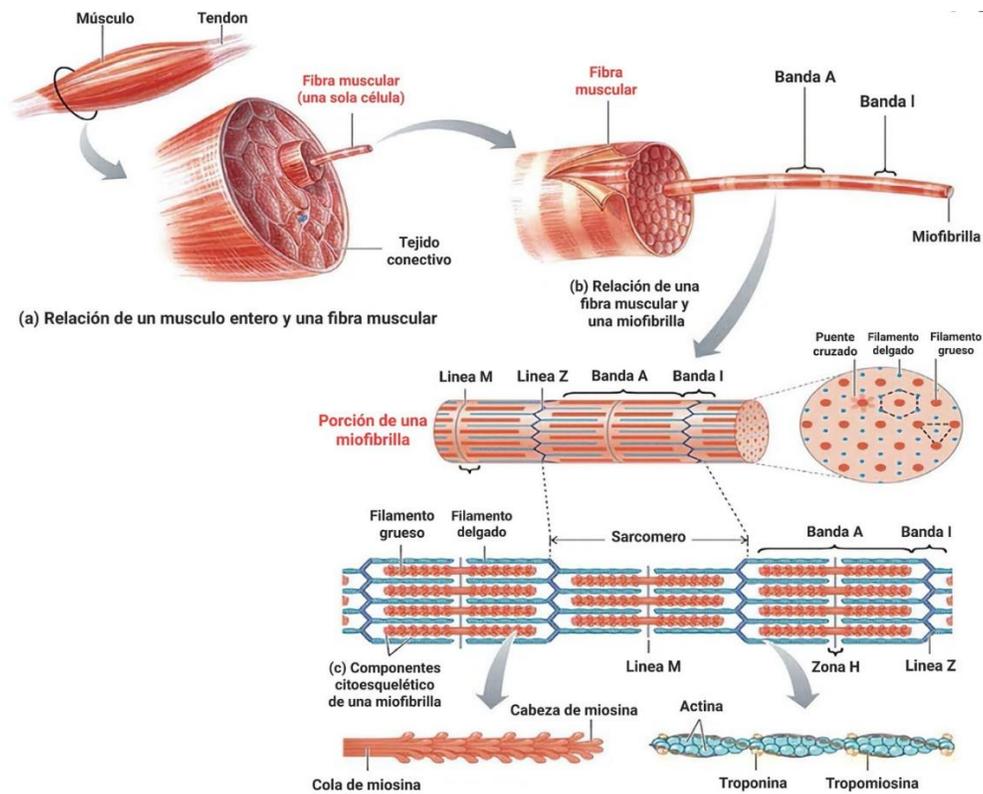


Figura 1. Organización del músculo esquelético. Modificado de Frontera & Ochala, (2015)

2.2.1 Clasificación del músculo esquelético

El músculo esquelético puede clasificarse con respecto a la velocidad de contracción y su principal vía de producción de ATP. Este puede estar compuesto de un solo tipo de fibra muscular o presentar varios tipos dependiendo de las características y el desempeño que este tenga. Las fibras de tipo I generan una contracción sostenida, denominada contracción lenta, mientras que las fibras de tipo II realizan una contracción por cortos periodos, por lo que se denominan fibras de contracción rápida, estas últimas a su vez pueden ser subclasificadas en fibras de tipo IIa, IIx y IIb (Talbot & Maves, 2016). Las fibras tipo I tienen un metabolismo oxidativo, más mitocondrias y mioglobina, mientras que las fibras de tipo II son más glucolíticas y contienen mayores niveles de glucógeno y fosfocreatina, además que se ha observado que la actividad de la ATPasa es más elevada en fibras de tipo IIb con respecto a las de tipo IIa y IIx que a su vez tiene más actividad que las fibras de tipo I (Bloise et al., 2018).

La tasa de contracción y relajación de las fibras musculares está dada por la captación y liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, el cual está menos desarrollado en las fibras de tipo I en comparación con el retículo sarcoplásmico de las fibras de tipo II, además que la expresión ATPasa de Ca^{2+} tipo 1 (SERCA1) se asocia con un almacenamiento de Ca^{2+} más rápido en comparación con la expresión ATPasa de Ca^{2+} tipo 2 (SERCA2) presentes en las fibras de tipo II y I respectivamente (Bloise et al., 2018).

Uno de los factores más importantes para la diferenciación y clasificación de las fibras musculares es la expresión de la cadena pesada de miosina (MYH) la proteína motora más abundante en humanos y roedores, donde las fibras de tipo I expresan la MYH7, las fibras tipo IIa expresan la MYH2, las fibras tipo IIx expresan la MYH1 y las fibras tipo IIb expresan la MYH4 (Talbot & Maves, 2016) (Figura 2).

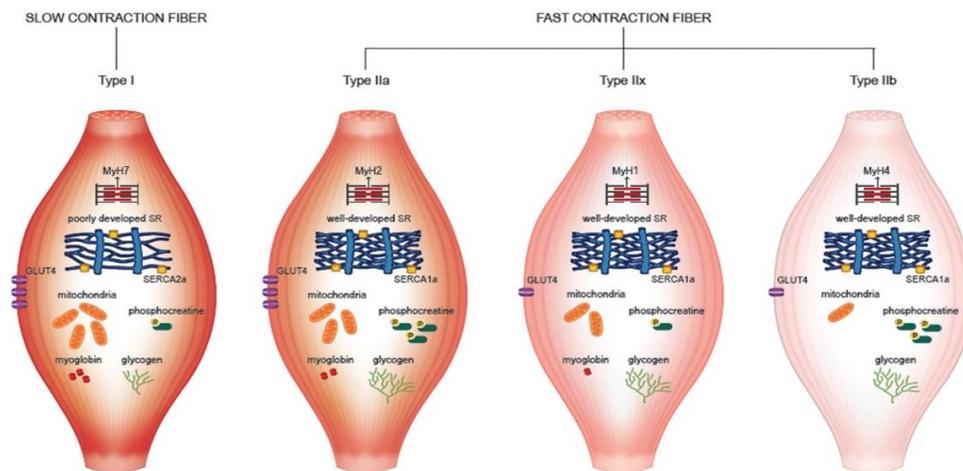


Figura 2. Características de los diferentes tipos de fibras musculares. Obtenido de Bloise et al., (2018)

2.2.2 Regulación de la señalización de hormonas tiroideas en músculo esquelético

La señalización de las hormonas tiroideas para el desarrollo, homeostasis y regeneración del músculo esquelético ocurre por la interacción de T3 con receptores nucleares de hormona tiroidea para la regulación de la expresión genética. MCT8 y MCT10, así como las enzimas DIO2 y DIO3 se expresan en músculo esquelético y juegan un papel importante en la regulación y control de las acciones que tienen las hormonas tiroideas, al encargarse de la captación y activación / desactivación local de T4 y T3 (Salvatore et al., 2014).

Intracelularmente las enzimas DIO median en gran medida el metabolismo de las hormonas tiroideas, ya que se ha demostrado que la T3 generada por DIO2 contribuye enormemente en las concentraciones intracelulares en músculo esquelético, donde su participación es mayor que la T3 proveniente de la circulación sistémica (Marsili et al., 2011), mientras que DIO3 inactiva T3 ajustando así la regulación intracelular de T3 (Ogawa-Wong et al., 2022).

2.2.3 Expresión genética muscular dependiente de T3

En el músculo esquelético, el principal modo de acción de las hormonas tiroideas es a través de la estimulación o inhibición de la transcripción genómica dependiente de la interacción de T3 con sus receptores nucleares mediada por el receptor de hormona tiroidea 1 alfa (THR1 α) (Nicolaisen et al., 2020). Los receptores de la hormona tiroidea se unen en el estado no acoplado a los elementos que responden a las hormonas tiroideas en los genes regulados por las hormonas tiroideas, por lo general formando heterodímeros con el receptor retinoide X (Castillo et al., 2004). Cuando la T3 se une a su receptor se inhibe la represión y estimula la transcripción con el reclutamiento de coactivadores (Salvatore et al., 2014).

Algunas de las proteínas cuya expresión está regulada transcripcionalmente por T3 en músculo esquelético son SERCA1a, SERCA2a (Hartong et al., 1994), la proteína de desacoplamiento 3 (UCP3) (Solanes et al., 2005), importante en el proceso de termogénesis; el transportador de glucosa 4 (GLUT4) (Zorzano et al., 2005), principal transportador de glucosa en músculo; la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa muscular (mGPDH) (Dümmler et al., 1996), que se expresa abundantemente en mitocondrias musculares y la MYH7, la cual es transcripcionalmente inhibida por la presencia de T3 (Salvatore et al., 2014). Además, se ha reportado que las hormonas tiroideas pueden reclutar/promover la expresión de ATGL, una enzima que participa en la primera reacción de la lipólisis, (Grasselli et al., 2016).

El efecto global de las hormonas tiroideas sobre la capacidad mitocondrial está relacionado con la transcripción mediada por T3 del gen que codifica al coactivador del receptor- γ activador del proliferador de peroxisomas-1 α (PGC-1 α), importante en la regulación de la biogénesis mitocondrial (Wulf et al., 2008).

La señalización de las hormonas tiroideas regula la expresión de una amplia gama de genes con funciones centrales en la homeostasis, función y metabolismo del músculo esquelético; sin embargo, existen situaciones las cuales pueden influir de forma positiva o negativa en la regulación a cargo del eje HPT, por ejemplo, se ha demostrado que la exposición al frío o al ejercicio incrementan la actividad del eje HPT, pero situaciones como el estrés o el déficit energético disminuyen considerablemente la actividad del eje (Kilburn-Watt et al., 2010; Parra-Montes de Oca et al., 2021).

2.3. Ejercicio voluntario y sus efectos en el organismo

El ejercicio voluntario se define como la actividad locomotora que no se requiere directamente para la supervivencia o la homeostasis y no está motivada directamente por ningún factor externo (Garland et al., 2011).

Estudios realizados en ratones adultos que corrían en rueda de manera voluntaria mostraron una mejora en la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, esto en comparación con la actividad en el laberinto de agua o ejercicio forzado (van Praag et al., 1999). Se ha visto que en ratas que también corren en rueda voluntariamente incrementan los niveles de mRNA de BDNF, en zonas como el hipotálamo, el hipocampo, la medula espinal, el cerebelo y el córtex (Leite et al., 2016; Perreau et al., 2018; Van Kummer & Cohen, 2015) el cual promueve la diferenciación y la extensión de neuritas, la supervivencia de una variedad de poblaciones neuronales en cultivo, y la sinaptogénesis (Cotman & Berchtold, 2002; Park & Poo, 2013), sugiriendo que el ejercicio voluntario tiene un efecto directo en el SNC ayudando en el mantenimiento del tejido y la promoción de la plasticidad cerebral (Anish, 2005). También se ha discutido la implicación del ejercicio como método antidepresivo debido a que se demostró sus efectos en la reducción del dolor y la mejora de estado de ánimo en hombres corredores de largas distancias (Janal et al., 1984).

