



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Centro de  
Investigación en  
Dinámica Celular

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS**

**Centro de Investigación en Dinámica Celular**  
**Área Terminal de Bioquímica y Biología  
Molecular**

**“Estudio de la expresión de genes termogénicos en  
respuesta al frío agudo en el periodo de  
luz/oscuridad en ratas”**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA:**

**CINTHIA BUENO HERNÁNDEZ**

Para obtener el grado de

**LICENCIADA EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directora de Tesis:

**Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy**



**Instituto de Biotecnología**  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



**Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas**

**Datos de los sinodales y alumna:**

*Alumna*

Cinthia Bueno Hernández  
Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM.

*Presidenta*

Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla  
Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM.

*Secretaria*

Dra. Roberta Salinas Marín  
Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM.

*Vocal (Tutora)*

Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy  
Instituto de Biotecnología, UNAM.

*Suplente 1*

Dra. Delia Vanessa López Guerrero  
Facultad de Nutrición, UAEM.

*Suplente 2*

Dra. Rosa María Uribe Villegas.  
Instituto de Biotecnología, UNAM.

**Agradecimientos:**

Al apoyo técnico de Quim. Fidelia Romero Arteaga en su asesoría y preparación de soluciones empleadas en las técnicas de extracción de ARN de tejidos y cuantificación de RNAs mensajeros por RT-PCR punto final.

Al Q.F.B. Miguel Cisneros por su apoyo en la cuantificación de corticosterona en suero por radioinmunoensayo.

A la M. en C. María Teresa Solís y al Sr. José Manuel Villa Herrera, por su apoyo en el cuidado de los animales de experimentación empleados en este proyecto y la realización de los experimentos.

A mi tutora de tesis, la Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy por su constante paciencia y atención durante mi estancia en el laboratorio, agradezco el tiempo que me brindó y los sabios consejos que me compartió, los cuales me han ayudado a mejorar día con día en mi desempeño académico.

A mis sinodales, por su tiempo brindado, su apoyo y sus valiosos consejos durante este recorrido.

Al laboratorio de neurobiología molecular y celular del IBT por darme la confianza, y permitirme realizar mi tesis de licenciatura en sus instalaciones.

Este trabajo se realizó con apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), ciencia de fronteras 2019. Proyecto número 265247.

### **Agradecimientos personales:**

Agradezco a mi familia por siempre estar presente y apoyándome en todo momento, especialmente a mis padres quienes me brindan todo su apoyo y amor incondicional, al igual que mi abuelita Zenaida, por siempre preocuparse por mí, ver por mi bienestar y por todo su amor. Agradezco a mi sobrino Cesar, que siempre me saca una sonrisa a pesar de tener días pesados en esta travesía.

Gracias a todas las personas que se han integrado en mi vida en este grandioso recorrido, especialmente a Erika por siempre estar al pendiente de mí, por escucharme, apoyarme y ser paciente conmigo. A las amistades que hice en la universidad quienes siempre estuvieron apoyándome en este recorrido y motivándome siempre. A Carmen y Provi por siempre brindarme un lugar seguro. Y muchas gracias también a mis amistades de toda la vida, mis mejores amigas, que siempre me escuchan, motivan, y alientan a ser mejor día con día, gracias por emocionarse con solo oírme hablar de lo hermosa que es mi carrera.