Se ha demostrado que el ejercicio tiene acciones en la regulación del eje HPT, ya que ratas macho adultas expuestas a ejercicio crónico voluntario muestran un incremento en los niveles de expresión de *Trh* el núcleo paraventricular del

hipotálamo proporcionales al ejercicio realizado, además que ratas hembra expuestas al mismo paradigma tuvieron un incremento en los niveles séricos de TSH y T4 (Uribe et al., 2014; Parra-Montes de Oca et al., 2019). Así mismo, se ha observado que el ejercicio agudo en banda para correr puede incrementar los niveles de las hormonas tiroideas significativamente después de 30 minutos de ejercicio (Fortunato et al., 2008).

A nivel sistémico se ha observado que el ejercicio tiene grandes beneficios en músculo como el aumento de la masa muscular, la lipólisis, la fuerza, la sensibilidad a la insulina y la capacidad de regeneración, además que promueve la densidad mitocondrial y su funcionamiento (Distefano & Goodpaster, 2018). También se ha demostrado que en este mismo tejido el ejercicio incrementa la expresión de Dio2 (Bocco et al., 2016), PGC1a (Lira et al., 2010), MCT8 (Giacco et al., 2020), SERCA1a (Morissette et al., 2014), GLUT4 (Richter & Hargreaves, 2013), UCP3 (Jones et al., 2003) y la fibronectina tipo III con 5 dominios la cual promueve la liberación de irisina que induce el pardeamiento del tejido adiposo blanco resultando en un incremento de la capacidad termogénica (Archundia-Herrera et al., 2017).

2.4. Estrés

El estrés se define como la interrupción de la homeostasis corporal provocado por situaciones que alteran dicho equilibrio, conocidas como estresores (Selye, 1976), estos factores pueden ser clasificados como estresores fisiológicos o físicos y estresores psicológicos. Los primeros se asocian con el daño potencial del organismo, lo que lleva a la activación de mecanismos reguladores que sirven para restaurar la homeostasis, ejemplos de estos son el frío, el calor, las lesiones, las enfermedades crónicas e incluso el dolor (Kogler et al., 2015; Yuan et al., 2005). Los estresores psicológicos son circunstancias ambientales, sociales y físicas que desafían las capacidades y recursos adaptativos de un organismo que no atentan contra la vida de este, son cualquier emoción incómoda acompañada de cambios bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento predecibles, por ejemplo la anticipación/reconocimiento de depredadores o el peligro asociado con nuevos entornos como una capacidad innata o aprendida de los animales (Engelmann et al.,

2004; Monroe & Slavich, 2016; Wynne et al., 2019). El estrés también puede clasificarse en relación al tiempo de exposición, siendo el estrés crónico aquel en el que el tiempo de exposición es de días, semanas o incluso años; y el estrés agudo el cual el tiempo de exposición es de segundos, minutos u horas (Eggers, 2007; Hammen et al., 2009). La respuesta al estrés, tanto psicológico como físico, está dada principalmente por dos sistemas hormonales que ayudan al organismo a enfrentar estas situaciones. El sistema nervioso simpático con acciones rápidas por la liberación de epinefrina y norepinefrina al torrente sanguíneo que median la respuesta de “huida o lucha”. Y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) que produce una respuesta hormonal más lenta que inicia en el PVN con la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que a nivel de la hipófisis regula la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) al torrente sanguíneo que llega a las glándulas suprarrenales donde estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en muchas especies de roedores) que median respuestas como la movilización de las reservas de energía, la mejora de las reacciones inmunes y el aumento de las capacidades de aprendizaje y memoria (Romeo, 2013).

2.4.1. La adolescencia como etapa crítica del desarrollo ante el estrés

La adolescencia se define como un periodo de transición donde los individuos pasan de la niñez a la adultez, durante este periodo ocurren cambios fisiológicos, neurológicos y conductuales que preparan al individuo para su supervivencia en la etapa adulta (Spear, 2000). Se ha sugerido que entre el periodo prepuberal y la adultez se encuentra la etapa donde la respuesta al estrés por el eje HPA es altamente plástica. Aún no está claro qué regula estos cambios en la reactividad al estrés ni qué impactos pueden tener en un individuo adolescente, sin embargo, esta serie de eventos plásticos que ocurren durante esta etapa hacen que sea altamente vulnerable al estrés (Romeo, 2013); se ha demostrado que ratas prepuberales tienen una respuesta del eje HPA al estrés agudo muy exagerada y el retorno a los valores basales de hormonas del estrés después de la exposición es más lento en comparación con las ratas adultas tanto en estrés agudo (Goldman et al., 1973; Romeo et al., 2004) como estrés crónico (Romeo et al., 2006).

3. ANTECEDENTES

3.1. Efectos del ejercicio sobre la regulación mediada por hormonas tiroideas en músculo esquelético

En un paradigma de ejercicio aeróbico en cinta de correr se ha observado que los niveles de mRNA de *Dio2* en músculo Soleus no presentaron cambios significativos, mientras que los niveles de *Dio3* tendían a disminuir en las ratas macho ejercitadas comparadas con el grupo control, también se observó que los niveles de mRNA de los receptores de las hormonas tiroideas *Thra1* y *Thrb1* no tuvieron cambios significativos (Torres Solis, 2022, tesis de maestría).

En el paradigma de ejercicio voluntario se ha observado que hay un aumento en los niveles de expresión de *Dio2* y *Pgc1a* en músculo gastrocnemius en comparación con su grupo control sedentario en machos y hembras (Parra-Montes de Oca et al., en preparación).

3.2. Efectos del estrés sobre el músculo esquelético

Se ha demostrado que el estrés puede afectar la regulación de la homeostasis de varios tejidos y órganos. En el músculo esquelético se sabe que el estrés puede inducir una disminución más temprana de la fuerza muscular (Poornima et al., 2014) y se ha propuesto que también puede intervenir en la reducción de la masa e incrementar la apoptosis celular del músculo (Deldicque, 2013), esto debido a que las hormonas en respuesta al estrés pueden promover el catabolismo de las proteínas en músculo esquelético (Gore et al., 1993) además que el estrés puede promover el daño oxidativo en el músculo esquelético e intervenir en su calidad y función (Srivastava & Kumar, 2015; Steinbacher & Eckl, 2015).

3.3. Efectos del estrés sobre la regulación mediada por hormonas tiroideas en músculo esquelético

Existen enfermedades críticas las cuales inducen cambios en el eje hipotálamo-pituitaria anterior-hormonas periféricas, incluyendo la disminución de los niveles de las hormonas tiroideas en plasma sin un incremento considerable de TSH. A esta condición se le ha denominado como “síndrome de enfermedad no tiroidea” (NTIS,

por sus siglas en ingles) (Bloise et al., 2018). Es bien sabido que el metabolismo a cargo de las hormonas tiroideas a nivel de músculo esquelético es afectado durante el NTIS, por ejemplo, en modelos de ratón, la expresión del trasportador de hormonas tiroideas es baja durante una sepsis bacteriana o la inflamación aguda, sin embargo, se mantiene sin cambios durante una inflamación crónica. Cambios similares fueron observados en pacientes durante estrés quirúrgico agudo comparados con pacientes con una enfermedad prolongada donde la expresión de MCT8 era considerablemente baja (Mebis et al., 2009).

Por otra parte se ha observado que la inflamación aguda en ratones incrementa los niveles de mRNA de *Dio2* en músculo esquelético, mientras que una sepsis bacteriana disminuye los niveles de mRNA de *Dio2* tanto en ratón (Kwakkel et al., 2009) como en humanos (Rodriguez-Perez et al., 2008).

En un paradigma de estrés durante la adolescencia y ejercicio voluntario en la etapa adulta en ratas los niveles de *Dio2* y *Pgc1a* se ven afectados por el estrés, ya que tanto en machos como en hembras se reprime su expresión (Parra-Montes de Oca et al., en preparación).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la adolescencia existe un periodo de gran plasticidad neuronal que prepara al organismo para la adultez, además que en esta etapa la regulación de la respuesta al estrés es exacerbada con lo cual estos dos factores podrían conllevar a un mal funcionamiento neuroendocrino que podría alterar las funciones metabólicas en la etapa adulta, afectando la regulación de las respuestas hormonales a situaciones de demanda energética que están controladas por la acción de las hormonas tiroideas (por ejemplo, el ejercicio voluntario) a través de una desregulación de la transcripción de genes involucrados en la actividad de estas hormonas para una mayor eficiencia en la respuesta al ejercicio.

5. HIPÓTESIS

El estrés durante la adolescencia atenúa la expresión de genes involucrados en la actividad de las hormonas tiroideas a nivel de músculo esquelético.

6. OBJETIVOS

Analizar el efecto del ejercicio voluntario en la expresión de genes involucrados en la actividad de las hormonas tiroideas en músculo esquelético (Soleus) de ratas adultas sometidas a estrés crónico variable durante la adolescencia.

6.1. Objetivos particulares

1. Establecer las condiciones para el análisis por PCR semicuantitativa de genes involucrados en la actividad de las hormonas tiroideas (*Dio2*, *Pnpla2* y *Pgc1a*) en músculo esquelético (Soleus) de rata.
2. Determinar si el ejercicio voluntario o el estrés durante la adolescencia producen cambios dependientes del sexo en las expresiones de genes involucrados en la actividad de las hormonas tiroideas en músculo esquelético (Soleus) de rata.

7. METODOLOGÍA

7.1. Animales y tratamiento

Las muestras obtenidas para este proyecto provienen de un trabajo previo (Parra Montes de Oca, 2022, tesis de doctorado). Ratas Wistar macho (N = 36) y hembra (N = 36) de 30 días post natales (DPN) se dividieron en dos grupos, un grupo expuesto a estrés crónico variable (ECV) (n = 18) durante la etapa adolescente (machos del DPN 30 a 70 y hembras del DPN 30 al 60) y un grupo control (C) (n = 18) sin manipulación, después a los grupos se les dio 2 semanas de descanso y se subdividieron en 3 grupos, un grupo sedentario con alimentación *ad libitum* (Sed, n = 6), un grupo ejercitado (Ex, n = 6) el cual realizó ejercicio de manera voluntaria en una rueda de ejercicio durante su periodo de actividad durante 14 días; y un grupo de alimentación pareada al ejercicio, debido a que el ejercicio disminuye el consumo de alimento y esto puede afectar la actividad del eje HPT (Uribe et al., 2014). El sacrificio se llevó a cabo a los 98 DPN en el caso de los machos y 88 DPN en el caso de las hembras.

7.2. Obtención de las muestras

El día del sacrificio se recolectaron los diferentes órganos de interés, de los cuales para este proyecto nos centramos en el músculo Soleus. Los órganos se conservaron en ultracongelación a -80°C hasta el día de los ensayos.

7.3. Extracción de RNA

Para la obtención del RNA se utilizó el protocolo de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo modificado de Chomczynski & Sacchi, (2006), en donde las muestras conservadas se homogenizaron por sonicación en solución D (la cual contenía tiocianato de guanidina) con β -mercaptoetanol para la desnaturalización de proteínas y ruptura de puentes de disulfuro; posteriormente se adicionó acetato de sodio pH 4 para la acidificación del medio y así promover la extracción del RNA; luego se añadió fenol saturado en medio ácido (pH = 4), esto para ayudar a homogenizar, lisar tejidos, desnaturalizar proteínas y precipitarlas junto con lípidos y otras macromoléculas, además de la remoción de contaminantes como sales y otras impurezas. Después con una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico y centrifugación a 10000 g por 22 min a 4°C se procedió con la separación de fases (fase acuosa que contenía el ARN y fase orgánica que contenía proteínas y DNA) por acción del cloroformo y la prevención de la emulsificación de la solución por el alcohol isoamílico para así recuperar la fase acuosa. Posteriormente se realizó una extracción y precipitación del RNA con isopropanol y centrifugación a 13500 g por 30 min a 4°C para conseguir un pellet de RNA y la separación de las sales en la suspensión; después se hizo un segundo tratamiento con solución D con β -mercaptoetanol, para ayudar a la eliminación de proteínas residuales, con una segunda precipitación de RNA con isopropanol y centrifugación a 13500 g por 30 min a 4°C para conseguir un pellet de RNA para después hacer un lavado con etanol al 70% y centrifugación a 13500 g por 15 min a 4°C y posteriormente decantar para eliminar contaminantes residuales. Finalmente se realizó una resuspensión de RNA en agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC) para la inactivación de RNasas y se realizó una lectura en el Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) para obtener la concentración de RNA y las relaciones 260/280 y 260/230 para el análisis de las proporciones de proteínas y sales respectivamente.

7.4. Remoción de DNA genómico

Para la remoción del DNA genómico que pudiera quedar después de la extracción de RNA se utilizó el kit Rapid ADN Removal (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones que estableció el fabricante y escalando las proporciones de los reactivos para la cantidad de RNA utilizado.

Para cada muestra de RNA de hasta 25 μL se le añadió 3 μL de 10x DNasa buffer con MgCl_2 , 1.5 μL de DNasa I y agua libre de nucleasas hasta un ajuste de 29.5 μL . Posteriormente se les llevo a agitación gentil por vortex y se incubaron a 37°C por 30 minutos.

Para la remoción de DNasa se añadieron a las muestras 3 μL de agente de remoción de DNasa (DDR), después se procedió a incubar las muestras a temperatura ambiente por 2 minutos mezclando gentilmente de 2 a 3 veces para resuspender el DDR donde posteriormente se centrifugo a 800 g de 0.5 a 1 minuto para separar la fase acuosa que contenía el RNA y la fase que contenía el DDR y la DNasa para después transferir a otro tubo. Por último, se realizó una lectura en el Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) para obtener la concentración de RNA y las relaciones 260/280 y 260/230 para el análisis de las proporciones de proteínas y sales respectivamente. Para la verificación de la integridad del RNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se analizó la integridad del RNA ribosómico (RNAr) 28s y 18s.

7.5. Obtención de DNA complementario (cDNA)

A partir del RNA obtenido de las muestras de todos los grupos se realizaron ensayos de retrotranscripción (RT) para la obtención de cDNA. Para este fin se realizaron mezclas para RT para cada tubo preparadas como indica la tabla 1. Los tubos de RNA total (1 μg / 12 μl de agua DEPC) se calentaron a 65°C por 5 minutos, después se dejaron reposar en hielo por 5 minutos y se les dio un pulso en el vortex. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 10 μl de la mezcla para RT y se incubaron por 50 minutos a 37°C. Por último, estas muestras se almacenaron a -20°C para la realización de los siguientes ensayos.

Tabla 1. Preparación de las mezclas para retrotranscripción

Reactivo	Volumen (µl)
Oligo (dT)	1
Agua DEPC	5
Buffer de reacción	2
dNTP's	1
Retrotranscriptasa	1

7.6. PRC cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para este estudio se utilizaron cebadores contra los genes de *Dio2*, *Pgc1a*, *Slcl6a2* (MCT8), *Thra1*; y contra los genes de referencia *Ppia* (Ciclofilina A) y *Hprt1* (HPRT1). Cada tubo contenía los cebadores Forward y Reverse (0.5 µl), 6 µl de Master mix 2x, 2.6 µl de agua para biología molecular y 3 µl de cDNA. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador Rotor-Gene Q real-time PCR system (QIAGEN) con las siguientes condiciones: Tm de 60°C, 40 ciclos de tres minutos a 95°C, cinco segundos a 95°C, veinte segundos a la Tm establecida y veinte segundos a 72°C.

Tabla 2. Cebadores utilizados para el análisis de PCR en tiempo real

Genes	Cebador sentido / anti-sentido	Longitud de amplicón
<i>Ppia</i>	GCT GGA CCA AAC ACA AAT GG / CTC CTG AGC TAC AGA AGG AAT G	245 pb
<i>Hprt1</i>	GGC CAG ACT TTG TTG GAT TTG / TAG ATG GCC ACA GGA CTA GAA	219 pb
<i>Dio2</i>	ACA CCC GTT GAT CCC TTT AC / GCT GGC CTA AGT CTT CCT TTA T	408 pb
<i>Slcl6a2</i>	CAG GAG GCA AAC CAG GAA TAT C / TGG CTG CAA ACA CCA CTA TC	295 pb
<i>Pgc1a</i>	CAG CTC CAA GAC CAG GAA AT / CCC AAG GGT AGC TCA GTT TAT C	223 pb
<i>Thra1</i>	CTG TTA ATG TCA ACA GAC CGC T / CGA TCA TGC GGA GGT CAG TC	166 pb

7.7. Determinación de la eficiencia de la qPCR

Para la determinación de la eficiencia de la reacción primero se realizaron diluciones seriadas de 1:3 a partir de un stock de cDNA, proveniente del músculo Soleus de las ratas control, con una concentración de 1 µM/µl hasta una dilución 1:243, esto para cada gen de interés y los genes de referencia, todas las reacciones se realizaron por duplicado. Con esto se realizaron ensayos de qPCR como se reportó

en el apartado 7.6. Después de los ensayos de qPCR se determinaron los Ct para cada dilución de cada gen donde por último se obtuvo el gráfico de Ct contra el logaritmo de la concentración para la determinación de la curva estándar. La eficiencia de la reacción se calculó al graficar la tendencia lineal entre los puntos de la curva estándar para sacar así su ecuación (Operaciones realizadas por el mismo programa del equipo).

$$CT = M * \log_{10}[DNA] + B$$

Conociendo la pendiente de la ecuación de la curva estándar se calculó la eficiencia de la reacción a partir de la siguiente ecuación (operaciones realizadas por el equipo).

$$E = -1 \times 10^{\frac{-1}{M}}$$

7.8. Análisis *in silico* de cebadores

El análisis del diseño de cebadores utilizados se hizo con ayuda del software Primer-Blast (NCBI) y como organismo blanco *Rattus norvegicus* (taxid:10116). También nos apoyamos del uso de la herramienta Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher) con una sensibilidad de 1 para la detección de complementariedad y posible dimerización de los cebadores.

7.9. cuantificación de genes por PCR semicuantitativa

Para este estudio se utilizaron cebadores contra el gen *Pnpla2* (ATGL), *Dio2* y *Pgc1a* y contra el gen de referencia de *Ppia* (Ciclofilina A). Cada tubo contenía un mix con los volúmenes indicados en la tabla 3. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador TC9639 (Benchmark) con las siguientes condiciones: 24 ciclos con una Tm de 58°C para ATGL, 29 ciclos con una Tm de 64°C para Dio2, 27 ciclos con una Tm de 64°C para Pgc1a y 21 ciclos con una Tm de 64°C para Ciclofilina A, cada ciclo de un minuto a 95°C, veinte segundos a la Tm establecida y un minuto a 72°C.

Tabla 3. Preparación de las mezclas para PCR semicuantitativa

Reactivo	ATGL, Dio2 y Pgc1a Volumen (µl)	Ciclofilina A Volumen (µl)
Agua	20.2	35
Buffer	3	5
Primer sentido	0.6	1
Primer anti-sentido	0.6	1
dNTP's	0.6	1
MgCl ₂	1.5	2.5
Taq polimerasa	0.3	0.5

Tabla 4. Cebadores utilizados para el análisis de PCR semicuantitativa

Genes	Cebador sentido / anti-sentido	Longitud de amplicón
<i>Dio2</i>	GAT GCT CCC AAT TCC AGT GT/ AGG CTG GCA GTT GCC TAG TA	181 pb
<i>Pnpla2</i>	TGT GGC CTC ATT CCT CCT AC / AGC CCT GTT TGC ACA TCT CT	271 pb
<i>Pgc1a</i>	ATG GAG TGA CAT AGA GTG TGC / GTG CTA AGA CCG CTG CAT TC	459 pb

Después se realizaron alícuotas de cada muestra con 4 µl de la reacción de PCR para Ciclofilina A más 12 µl de la reacción de PCR para ATGL. Estas alícuotas se les realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para posteriormente analizar las bandas por densidad óptica en el software Image Lab (Bio Rad) y obtener el volumen de absorción de las bandas y calcular el índice ATGL/CYC, Dio2/CYC y Pgc1a/CYC.

7.10. Análisis estadístico

Los resultados de expresión de genes se expresan en promedio normalizado al 100% con respecto al grupo control sedentario (C-Sed) ± su error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 8 usando ANOVA de 3 vías tomando como factores el estrés, la actividad física y el sexo. Se consideró un nivel de significancia $P > 0.05$ y se utilizó la prueba de Tukey para la diferencia de medias

8. RESULTADOS

8.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó de manera eficiente ya que al momento de analizar la relación 260/280 (identificación de proteínas y compuestos aromáticos) y la relación 260/230 (identificación de sales y solventes) las muestras entraron dentro de los niveles de aceptación ($260/280 > 1.8$; $260/230 > 1$) (Figura 3).

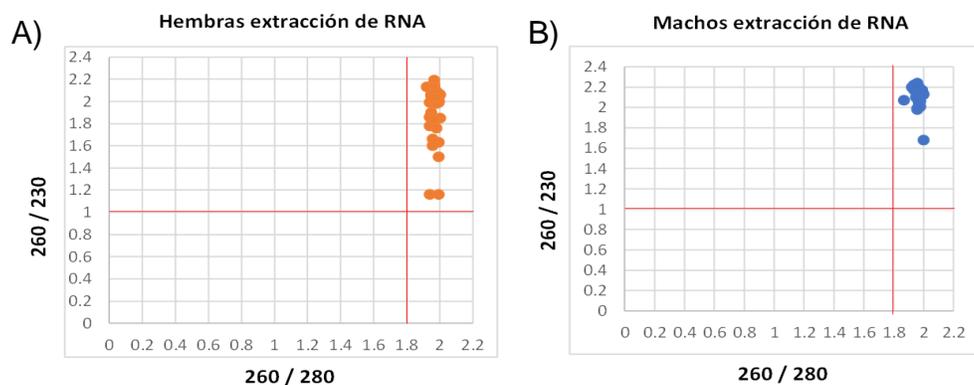


Figura 3. Gráfico de dispersión de relaciones 260/230 y 260/280 de cada muestra de RNA. Los estándares designados están delimitados por las líneas rojas.

8.2. Eliminación de DNA genómico

Al realizar la eliminación de DNA genómico, se procedió a verificar las relaciones 260/280 y 260/230. Después del análisis, solo una de las muestras del grupo ECV-Ex de las hembras no cumplió con el estándar 260/230 ($X = 0.92$), pero todas las demás muestras tanto de hembras como machos cumplieron con los estándares (Figura 4).