Agradezco a cada persona que estuvo y aún está presente en mi vida después de estos años, formaron parte de mi crecimiento, porque cada una de estas personas sumo una pequeña parte a mi gran persona. Especialmente quiero agradecerme, por siempre seguir adelante, no rendirme y ser constante en todo momento, gracias, Cinthia, siempre serás mi mejor compañía.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	11
1.1	LA EXPOSICIÓN AL FRÍO	11
1.2	ACTIVACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIO-TIROIDE (HPT) ANTE LA EXPOSICIÓN AL FRÍO	12
1.3	LA EXPOSICIÓN AL FRÍO ACTIVA EL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO (SNS)	13
1.4	LAS HORMONAS TIROIDEAS INDUCEN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE DESACOPAMIENTO 1 (UCP1) RESULTANDO EN LA ACTIVACIÓN DE LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA	14
1.5	EL CICLO CIRCADIANO Y LA REGULACIÓN DE LAS HORMONAS DE TIROTROPINA (TSH), TIROXINA (T4) Y TRIYODOTIRONINA (T3)	15
1.6	VARIACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EN SUERO DE TIROTROPINA (TSH), TIROXINA (T4), TRIYODOTIRONINA (T3) Y CORTICOSTERONA EN EL PERIODO DE LUZ/OSCURIDAD	17
2.	ANTECEDENTES	19
2.1	REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-TIROIDE ANTE LA EXPOSICIÓN AL FRÍO EN EL PERIODO DE LUZ	19
2.2	LA EXPOSICIÓN AGUDA AL FRÍO AUMENTA LOS NIVELES DE ARNm DE LA YODOTIRONINA DESYODASA TIPO 2 (Dio2) Y DE LA PROTEÍNA DE DESACOPAMIENTO 1 (UCP1) EN EL TEJIDO ADIPOSEO PARDOS (BAT)	21
2.3	REGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-TIROIDE (HPT) EN RESPUESTA A UN ESTRÉS AGUDO DEPENDIENTE DEL PERIODO DE LUZ/OSCURIDAD	23
2.4	VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE GENES TERMOGÉNICOS ANTE UN ESTÍMULO DE FRÍO EN DISTINTAS VENTANAS DE TIEMPO DEL PERIODO DE LUZ/OSCURIDAD	24
3.	HIPÓTESIS	26
4.	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GENERAL	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1	PERIODO DE LUZ/OSCURIDAD	28
5.2	CUANTIFICACIÓN DE CORTICOSTERONA POR RADIOINMUNOENSAYO	29
5.3	CUANTIFICACIÓN DE LAS HORMONAS TIROTROPINA (TSH), TIROXINA (T4) Y TRIYODOTIRONINA (T3) POR INMUNOENSAYO (MILLIPLEX)	30
5.4	EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	32
5.5	RT-PCR	33
5.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	33
6.	RESULTADOS	34
6.1	PESO CORPORAL Y DE LOS TEJIDOS ADIPOSES EN ANIMALES SOMETIDOS A 5 °C DURANTE EL PERIODO DE LUZ Y OSCURIDAD.	34
6.2	TEMPERATURA CORPORAL Y CONCENTRACIÓN DE CORTICOSTERONA DESPUÉS DE 1 HORA DE EXPOSICIÓN AGUDA AL FRÍO	35
6.3	EFECTOS DEL FRÍO DURANTE EL PERIODO DE LUZ/OSCURIDAD SOBRE LAS HORMONAS DEL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-TIROIDE (HPT)	36
6.4	EFECTOS DEL FRÍO SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE PARTICIPAN EN LA TERMOGÉNESIS DEL TEJIDO ADIPOSEO PARDOS (BAT)	37
7.	DISCUSIÓN	39

7.1	<i>TEMPERATURA CORPORAL, PESO CORPORAL Y PESO DE LOS TEJIDOS ADIPOSOS</i>	39
7.2	<i>CONCENTRACIÓN SÉRICA DE CORTICOSTERONA Y DE LAS HORMONAS TIROIDEAS (TSH, T4 Y T3) DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AGUDA AL FRÍO</i>	40
7.3	<i>EXPRESIÓN DE GENES QUE PARTICIPAN EN LA ACTIVIDAD DE LA TERMOGÉNESIS EN EL TEJIDO ADIPOSO PARDO (BAT) DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AGUDA AL FRÍO</i>	42
8.	<b>CONCLUSIONES</b>	45
9.	<b>PERSPECTIVAS</b>	46
	<b>REFERENCIAS</b>	47
	<i>ANEXO 1 RADIOINMUNOENSAYO</i>	52
	<i>ANEXO 2 REPORTE DE ANOVA</i>	54
	<i>ANEXO 3 INMUNOENSAYO (MILIPLEX, MERCK MILLIPORE)</i>	54
	<i>ANEXO 4 EXTRACCIÓN DE ARN POR EL MÉTODO DE TIOCIANATO DE GUANIDINA</i>	56
	<i>ANEXO 5 PROTOCOLO PARA RT-PCR</i>	58
	<i>ANEXO 6 TABLA DE DATOS</i>	60

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS:

<b><sup>3</sup>H-Cort</b>	Corticosterona tritiada
<b>AC</b>	Adenilil ciclase
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>Adrb3</b>	Receptor adrenérgico $\beta$ 3
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BAT</b>	Tejido adiposo pardo
<b>B0</b>	Unión en ausencia de corticosterona
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>Cyc</b>	Ciclofilina
<b>D2</b>	Yodotironina desyodasa tipo II
<b>D3</b>	Yodotironina desyodasa tipo III
<b>DPN</b>	Día posnatal
<b>Gs</b>	Proteína G estimuladora
<b>H</b>	Hora
<b>HPT</b>	Eje hipotálamo-pituitario-tiroide
<b>HPR</b>	Enzima de peroxidasa de rábano picante
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormonas
<b>HT</b>	Hormona tiroidea
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>NSB</b>	Unión inespecífica
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Coactivador del peroxisoma del receptor gamma 1 $\alpha$
<b>PKA</b>	Proteína Cinasa A
<b>PPARY</b>	Receptor del proliferador de peroxisomas gamma
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto

<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>SCN</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>SLE</b>	Suero libre de esteroides
<b>SNS</b>	Sistema nervioso simpático
<b>T.A</b>	Temperatura ambiente
<b>T3</b>	Triyodotironina
<b>T4</b>	Tiroxina
<b>THT</b>	Transportadores de hormona tiroidea
<b>TRE</b>	Elementos de respuesta de hormonas tiroideas
<b>TRH</b>	Hormona liberadora de tirotropina
<b>TSH</b>	Tirotropina
<b>UCP1</b>	Proteína de desacoplamiento 1
<b>WAT</b>	Tejido Adiposo Blanco
<b>WAT<sub>epi</sub></b>	Tejido adiposo blanco epididimal
<b>WAT<sub>inter</sub></b>	Tejido adiposo blanco interescapular
<b>WAT<sub>retro</sub></b>	Tejido adiposo blanco retroperitoneal
<b>WAT<sub>tot</sub></b>	Tejido adiposo blanco total.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Activación del eje hipotálamo-pituitario-tiroide (HPT) por la exposición aguda al frío.

**Figura 2.** Activación del tejido adiposo pardo (BAT) por la inducción aguda al frío.

**Figura 3.** Regulación circadiana del eje hipotálamo-pituitario-tiroide (HPT).

**Figura 4.** Fluctuaciones del nivel de tirotropina (TSH), triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) durante 24 horas en ratas macho Wistar.

**Figura 5.** Monitoreo de la concentración de corticosterona cada 4 horas por 24 horas en plasma de ratas macho Wistar.

**Figura 6.** Niveles de triyodotironina (T3) y corticosterona en suero, y niveles de ARNm de *Trh* en el núcleo paraventricular (PVN) después de 0.5, 1, 2 y 6 horas de la exposición al frío.

**Figura 7.** Efecto de la aplicación periférica de corticosterona previo a la exposición al frío, sobre la respuesta de corticosterona, tirotropina (TSH), tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) en suero después de una exposición al frío de 1 hora.

**Figura 8.** Influencia de la administración periférica de corticosterona previa a la exposición al frío, sobre los niveles de ARNm de la proteína de desacoplamiento 1 (*Ucp1*), yodotironina desyodasa tipo II (*Dio2*) y su actividad enzimática en BAT en respuesta a una exposición aguda al frío de 1 hora.

**Figura 9.** Niveles de ARNm de yodotironina desyodasa tipo II (*Dio2*) y de la proteína de desacoplamiento 1 (*Ucp1*) de ratas macho Wistar en el tejido adiposo pardo (BAT), después de una exposición aguda al frío.

**Figura 10.** Cinética de la respuesta en la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) durante 1 semana de exposición al frío en el BAT de ratas macho.

**Figura 11.** Cambios en la actividad del eje hipotálamo-pituitario-tiroide (HPT) después de la prueba de campo abierto (OFT) durante el periodo de luz/oscuridad.

**Figura 12.** Evaluación de la expresión de ARNm de *Pgca1*, *Ucp1* y *Adrb3* en el BAT en respuesta al estímulo de frío en distintos zeitgebers (ZT) del periodo luz/oscuridad.

**Figura 13.** Diagrama experimental.

**Figura 14.** Cuantificación de la concentración de corticosterona en suero por radioinmunoensayo.

**Figura 15.** Diagrama de la cuantificación de la concentración de hormonas de TSH, T3 y T4 en suero por inmunoensayo (Milliplex).

**Figura 16.** Diagrama de la extracción de ARN del BAT.

**Figura 17.** Diagrama experimental de RT-PCR.

**Figura 18.** Peso corporal y peso del tejido adiposo pardo (BAT por sus siglas en inglés) y blanco (WAT por sus siglas en inglés).