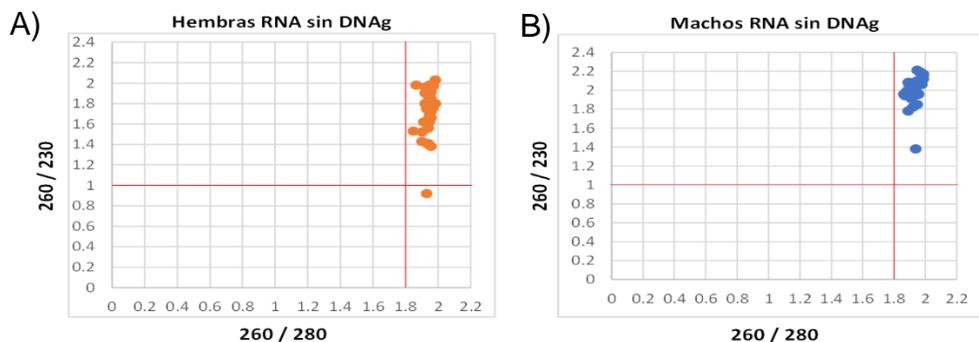


Figura 4. Gráfico de dispersión de relaciones 260/230 y 260/280 de cada muestra de RNA después de la eliminación de DNA genómico. Los estándares de aceptabilidad están definidos por las líneas rojas.

Para evaluar la integridad del RNA total después del procedimiento de eliminación de DNA genómico, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se analizó la densidad óptica de las bandas de RNA ribosómico 28s y 18s (Figura 5A-B) El análisis arrojó que solo una muestra del grupo C-Ex no cumplió con el estándar establecido ($X = 1.425$), las demás muestras cumplieron con el índice de aceptación para ambos sexos (Figura 5C-D).

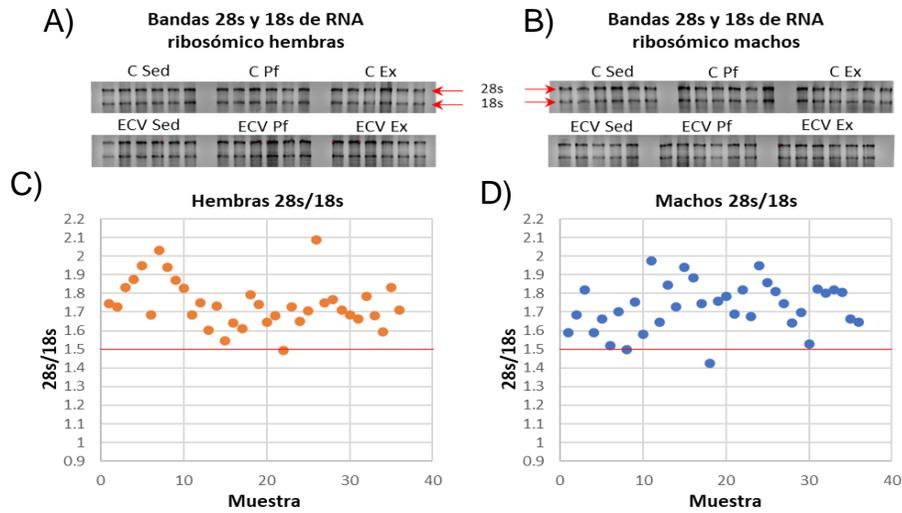


Figura 5. Integridad del RNA extraído. A-B, Bandas de RNA 28s y 18s en electroforesis en gel de agarosa de las muestras de hembras y machos respectivamente. C-D, Gráfico de dispersión de la relación 28s/18s de cada una de las muestras de RNA después de la eliminación de DNA genómico con marcas de los estándares de aceptabilidad designados delimitados por líneas rojas.

8.3. Estandarización de las condiciones para el análisis de expresión de genes por PCR tiempo real y análisis in silico de cebadores

8.3.1. Curvas estándar

Se pudo observar que las muestras con cebadores dirigidos contra *Ppia*, *Thra1*, *Hprt* y *Slc16a2* (MCT8) tenían una segunda curva de melting aproximadamente a los 75°C, además que los cebadores dirigidos a *Slc16A2* tenían un desfase a lo largo del gráfico y la atenuación del grafico en distintos puntos, lo que indicaría un segundo amplicón posiblemente por contaminación o algún producto inespecífico debido al diseño de los cebadores (Figura 6).

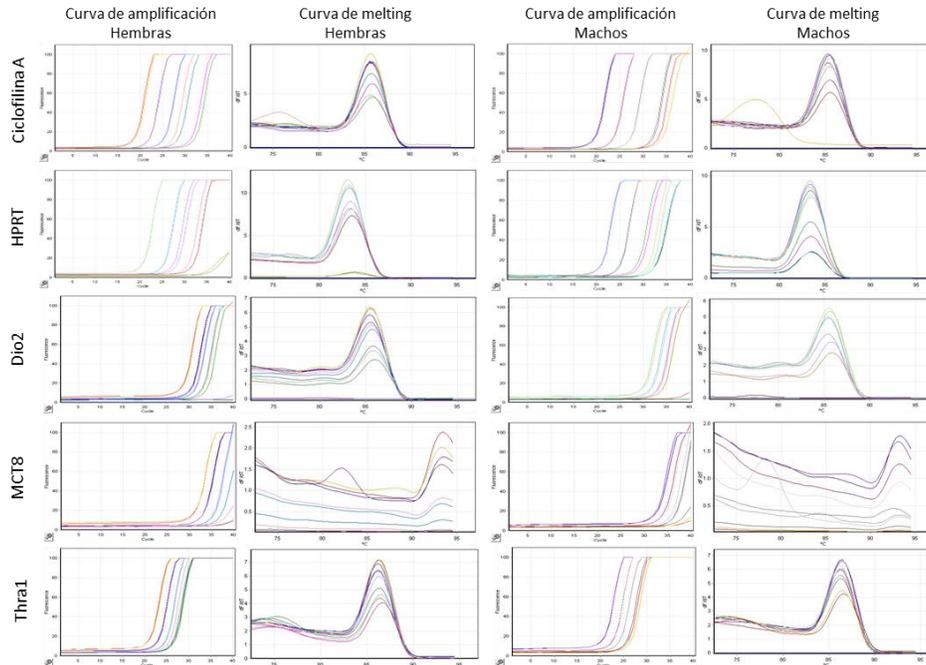


Figura 6. Comparación de las curvas de amplificación y de desnaturalización de los genes analizados de ratas hembra y macho.

Al analizar las ecuaciones de regresión lineal para cada curva, las muestras con cebadores contra *Dio2* presentaron una $R^2 < 0.75$ y $R^2 < 0.59$ en machos y hembras respectivamente, además de una eficiencia de la reacción menor a 0.6 en el caso de los machos (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de R^2 y eficiencias de las curvas obtenidas de los genes analizados por qPCR

Hembras	R^2	Eficiencia	F. D.	Machos	R^2	Eficiencia	F. D.
Cyc	0.98904	1.1	10	Cyc	0.98370	0.95	10
Hprt	0.98520	0.9	10	Hprt	0.89746	1.31	10
Dio2	0.71951	0.82	3	Dio2	0.58988	0.59	3
Sl16a2	0.96475	0.77	3	Sl16a2	0.94230	0.92	3
Thra1	0.94675	1.56	3	Thra1	0.96039	1.33	3

Debido a que las curvas de amplificación y de melting (desnaturalización), así como los valores de R^2 presentaron inconsistencias, se procedió a hacer un análisis bioinformático del diseño de los cebadores utilizados para tener un panorama más amplio de las posibles interferencias que pudieran haber afectado los ensayos.

8.3.2. Análisis *in silico* de cebadores utilizados

El análisis por Primer-Blast de los cebadores dirigidos a Ciclofilina A mostró que existía una heterogeneidad en los productos que los cebadores podrían amplificar, desde fragmentos de diferente longitud del mismo gen, hasta fragmentos de un dominio de la helicasa de DNA 9 (Chd9).

Para el caso de los productos de amplificación de los cebadores dirigidos a *Dio2* y *Slc16a2*, estos mostraron un alto peso molecular de 408 y 295 pb respectivamente, también se observó que los cebadores dirigidos a *Slc16a2* presentaban una complementariedad entre las bases 18 a 21 (ATAT) 5' -> 3' del primer sentido, con lo que podría presentarse una dimerización de este mismo (Tabla 5). Además, se observó que el primer sentido para *Thra1* presentaba una complementariedad entre sí mismo y la secuencia anti-sentido en diferentes posiciones de las secuencias (Tabla 5, 6).

Tabla 5. Regiones de las secuencias de cebadores utilizados con una complementariedad entre la misma secuencia

Genes	Dímeros entre la misma secuencia
MCT8 Sentido	5-caggaggcaaaccaggaatc-> <-ctataaggaccaaacggaggac-5
Thr1a Sentido	5-ctgttaatgtcaacagaccgct-> <-tcgccagacaactgtaattgtc-5

Tabla 6. Regiones de las secuencias de cebadores utilizados con una complementariedad entre secuencias

Genes	Dímeros entre secuencias
Hprt1 Sentido / anti-sentido	5-ggccagactttggttgatttg-> <-aagatcaggacaccggtagat-5
Thr1a Sentido / anti-sentido	5-ctgttaatgtcaacagaccgct-> <-ctgactggaggcgtactagc-5
Thr1a Sentido / anti-sentido	5-ctgttaatgtcaacagaccgct-> <-ctgactggaggcgtactagc-5
Thr1a Sentido / anti-sentido	5-ctgttaatgtcaacagaccgct-> <-ctgactggaggcgtactagc-5

8.4. Análisis de la expresión de genes en músculo esquelético por PCR semicuantitativa

8.4.1. Expresión de Dio2

El ejercicio voluntario aumento los niveles de expresión de Dio2 en el caso de las hembras control, pero no en los machos (Figura 8A, B). En el caso de los animales estresados en ambos sexos los grupos con restricción alimentaria mostraron un aumento en la expresión comparados con contrapartes control (Figura 8A, B) además que, en las hembras, el grupo ECV-Ex mostró una menor expresión de este gen comparado con su grupo control (Figura 8A, B).

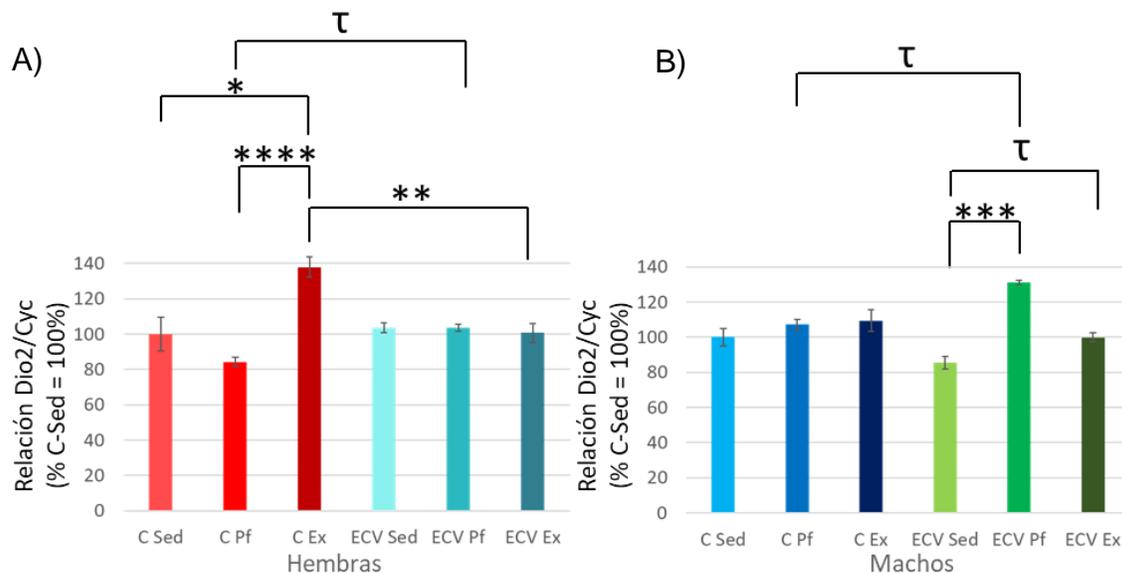


Figura 7. Efecto del estrés crónico variable durante la adolescencia y el ejercicio en la expresión de Dio2 en ratas adultas macho (A) y hembras (B). Los resultados esta expresados en promedio \pm error estándar (n=6). Los resultados fueron analizados por ANOVA de tres vías. La diferencia de medias se evaluó por la prueba de Tukey o prueba t de student. *: P<0.05, **: P<0.005, ***: P<0.0005, ****: P<0.0001, τ : P<0.05 analizado por t de student.

8.4.2. Expresión de *Pgc1a*

El ejercicio voluntario produjo o no diferencias significativas en la expresión de *Pgc1a* en ninguno de los sexos, pero sí entre sexos (Figura 9A, B). En el caso de los animales estresados, en machos, el grupo ECV-Ex mostró una reducción en la expresión con respecto al grupo C-Ex (Figura 9B), pero sin ningún cambio en el caso de las hembras (Figura 9A).

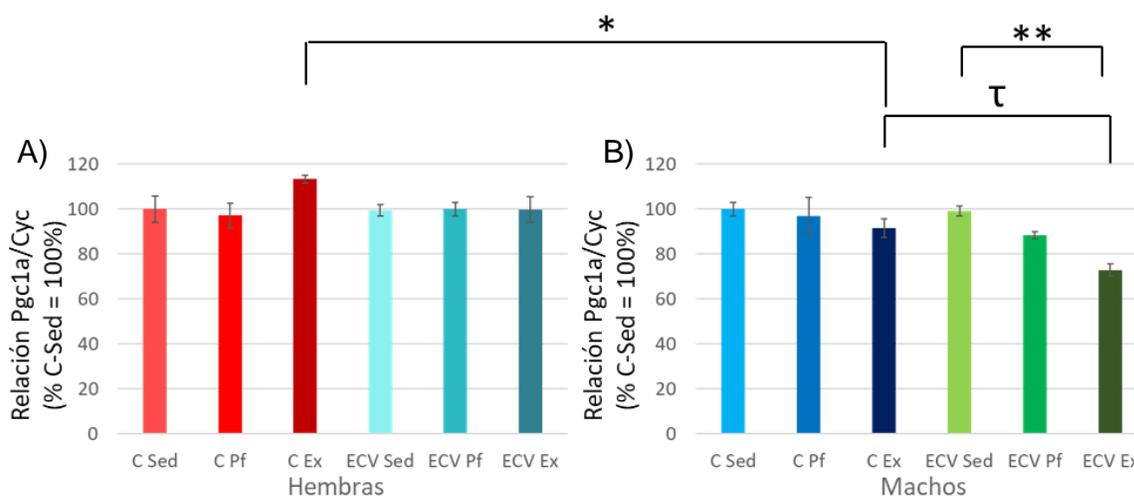


Figura 8. Efecto del estrés crónico variable durante la adolescencia y el ejercicio en la expresión de *Pgc1a* en ratas adultas macho (A) y hembras (B). Los resultados están expresados en promedio \pm error estándar (n=6). Los resultados fueron analizados por ANOVA de tres vías. La diferencia de medias se evaluó por la prueba de Tukey o prueba t de student. *: P<0.05, **: P<0.005, τ : P<0.05 analizado por t de student.

8.4.1. Expresión de Pnpla2

El ejercicio voluntario produjo una reducción en la expresión de Pnpla2 en los animales control macho, pero no en las hembras (Figura 7B). En el caso de los animales estresados en ambos sexos los grupos ECV-Sed mostraron una reducción en la expresión comparados con su grupo C-Sed (Figura 7A, B). En los machos además hubo una disminución de la expresión en el grupo ECV-Ex con respecto al grupo C-Ex (Figura 7B)

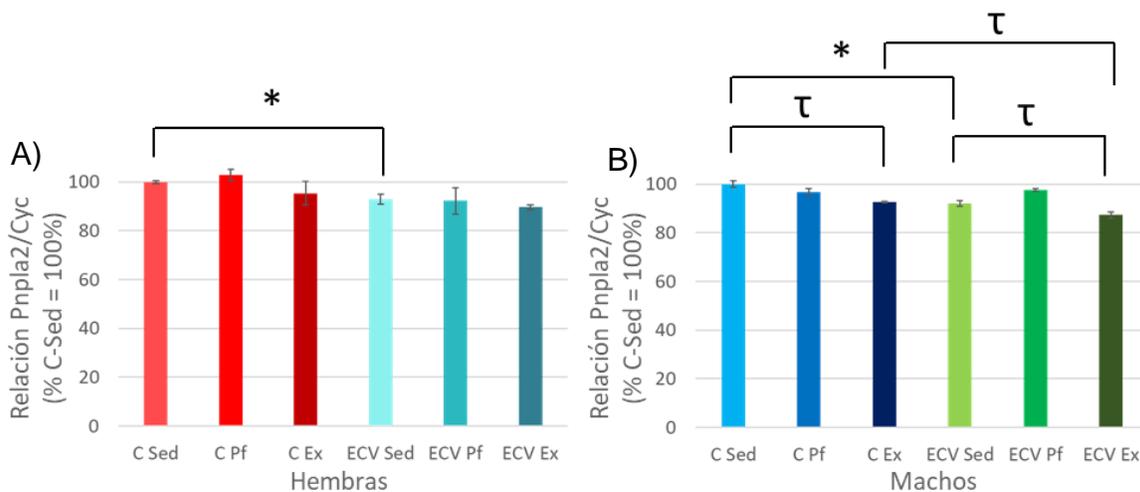


Figura 9. Efecto del estrés crónico variable durante la adolescencia y el ejercicio en la expresión de Pnpla2 en ratas adultas macho (A) y hembras (B). Los resultados esta expresados en promedio \pm error estándar (n=6). Los resultados fueron analizados por ANOVA de tres vías. La diferencia de medias se evaluó por la prueba de Tukey o prueba t de student. *: $P < 0.05$, τ : $P < 0.05$ analizado por t de student.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1. Extracción de RNA y eliminación de RNA

Como se mostró en las gráficas de las relaciones 260/280 y 260/230 algunas de las muestras al final de la extracción de RNA y eliminación de DNA genómico se vieron afectadas por contaminantes que se reflejaron en la lectura de 230 nm, posiblemente producto de sales como acetato de sodio, cloruro de sodio; presencia de alcoholes como compuestos fenólicos, etanol, isopropanol u otros compuestos como el tiocianato de guanidina, los cuales son sustancias que fueron usadas durante la extracción y que pudieron haber quedado como residuos. La presencia

de estos compuestos podría interferir en el análisis por PCR en tiempo real, por ejemplo, las sales podrían interferir en la unión de los cebadores a las secuencias blanco de cDNA que podrían llevar a una disminución en la eficiencia de la reacción, además de que se podría promover la inespecificidad durante la amplificación, probablemente debido a la variación de la afinidad de unión de la polimerasa, con lo cual podría conllevar a la obtención de resultados falsos positivos (Datta & LiCata, 2003; Ma et al., 2020). La presencia de solventes podría inhibir de la actividad de la polimerasa o con la unión de los cebadores a las secuencias blanco ocasionando una disminución de la sensibilidad y una baja precisión del ensayo (Albers et al., 2013; Davalieva & Efremov, 2010; Katcher & Schwartz, 1994). Un mal manejo al momento de realizar la extracción de RNA es una de las posibles causas que podría aumentar la presencia de contaminantes, por lo que se optó que la relación 260/230 fuera mayor a 1 y estos contaminantes se pudieran diluir al momento de realizar los análisis posteriores.

9.2. Estandarización de las condiciones para análisis de expresión de genes por PCR en tiempo real y análisis in silico de cebadores

El análisis de las curvas estándar para los diferentes genes evaluados de este trabajo permitió identificar ciertas inconsistencias que podrían afectar a los análisis posteriores, por lo que se procedió a realizar un análisis bioinformático de los cebadores utilizados. Para los cebadores dirigidos a *Dio2* y *Slc16a2*, debido a que sus productos de amplificación sobrepasaban el peso molecular recomendado para los procedimientos de qPCR (80 a 200 pb), esto pudo influir en la eficiencia de la reacción así como promover la amplificación de productos inespecíficos, debido a que las hebras más grandes de DNA son más difíciles de desnaturalizar lo que puede conllevar a una reducción de la amplificación del producto de interés, además de que puede incrementar la probabilidad de una amplificación no específica ya que las hebras de mayor tamaño tienen mayor probabilidad de alinear los cebadores a sitios no específicos lo que puede conllevar a resultados falsos positivos que disminuyen la precisión del ensayo (Van Holm et al., 2021); se sabe que los fragmentos más grandes de DNA son más difíciles de amplificar en presencia de inhibidores de la PCR que los más pequeños (Sidstedt et al., 2020).

Las curvas de melting permiten analizar la especificidad del ensayo de qPCR evaluando la disminución de la fluorescencia por la desnaturalización de los productos de amplificación a una T_m determinada donde su presencia se denota con la gráfica de una curva a esa T_m . Los resultados de la curva de melting pudieron verse afectados debido a que la T_m de fragmentos más grandes es más difícil de determinar de manera precisa provocando una alteración en el gráfico de la curva de melting.

Para el caso de los cebadores en contra de *S/c16a2*, como reflejó el análisis de detección de complementariedad, se observó que el primer sentido tenía una tendencia a formar dímeros entre las mismas secuencias por lo que esto pudo llevar a una reducción en la eficiencia de la reacción al igual que la reducción en la linealidad del ensayo (Jaeger et al., 2021).

Por lo que para mejorar nuestros resultados sería conveniente realizar un diseño de cebadores específicos, con un producto de amplificación entre 80 y 200 pb y revisar que no tengan una tendencia a formar dímeros entre sí.