**Figura 19.** Temperatura corporal (A) y porcentaje de la concentración de corticosterona con respecto al grupo en el periodo de luz a temperatura ambiente (B) después de una exposición aguda al frío de 1 hora.

**Figura 20.** Influencia de la exposición al frío sobre la actividad de las hormonas del eje HPT.

**Figura 21.** Niveles de ARNm de los genes que regulan la actividad termogénica en BAT después de una exposición aguda al frío.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 *La exposición al frío*

El mantenimiento de la temperatura corporal de acuerdo con un punto de ajuste central es crucial para varios procesos fisiológicos y está regulado en gran medida al equilibrar la producción y disipación de calor (Sentis et al., 2021). Por lo tanto, la vasodilatación es una respuesta importante para disipar el exceso de calor (por ejemplo, durante el ejercicio físico), y la vasoconstricción a menudo ocurre para conservar el calor (por ejemplo, durante la exposición al frío). Al mismo tiempo, los procesos de producción de calor se regulan con la inducción de escalofríos en ambientes fríos. Sin embargo, otros medios pueden contribuir significativamente a mantener la temperatura corporal (Sentis et al., 2021), como la termogénesis adaptativa que está regulada por al menos dos efectores principales: las catecolaminas y las hormonas tiroideas. Ambos sistemas tienen un impacto en la disipación de energía en forma de calor a través de acciones sobre el número y la función de las mitocondrias, especialmente en la grasa parda y el músculo esquelético. Se sabe que las hormonas tiroideas (T3 y T4) actúan a través de sus receptores nucleares específicos, mientras que las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) actúan a través de los receptores adrenérgicos, específicamente el receptor  $\beta$ -3 (Adrb3) en tejido adiposo (Puigserver et al., 1998).

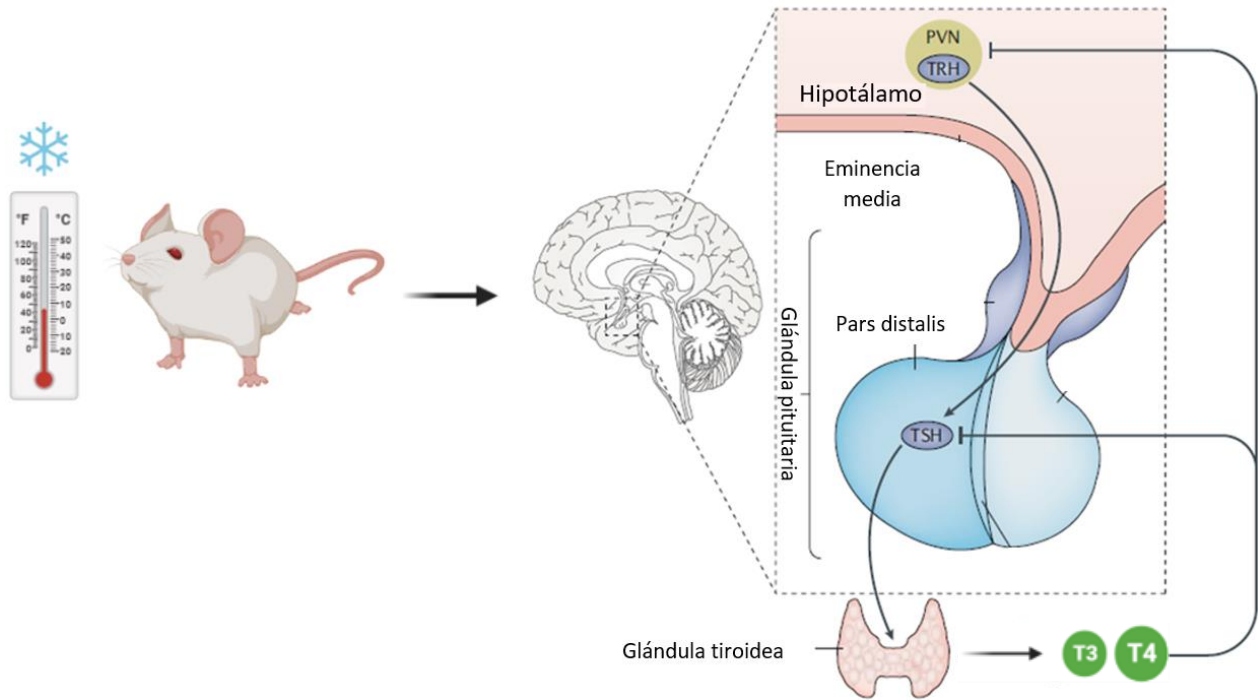
En los seres humanos el músculo esquelético es el principal tejido termogénico, capaz de proporcionar calor rápidamente mediante escalofríos (contracción rápida y relajación muscular). Sin embargo, el tejido adiposo pardo especializado (BAT por sus siglas en inglés) es el principal órgano termogénico, que proporciona una fuente más duradera y sostenible para convertir la energía almacenada en forma de triglicéridos en calor a través de la termogénesis adaptativa en mamíferos. Se ha observado que la exposición aguda al frío aumenta los niveles de expresión de ARNm para múltiples genes que participan en la termogénesis adaptativa, tanto a nivel hipotalámico como periférico (Sentis et al., 2021).