9.3. Análisis de la expresión de genes en músculo esquelético por PCR semicuantitativa

La expresión de *Dio2* en músculo Soleus de las hembras del grupo control ejercitado (C-Ex) mostró un incremento con respecto al grupo control sedentario (C-Sed), similar a lo reportado por Bocco et al., (2016) donde la expresión de *Dio2* era promovida durante el ejercicio a través de la actividad del receptor β -adrenérgico inducida por el ejercicio. Sin embargo, este efecto no se observó en los machos, sugiriendo un dimorfismo sexual con respecto a la actividad o regulación del receptor β -adrenérgico producido por estrógenos como se ha observado en otros tejidos (Riedel et al., 2019). El estrés disminuyó los niveles de expresión tanto en el grupo estresado sedentario (ECV-Sed) como el grupo estresado ejercitado (ECV-Ex) en hembras, sugiriendo que el estrés podría atenuar la actividad de la *Dio2*, disminuyendo el efecto de las hormonas tiroideas a nivel de tejido, pudiendo ocasionar una alteración de la homeostasis muscular, o una disminución del volumen del tejido muscular (Deldicque, 2013; Kilburn-Watt et al., 2010; Parra-

Montes de Oca et al., 2021; Poornima et al., 2014). Sin embargo, en machos, el grupo estresado con alimentación pareada al ejercicio (ECV-Pf) mostró un aumento considerable en la expresión de *Dio2*, probablemente debido a la reducción de los niveles de T4 por la reducción de la ingesta de alimento y potenciando este efecto por la reducción de la actividad del eje HPT gracias al estrés, donde se ha observado que la reducción de T4 puede promover la actividad de la *Dio2* a nivel postranscripcional y, posiblemente, a nivel transcripcional (Wagner et al., 2007).

En el caso de *Pgc1a*, no se observaron diferencias significativas entre los grupos C-Ex con respecto al grupo C-Sed, contrario a lo antes reportado donde el ejercicio promovía la expresión de *Pgc1a* (Bocco et al., 2016), aunque en este estudio los animales fueron expuestos a ejercicio forzado por 2 horas lo cual difiere al modelo de ejercicio que se utilizó para este trabajo (ejercicio voluntario) con un periodo extendido de ejercicio, por lo que los niveles de mRNA comenzarían a disminuir, tal vez como resultado de la habituación por la exposición crónica al ejercicio (Fernandez-Marcos & Auwerx, 2011). Por otra parte, sí se encontró una diferencia en la expresión entre hembras y macho en los grupos C-Sed lo cual podría atribuirse a una variación en la regulación de *Pgc1a* dependiente del sexo (Sahenk et al., 2021). Sin embargo, en los grupos con alimentación pareada al ejercicio, la reducción de la ingesta de alimento no afectó la expresión de *Pgc1a* que se ha observado incrementa en este paradigma (Chan & Arany, 2014) probablemente como un efecto a la habituación. En machos, la exposición al estrés disminuyó los niveles de expresión de *Pgc1a* en el grupo ECV-Ex con respecto al grupo C-Ex, lo que podría indicar que el estrés estaría alterando la regulación de *Pgc1a* en músculo esquelético tal vez por la alteración del eje HPT (Aguilera, 2012, p. 8) el cual está involucrado en su regulación, o por el aumento en los glucocorticoides e inhibiendo así la biosíntesis mitocondrial (Picard et al., 2014).

Con respecto a los niveles de expresión de *Pnpla2*, en los machos hubo una disminución en la expresión de este gen en el grupo C-Ex con respecto al grupo C-Sed probablemente como una respuesta adaptativa al ejercicio, debido a que el ejercicio es considerado como ejercicio aeróbico, por lo que el tejido muscular

podría estar disminuyendo la actividad de la ruta de oxidación de ácidos grasos y promoviendo rutas como la glucólisis para la obtención de energía de manera más eficiente (Baskin et al., 2015; De Feo et al., 2003; Plotkin et al., 2021). En el caso de los grupos con alimentación pareada al ejercicio, la reducción de la ingesta de alimento no afectó la expresión de *Pnpla2* que se ha observado incrementa en tejidos adiposos (Yang et al., 2019), esto sugiere que los efectos de la restricción de alimento sean tejido dependiente. Por otra parte, tanto en machos como en hembras hubo una disminución considerable de los niveles de expresión de *Pnpla2* en el grupo ECV-Sed con respecto al grupo C-Sed, además que en machos también hubo una reducción en la expresión en el grupo ECV-Ex con respecto al grupo C-Ex, lo que podría indicarnos que el estrés pudo haber afectado la regulación basal y la respuesta al ejercicio del músculo esquelético, tal vez por medio de la alteración de la homeostasis muscular, o por una disminución del volumen del tejido, lo que podría disminuir directamente los niveles y posible actividad de *Pnpla2* (Deldicque, 2013; Poornima et al., 2014).

10. CONCLUSIONES

El método de extracción de RNA fue el adecuado para la obtención de RNA total de músculo esquelético Soleus de ratas macho y hembra.

El método de eliminación de DNA genómico no afectó la integridad del RNA total extraído.

Los cebadores para los genes *Slc16a2* y *Dio2* para las curvas estándar no fueron los adecuados para su posterior análisis.

El ejercicio crónico voluntario promueve la expresión de *Dio2* en músculo esquelético Soleus de ratas hembra, mientras que este mismo paradigma disminuye los niveles de expresión de *Pnpla2* tanto en machos como en hembras y el estrés crónico durante la adolescencia disminuye la expresión de *Pnpla2* y *Dio2* en machos y hembras, sin embargo solo disminuye la expresión de *Pgc1a* en machos.

El estrés puede afectar la regulación basal de genes regulados y que median la regulación de las acciones que tienen las hormonas tiroideas en músculo esquelético, además que puede interferir en la respuesta situaciones de demanda energética como el ejercicio.

11. Perspectivas

Adicional a los resultados obtenidos se sugiere realizar los siguientes análisis para complementar lo observado:

-Diseñar cebadores adecuados para analizar la expresión de los genes *Thra1* y *Sl16a2* en músculo Soleus.

-Analizar la expresión a nivel de proteína de *Dio2*, *PGC1 α* , *ATGL*, *THR α* y *MCT8* en músculo Soleus.

11. RERERENCIAS

- Aguilera, G. (2012). Chapter 8—The Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and Neuroendocrine Responses to Stress. En G. Fink, D. W. Pfaff, & J. E. Levine (Eds.), *Handbook of Neuroendocrinology* (pp. 175-196). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375097-6.10008-3>
- Albers, C. N., Jensen, A., Bælum, J., & Jacobsen, C. S. (2013). Inhibition of DNA Polymerases Used in Q-PCR by Structurally Different Soil-Derived Humic Substances. *Geomicrobiology Journal*, 30(8), 675-681. <https://doi.org/10.1080/01490451.2012.758193>
- Anish, E. J. (2005). Exercise and Its Effects on the Central Nervous System. *Current Sports Medicine Reports*, 4(1), 18-23. <https://doi.org/10.1097/01.CSMR.0000306066.14026.77>
- Archundia-Herrera, C., Macias-Cervantes, M., Ruiz-Muñoz, B., Vargas-Ortiz, K., Kornhauser, C., & Perez-Vazquez, V. (2017). Muscle irisin response to aerobic vs HIIT in overweight female adolescents. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 9(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s13098-017-0302-5>
- Baskin, K. K., Winders, B. R., & Olson, E. N. (2015). Muscle as a “Mediator” of Systemic Metabolism. *Cell Metabolism*, 21(2), 237-248. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.021>
- Bloise, F. F., Cordeiro, A., & Ortiga-Carvalho, T. M. (2018). Role of thyroid hormone in skeletal muscle physiology. *Journal of Endocrinology*, 236(1), R57-R68. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0611>

- Bocco, B. M. L. C., Louzada, R. A. N., Silvestre, D. H. S., Santos, M. C. S., Anne-Palmer, E., Rangel, I. F., Abdalla, S., Ferreira, A. C., Ribeiro, M. O., Gereben, B., Carvalho, D. P., Bianco, A. C., & Werneck-de-Castro, J. P. (2016). Thyroid hormone activation by type 2 deiodinase mediates exercise-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α expression in skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, *594*(18), 5255-5269. <https://doi.org/10.1113/JP272440>
- Castillo, A. I., Sánchez-Martínez, R., Moreno, J. L., Martínez-Iglesias, O. A., Palacios, D., & Aranda, A. (2004). A Permissive Retinoid X Receptor/Thyroid Hormone Receptor Heterodimer Allows Stimulation of Prolactin Gene Transcription by Thyroid Hormone and 9-cis-Retinoic Acid. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(2), 502-513. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.502-513.2004>
- Castillo-Campos, A., Gutiérrez-Mata, A., Charli, J.-L., & Joseph-Bravo, P. (2021). Chronic stress inhibits hypothalamus-pituitary-thyroid axis and brown adipose tissue responses to acute cold exposure in male rats. *Journal of Endocrinological Investigation*, *44*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01328-z>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, *1*(2), 581-585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>

- Cotman, C. W., & Berchtold, N. C. (2002). Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences*, 25(6), 295-301. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02143-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02143-4)
- Datta, K., & LiCata, V. J. (2003). Salt Dependence of DNA binding by *Thermus aquaticus* and *Escherichia coli* DNA Polymerases*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5694-5701. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208133200>
- Davalieva, K., & Efremov, G. (2010). Influence of salts and PCR inhibitors on the amplification capacity of three thermostable DNA polymerases. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 29, 57-62. <https://doi.org/10.20450/mjcce.2010.173>
- Dave, H. D., Shook, M., & Varacallo, M. (2022). Anatomy, Skeletal Muscle. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537236/>
- De Feo, P., Di Loreto, C., Lucidi, P., Murdolo, G., Parlanti, N., De Cicco, A., & Piccioni F Santeusano, F. (2003). Metabolic response to exercise. *Journal of Endocrinological Investigation*, 26(9), 851-854. <https://doi.org/10.1007/BF03345235>
- Deldicque, L. (2013). Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle: Any contribution to sarcopenia? *Frontiers in Physiology*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2013.00236>
- Distefano, G., & Goodpaster, B. H. (2018). Effects of Exercise and Aging on Skeletal Muscle. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(3), a029785. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029785>

- Dümmeler, K., Müller, S., & Seitz, H. J. (1996). Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues. *Biochemical Journal*, 317(Pt 3), 913-918.
- Eggers, A. E. (2007). Redrawing Papez' circuit: A theory about how acute stress becomes chronic and causes disease. *Medical Hypotheses*, 69(4), 852-857. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.01.074>
- Engelmann, M., Landgraf, R., & Wotjak, C. T. (2004). The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25(3), 132-149. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2004.09.001>
- Fekete, C., & Lechan, R. M. (2014). Central Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Under Physiological and Pathophysiological Conditions. *Endocrine Reviews*, 35(2), 159-194. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1087>
- Fernandez-Marcos, P. J., & Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis¹²³⁴. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 884S-890S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001917>
- Fortunato, R. S., Ignácio, D. L., Padron, Á. S., Peçanha, R., Marassi, M. P., Rosenthal, D., Werneck-de-Castro, J. P. S., & Carvalho, D. P. (2008). The effect of acute exercise session on thyroid hormone economy in rats. *Journal of Endocrinology*, 198(2), 347-353. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0174>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcified Tissue International*, 96(3), 183-195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>

Garland, T., Schutz, H., Chappell, M. A., Keeney, B. K., Meek, T. H., Copes, L. E., Acosta, W., Drenowatz, C., Maciel, R. C., van Dijk, G., Kotz, C. M., & Eisenmann, J. C. (2011). The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: Human and rodent perspectives. *The Journal of Experimental Biology*, 214(2), 206-229. <https://doi.org/10.1242/jeb.048397>

Giacco, A., delli Paoli, G., Simiele, R., Caterino, M., Ruoppolo, M., Bloch, W., Kraaij, R., Uitterlinden, A. G., Santillo, A., Senese, R., Cioffi, F., Silvestri, E., Iervolino, S., Lombardi, A., Moreno, M., Goglia, F., Lanni, A., & de Lange, P. (2020). Exercise with food withdrawal at thermoneutrality impacts fuel use, the microbiome, AMPK phosphorylation, muscle fibers, and thyroid hormone levels in rats. *Physiological Reports*, 8(3), e14354. <https://doi.org/10.14814/phy2.14354>

Goldman, L., Winget, C., Hollingshead, G. W., & Levine, S. (1973). Postweaning Development of Negative Feedback in the Pituitary-Adrenal System of the Rat. *Neuroendocrinology*, 12(3), 199-211. <https://doi.org/10.1159/000122169>

Gore, D. C., Jahoor, F., Wolfe, R. R., & Herndon, D. N. (1993). Acute response of human muscle protein to catabolic hormones. *Annals of Surgery*, 218(5), 679-684. <https://doi.org/10.1097/00000658-199321850-00015>

Grasselli, E., Voci, A., Demori, I., Vecchione, G., Compalati, A. D., Gallo, G., Goglia, F., De Matteis, R., Silvestri, E., & Vergani, L. (2016). Triglyceride Mobilization from Lipid Droplets Sustains the Anti-Steatotic Action of

Iodothyronines in Cultured Rat Hepatocytes. *Frontiers in Physiology*, 6.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2015.00418>

Hammen, C., Kim, E. Y., Eberhart, N. K., & Brennan, P. A. (2009). CHRONIC AND ACUTE STRESS AND THE PREDICTION OF MAJOR DEPRESSION IN WOMEN. *Depression and Anxiety*, 26(8), 718-723.

<https://doi.org/10.1002/da.20571>

Hartong, R., Wang, N., Kurokawa, R., Lazar, M. A., Glass, C. K., Apriletti, J. W., & Dillmann, W. H. (1994). Delineation of three different thyroid hormone-response elements in promoter of rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase gene. Demonstration that retinoid X receptor binds 5' to thyroid hormone receptor in response element 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(17), 13021-13029.

Jaeger, L. H., Nascimento, T. C., Rocha, F. D., Vilela, F. M. P., Duque, A. P. do N., Silva, L. M., Riani, L. R., Moreira, J. P., Chagas, J. M. de A., Pereira, T. V., Perches, C. G. P., Watanabe, A. S. A., Viccini, L. F., Silvério, M. S., Corrêa, J. O. do A., Pereira-Junior, O. dos S., & Pittella, F. (2021). Adjusting RT-qPCR conditions to avoid unspecific amplification in SARS-CoV-2 diagnosis.

International Journal of Infectious Diseases, 102, 437-439.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.079>

Janal, M. N., Colt, E. W. D., Clark, C. W., & Glusman, M. (1984). Pain sensitivity, mood and plasma endocrine levels in man following long-distance running: Effects of naloxone. *Pain*, 19(1), 13-25. [https://doi.org/10.1016/0304-](https://doi.org/10.1016/0304-3959(84)90061-7)

[3959\(84\)90061-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(84)90061-7)

- Jones, T. E., Baar, K., Ojuka, E., Chen, M., & Holloszy, J. O. (2003). Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *284*(1), E96-E101.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00316.2002>
- Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., & Charli, J.-L. (2015). Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress. *Journal of Endocrinology*, *224*(3), R139-R159. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0593>
- Kádár, A., Sánchez, E., Wittmann, G., Singru, P. S., Füzesi, T., Marsili, A., Larsen, P. R., Liposits, Z., Lechan, R. M., & Fekete, C. (2010). Distribution of Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH)-Synthesizing Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of the Mouse. *The Journal of comparative neurology*, *518*(19), 3948-3961.
<https://doi.org/10.1002/cne.22432>
- Katcher, H. L., & Schwartz, I. (1994). A distinctive property of Tth DNA polymerase: Enzymatic amplification in the presence of phenol. *BioTechniques*, *16*(1), 84-92.
- Kilburn-Watt, E., Banati, R. B., & Keay, K. A. (2010). Altered Thyroid Hormones and Behavioural Change in a Sub-Population of Rats Following Chronic Constriction Injury. *Journal of Neuroendocrinology*, *22*(8), 960-970.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02038.x>
- Kogler, L., Mueller, V. I., Chang, A., Eickhoff, S. B., Fox, P. T., Gur, R. C., & Derntl, B. (2015). Psychosocial versus physiological stress – meta-analyses on deactivations and activations of the neural correlates of stress reactions.

NeuroImage, 119, 235-251.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.06.059>

Kwakkel, J., Beeren, H. C. van, Ackermans, M. T., Schiphorst, M. C. P., Fliers, E., Wiersinga, W. M., & Boelen, A. (2009). Skeletal muscle deiodinase type 2 regulation during illness in mice. *Journal of Endocrinology*, 203(2), 263-270.
<https://doi.org/10.1677/JOE-09-0118>

Leite, M. R., Cechella, J. L., Pinton, S., Nogueira, C. W., & Zeni, G. (2016). A diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise promote neuroprotection, reduced cell apoptosis and glial cell activation in the hypothalamus of old rats. *Experimental Gerontology*, 82, 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.05.006>

Lira, V. A., Benton, C. R., Yan, Z., & Bonen, A. (2010). PGC-1 α regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 299(2), E145-E161. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00755.2009>

Ma, H., Bell, K. N., & Loker, R. N. (2020). qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 20, 152-168. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>

Marsili, A., Tang, D., Harney, J. W., Singh, P., Zavacki, A. M., Dentice, M., Salvatore, D., & Larsen, P. R. (2011). Type II iodothyronine deiodinase provides intracellular 3,5,3'-triiodothyronine to normal and regenerating mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology*

and Metabolism, 301(5), E818-E824.

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00292.2011>

- Mebis, L., Paletta, D., Debaveye, Y., Ellger, B., Langouche, L., D'Hoore, A., Darras, V. M., Visser, T. J., & Berghe, G. V. den. (2009). Expression of thyroid hormone transporters during critical illness. *European Journal of Endocrinology*, 161(2), 243-250. <https://doi.org/10.1530/EJE-09-0290>
- Monroe, S. M., & Slavich, G. M. (2016). Chapter 13 - Psychological Stressors: Overview. En G. Fink (Ed.), *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior* (pp. 109-115). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00013-3>
- Morissette, M. P., Susser, S. E., Stammers, A. N., O'Hara, K. A., Gardiner, P. F., Sheppard, P., Moffatt, T. L., & Duhamel, T. A. (2014). Differential regulation of the fiber type-specific gene expression of the sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase isoforms induced by exercise training. *Journal of Applied Physiology*, 117(5), 544-555. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00092.2014>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 12(1), e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Mullur, R., Liu, Y.-Y., & Brent, G. A. (2014). Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiological Reviews*, 94(2), 355-382. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2013>

- Nicolaisen, T. S., Klein, A. B., Dmytriyeva, O., Lund, J., Ingerslev, L. R., Fritzen, A. M., Carl, C. S., Lundsgaard, A.-M., Frost, M., Ma, T., Schjerling, P., Gerhart-Hines, Z., Flamant, F., Gauthier, K., Larsen, S., Richter, E. A., Kiens, B., & Clemmensen, C. (2020). Thyroid hormone receptor α in skeletal muscle is essential for T3-mediated increase in energy expenditure. *The FASEB Journal*, *34*(11), 15480-15491. <https://doi.org/10.1096/fj.202001258RR>
- Ogawa-Wong, A., Carmody, C., Le, K., Marschner, R. A., Larsen, P. R., Zavacki, A. M., & Wajner, S. M. (2022). Modulation of Deiodinase Types 2 and 3 during Skeletal Muscle Regeneration. *Metabolites*, *12*(7), 612. <https://doi.org/10.3390/metabo12070612>
- Park, H., & Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrn3379>
- Parra Montes de Oca, M. A., & Joseph-Bravo, P. (2022). *El estrés durante la adolescencia de ratas modifica su respuesta a retos metabólicos.*
- Parra-Montes de Oca, M. A., Gutiérrez-Mariscal, M., Salmerón-Jiménez, M. F., Jaimes-Hoy, L., Charli, J.-L., & Joseph-Bravo, P. (2019). Voluntary Exercise-Induced Activation of Thyroid Axis and Reduction of White Fat Depots Is Attenuated by Chronic Stress in a Sex Dimorphic Pattern in Adult Rats. *Frontiers in Endocrinology*, *10*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00418>
- Parra-Montes de Oca, M. A., Sotelo-Rivera, I., Gutiérrez-Mata, A., Charli, J.-L., & Joseph-Bravo, P. (2021). Sex Dimorphic Responses of the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis to Energy Demands and Stress. *Frontiers in*

Endocrinology, 12.

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2021.746924>

Perreau, V. M., Adlard, P. A., Anderson, A. J., & Cotman, C. W. (2018). Exercise-Induced Gene Expression Changes in the Rat Spinal Cord. *Gene Expression*, 12(2), 107-121.

Picard, M., Juster, R.-P., & McEwen, B. S. (2014). Mitochondrial allostatic load puts the «gluc» back in glucocorticoids. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(5), 303-310. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.22>

Plotkin, D. L., Roberts, M. D., Haun, C. T., & Schoenfeld, B. J. (2021). Muscle Fiber Type Transitions with Exercise Training: Shifting Perspectives. *Sports*, 9(9), 127. <https://doi.org/10.3390/sports9090127>

Poornima, K. N., Karthick, N., & Sitalakshmi, R. (2014). Study of the Effect of Stress on Skeletal Muscle Function in Geriatrics. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 8(1), 8-9. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7014.3966>

Richter, E. A., & Hargreaves, M. (2013). Exercise, GLUT4, and Skeletal Muscle Glucose Uptake. *Physiological Reviews*, 93(3), 993-1017. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2012>

Riedel, K., Deussen, A. J., Tolkmitt, J., Weber, S., Schlinkert, P., Zatschler, B., Friebel, C., Müller, B., El-Armouche, A., Morawietz, H., Matschke, K., & Kopalani, I. (2019). Estrogen determines sex differences in adrenergic vessel tone by regulation of endothelial β -adrenoceptor expression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 317(2), H243-H254. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00456.2018>

- Rodriguez-Perez, A., Palos-Paz, F., Kaptein, E., Visser, T. J., Dominguez-Gerpe, L., Alvarez-Escudero, J., & Lado-Abeal, J. (2008). Identification of molecular mechanisms related to nonthyroidal illness syndrome in skeletal muscle and adipose tissue from patients with septic shock. *Clinical Endocrinology*, 68(5), 821-827. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.03102.x>
- Romeo, R. D. (2013). The Teenage Brain: The Stress Response and the Adolescent Brain. *Current directions in psychological science*, 22(2), 140-145. <https://doi.org/10.1177/0963721413475445>
- Romeo, R. D., Bellani, R., Karatsoreos, I. N., Chhua, N., Vernov, M., Conrad, C. D., & McEwen, B. S. (2006). Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. *Endocrinology*, 147(4), 1664-1674. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1432>
- Romeo, R. D., Lee, S. J., Chhua, N., McPherson, C. R., & McEwen, B. S. (2004). Testosterone Cannot Activate an Adult-Like Stress Response in Prepubertal Male Rats. *Neuroendocrinology*, 79(3), 125-132. <https://doi.org/10.1159/000077270>
- Sahenk, Z., Ozes, B., Murrey, D., Myers, M., Moss, K., Yalvac, M. E., Ridgley, A., Chen, L., & Mendell, J. R. (2021). Systemic delivery of AAVrh74.tMCK.hCAPN3 rescues the phenotype in a mouse model for LGMD2A/R1. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 22, 401-414. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.06.010>
- Salvatore, D., Simonides, W. S., Dentice, M., Zavacki, A. M., & Larsen, P. R. (2014). Thyroid hormones and skeletal muscle—New insights and potential

implications. *Nature reviews. Endocrinology*, 10(4), 206-214.