## 1.2 Activación del eje hipotálamo-pituitario-tiroide (HPT) ante la exposición al frío

La producción de calor se lleva a cabo principalmente en el BAT, el cual es el órgano termogénico central en mamíferos pequeños, proporcionando una fuente más duradera y sostenible para convertir la energía almacenada en forma de triglicéridos en calor a través de la termogénesis adaptativa (Sentis et al., 2021).

Los animales homeotérmicos han desarrollado mecanismos termogénicos altamente regulados que permiten mantener una temperatura corporal estable frente a hábitats ambientales generalmente más fríos, incluidas las respuestas fisiológicas y conductuales para generar o conservar el calor. Esta forma de generación de calor en respuesta a la exposición al frío se conoce como termogénesis adaptativa (Puigserver et al., 1998).

Cuando hay una exposición prolongada al frío y la velocidad de producción de calor debe aumentar, las hormonas tiroideas (HT) juegan un papel clave en la regulación de la temperatura corporal. La exposición al frío estimula el eje HPT a nivel hipotalámico al activar las neuronas hipofisiotrópicas productoras de la hormona liberadora de tirotropina (TRH por sus siglas en inglés) (Zhang et al., 2018), esta hormona se secreta desde la eminencia media del hipotálamo a la hipófisis anterior a través del sistema portal hipofisario, aquí la TRH se une a su receptor de membrana en los tirótrofos de la pars distalis de la hipófisis anterior y estimula la síntesis y liberación de tirotropina (TSH por sus siglas en inglés). Posterior a esto, la TSH al unirse a su receptor en la glándula tiroidea la estimula para producir las hormonas tiroideas: la tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3) (fig. 1), liberando estas hormonas al torrente sanguíneo. La glándula tiroidea de mamíferos produce predominantemente el precursor de la hormona T4, por lo que debe haber una activación local de esta hormona en los tejidos diana para la formación de la hormona T3, la cual tiene una mayor actividad biológica (Ikegami et al., 2019).



**Figura 1.** Activación del eje hipotálamo-pituitario-tiroide (HPT) por la exposición al frío. (Editado de Ikegami et al., 2019 con BioRender).