<https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.238>

Schneider, M. (2013). Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior.

Cell and Tissue Research, 354(1), 99-106. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1581-2>

Selye, H. (1976). Stress without Distress. En G. Serban (Ed.), *Psychopathology of*

Human Adaptation (pp. 137-146). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2238-2_9

Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR

and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical*

Chemistry, 412(9), 2009-2023. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>

Solanes, G., Pedraza, N., Calvo, V., Vidal-Puig, A., Lowell, B. B., & Villarroya, F.

(2005). Thyroid hormones directly activate the expression of the human and mouse uncoupling protein-3 genes through a thyroid response element in the proximal promoter region. *Biochemical Journal*, 386(Pt 3), 505-513.

<https://doi.org/10.1042/BJ20041073>

Spear, L. P. (2000). Neurobehavioral Changes in Adolescence. *Current Directions*

in Psychological Science, 9(4), 111-114. [https://doi.org/10.1111/1467-](https://doi.org/10.1111/1467-8721.00072)

[8721.00072](https://doi.org/10.1111/1467-8721.00072)

Srivastava, K. K., & Kumar, R. (2015). Stress, Oxidative Injury and Disease. *Indian*

Journal of Clinical Biochemistry, 30(1), 3-10. [https://doi.org/10.1007/s12291-](https://doi.org/10.1007/s12291-014-0441-5)

[014-0441-5](https://doi.org/10.1007/s12291-014-0441-5)

- Steinbacher, P., & Eckl, P. (2015). Impact of Oxidative Stress on Exercising Skeletal Muscle. *Biomolecules*, 5(2), 356-377.
<https://doi.org/10.3390/biom5020356>
- Talbot, J., & Maves, L. (2016). Skeletal muscle fiber type: Using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 5(4), 518-534. <https://doi.org/10.1002/wdev.230>
- Torres Solis, M. T., & Jaimes Hoy, E. L. (2022). *Análisis de la señalización de hormonas tiroideas en el músculo esquelético en un modelo de ejercicio aeróbico crónico*.
- Uribe, R. M., Jaimes-Hoy, L., Ramírez-Martínez, C., García-Vázquez, A., Romero, F., Cisneros, M., Cote-Vélez, A., Charli, J.-L., & Joseph-Bravo, P. (2014). Voluntary exercise adapts the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male rats. *Endocrinology*, 155(5), 2020-2030. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1724>
- Vaitkus, J. A., Farrar, J. S., & Celi, F. S. (2015). Thyroid Hormone Mediated Modulation of Energy Expenditure. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms160716158>
- Van Holm, W., Ghesquière, J., Boon, N., Verspecht, T., Bernaerts, K., Zayed, N., Chatzigiannidou, I., & Teughels, W. (2021). A Viability Quantitative PCR Dilemma: Are Longer Amplicons Better? *Applied and Environmental Microbiology*, 87(5), e02653-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02653-20>
- Van Kummer, B. H., & Cohen, R. W. (2015). Exercise-Induced Neuroprotection in the Spastic Han Wistar Rat: The Possible Role of Brain-Derived

- Neurotrophic Factor. *BioMed Research International*, 2015, e834543.
<https://doi.org/10.1155/2015/834543>
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2(3), 266-270. <https://doi.org/10.1038/6368>
- Visser, W. E., Friesema, E. C. H., & Visser, T. J. (2011). Minireview: Thyroid Hormone Transporters: The Knowns and the Unknowns. *Molecular Endocrinology*, 25(1), 1-14. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0095>
- Wagner, M. S., Wajner, S. M., Dora, J. M., & Maia, A. L. (2007). Regulation of Dio2 gene expression by thyroid hormones in normal and type 1 deiodinase-deficient C3H mice. *Journal of Endocrinology*, 193(3), 435-444.
<https://doi.org/10.1677/JOE-07-0099>
- Wulf, A., Harneit, A., Kröger, M., Kebenko, M., Wetzel, M. G., & Weitzel, J. M. (2008). T3-mediated expression of PGC-1alpha via a far upstream located thyroid hormone response element. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 287(1-2), 90-95. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.01.017>
- Wynne, B., McHugh, L., Gao, W., Keegan, D., Byrne, K., Rowan, C., Hartery, K., Kirschbaum, C., Doherty, G., Cullen, G., Dooley, B., & Mulcahy, H. E. (2019). Acceptance and Commitment Therapy Reduces Psychological Stress in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 156(4), 935-945.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.11.030>
- Yuan, P.-X., Zhou, R., Farzad, N., Gould, T. D., Gray, N. A., Du, J., & Manji, H. K. (2005). Chapter 5.7 - Enhancing resilience to stress: The role of signaling cascades. En T. Steckler, N. H. Kalin, & J. M. H. M. Reul (Eds.), *Techniques*

in the Behavioral and Neural Sciences (Vol. 15, pp. 751-771). Elsevier.

[https://doi.org/10.1016/S0921-0709\(05\)80040-9](https://doi.org/10.1016/S0921-0709(05)80040-9)

Zorzano, A., Palacín, M., & Gumà, A. (2005). Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle.

Acta Physiologica Scandinavica, 183(1), 43-58.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01380.x>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

**SECRETARIA EJECUTIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el C.
BARRERA ELIZALDE ULISES con número de matrícula **10018617** cuyo título es:

“Como el estrés durante la adolescencia regula la respuesta muscular al ejercicio”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**.

Cuernavaca, Mor a 27 de septiembre del 2023

Atentamente
Por una universidad culta
Una universidad de excelencia

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA
DR. IVÁN MARTÍNEZ-DUNCKER RAMÍREZ
M.C. MARCO ANTONIO PARRA MONTES DE OCA
DRA. PATRICIA ILEANA JOSEPH BRAVO
DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN**

**(PRESIDENTE)
(SECRETARIO)
(VOCAL)
(SUPLENTE)
(SUPLENTE)**

MIE/VRRC/EAE

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo IICBA@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ROBERTA SALINAS MARIN | Fecha:2023-09-27 13:47:30 | Firmante

zekZ+0efiJdfFynWbJdTfBhf26Wh3PJM1E4IjiOHoJ3wzJi/21sMnZ25ZT7JjREk6xnrde2/dliFC0LSyY0zeCtkJ7MsFU6M2svGrVtpLJFqgKIGNwCaM91uLMWwIwGGgNEHPHF5nofYD31qyBecGKn68p0ByrfNiZJNeJbS5XrEN491GOAEyPblqksMBj75qKekmojLEVUHT035iJzhUoZvWM/TR3yfpUXZNgnc09sEtNKm6T0khhfOXPgI3HUIxMv1aMnE+0BovNPGJ2BMtDEOQWlG+6U+FCHQusKw0WqumHXmiMTJYlw0du6AJCeM6K7HfpcnCD+j0kO7BLnQg==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2023-09-27 13:49:09 | Firmante

Xpof2onFvsvq+G8eDQbv/fxJVH/1vuAB2+zilOnY0HoDv/laEKZ7XNJu7HT8n1cYDc5dLakRs2F2c618D/Rs+LqWzJxigoQwBi9fNxaABbXYfQ8hXVUp5GqjasmeVAd/31VvpNEd4MJ0180K55cuiCL9m+ISZUps2pA2F16+Fhs2uMLdYnSNO0xmY5lvrk0OTqs4MoHMAU69F8794A+vrXiOGFFL5oeHMj1y+T3kPIDBHzfzCdZi83FxDhUK/zOpL77twfXjPEYk/pyHWE6m9V6+HdTOl/71NSVhglwHxyJ95zylIdlaGUuzPwM8j0l7+1v5vUUbgxTgLy4n5g==

MARCO ANTONIO PARRA MONTES DE OCA | Fecha:2023-09-27 18:05:53 | Firmante

57gqWiGYeDOVNXyHGMtuozafbHR/bL9MwXXsGT10d5q9oJGeHS2aU75NQwEaSy1bFDD/xudE114BRojifFuKisRw+gKIWSJGbhvE1ytKLIuPXGCJl2Lmibrbrplz8bHlmvXTI+Rf4L5HCZ1kAEFvGrQ5CcUy8jqYXjwC9ZYJR4lbsVCOcVvYNNVYHfvaqZj3raXfYDz4EviAdu1GFMTV2GfLjiGngg1ReCER+1/FEIgaNOtoZTN6CWedfQNmTdUIkerCgtuQMW9Heb7VsP2yxSF4U8TuaS/9fHpPjwnkYnVrLShki2bc5g20QnEjT69TP9wynxG7eCVs0vVwELs6MXA==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2023-09-27 18:56:33 | Firmante

Zkh9svcsHnNZuUt6XCFq1zuQli9V7InecX4cMwtJkd8BdWMC9JC4+81OZ6cchpD7Oh/KM460z7s6C2Ksvjc1nWyVm+KP4z3C5fzdYdCgk8nVMAHbulscsxHJDyaY+TqK7ojEbR84pFNni8PXyZiC04FdwplLukpMuvXEDWOZUWzZD1NFSziTKzMSCluLiZeNqD0IT2fUmNjLkxXkYQ5GpLDC9w0Zla+17oO1m+OPVycTEfR/9MLissLmw29fCTgd9Kgydpdw0+du2tgYcXtkPk0pEJLthCG44rY6a6BZjz98kFAiFCITBdq7DftnwomRB68CCEeNMD3qhR72Qw==

PATRICIA ILEANA JOSEPH BRAVO | Fecha:2023-09-27 20:10:26 | Firmante

JyAFyKhPSibUfxbTyjuwZUeRbnnyfyhOf6w95vZsaaMY4UqOfN/QVFSn5BFgT7QeaCsZUs/+Nb+SUyj6gj5TTtetBYNtkzm2wGHmXa7SOz3phkBmuZfqbbyRs6g4Ug/zAFE5apOrL3HZgPb/gckhfWErSGnniZ90VDJOBIN3OEHNi5DG78D2NU4sUB0qilqSMHRwuDqrGM6JlUdXpAuh56sN4/2tv2mroSlwB9VPTXUj0S3LM0dG02PHFS4grKbZu6HqZKZDO5D2jY/13tdnp8i9XOnsdZ2oy2TFTnxozYwom8BQM5DI5HXVgVfrG7jxRzWDMlc00jEza4Rku2S/A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



aYQbCwn2K

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5ALVtlnD4TIQR1nN6tRdBm5S4VplZEVc>