### 1.3 La exposición al frío activa el sistema nervioso simpático (SNS)

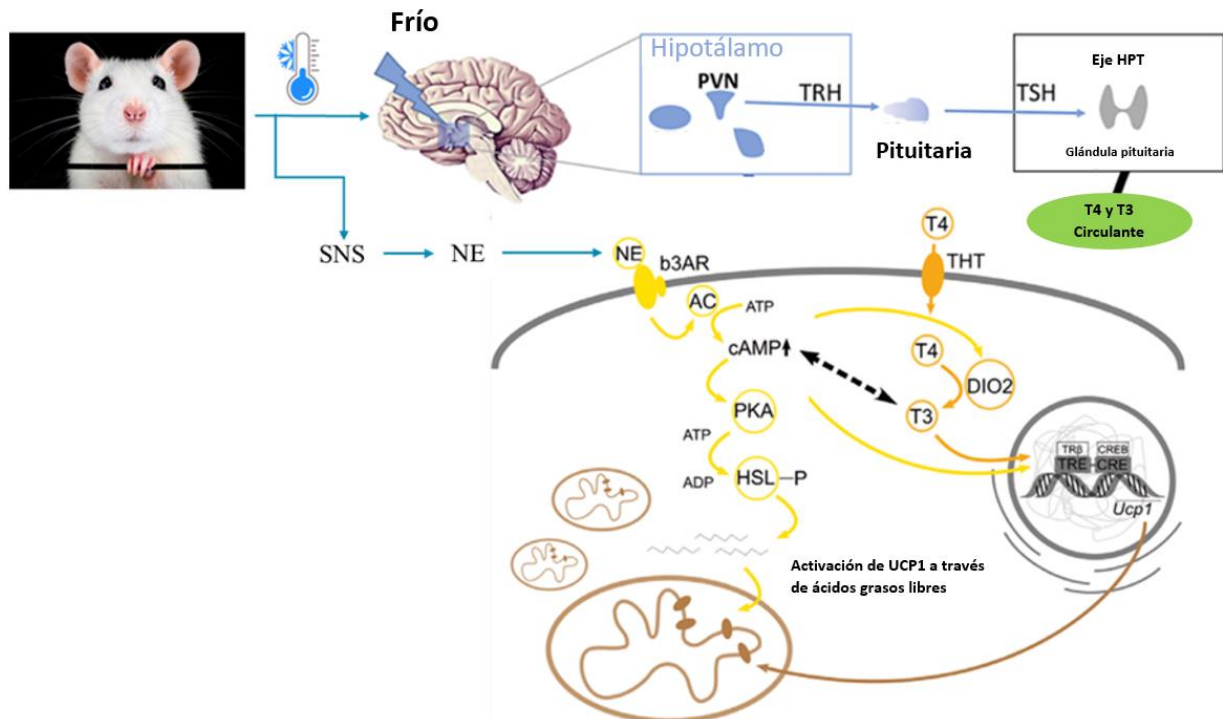
La exposición al frío también activa al sistema nervioso simpático (SNS), el cual envía una señal a través de la norepinefrina (NE por sus siglas en inglés) a los adipocitos marrones ubicados en el BAT. La cascada de señalización de la norepinefrina al unirse con el receptor adrenérgico  $\beta_3$  (Adrb3 por sus siglas en inglés) está mediado por una proteína G estimuladora (Gs por sus siglas en inglés) que activa a la adenilil ciclasa (AC) que a su vez produce adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que activa a la proteína cinasa A (PKA). Este aumento de AMPC por la NE también aumenta la actividad de la yodotironina desyodasa tipo II (DIO2), una enzima que conduce a una conversión intracelular de la tiroxina (T4) a su forma más activa, la triyodotironina (T3) mediante la eliminación de un yodo del anillo exterior (Bianco et al., 2019).

La activación de la PKA tiene una variedad de blancos río abajo como p38 que es una MAP cinasa que fosforila múltiples factores de transcripción como PGC1 $\alpha$  que induce la expresión

de genes termogénicos y promueve la biogénesis mitocondrial, además de ser el coactivador de PPAR $\gamma$  que induce la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1 por sus siglas en inglés). Otro de los objetivos río debajo de la PKA es la lipasa sensible a hormonas (HSL por sus siglas en inglés), que cataliza la hidrólisis de triglicéridos en donde los ácidos grasos libres son los impulsores de la termogénesis, y el sustrato regulador de la actividad de UCP1 (Cannon & Nedergaard, 2004), que es activada por estos ácidos grasos libres (Sentis et al., 2021). UCP1 disipa el potencial electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna conocida como la fuerza impulsora de la síntesis de ATP, provocando el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Watanabe et al., 2008).

#### *1.4 Las hormonas tiroideas inducen la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) resultando en la activación de la termogénesis adaptativa*

Además de la activación del SNS en respuesta al frío, la acción de las hormonas tiroideas en el BAT es esencial para activar la termogénesis adaptativa. Las hormonas tiroideas que han sido liberadas al torrente sanguíneo con una concentración mayor de T4 extracelular, se unen a los transportadores de hormona tiroidea (THT por sus siglas en inglés), aumentando así la concentración intracelular de T4, en donde es necesaria una conversión masiva de T4 a T3 por la DIO2. Al tener una mayor concentración de la hormona T3 se induce la expresión génica de UCP1 a través de los elementos de respuesta de hormona tiroidea (TRE por siglas en inglés) ubicados en el promotor del gen de UCP1 (Sentis et al., 2021). Además, para tener una respuesta máxima es necesaria la saturación de los receptores de hormonas tiroideas (Sentis et al., 2021) (fig. 2).

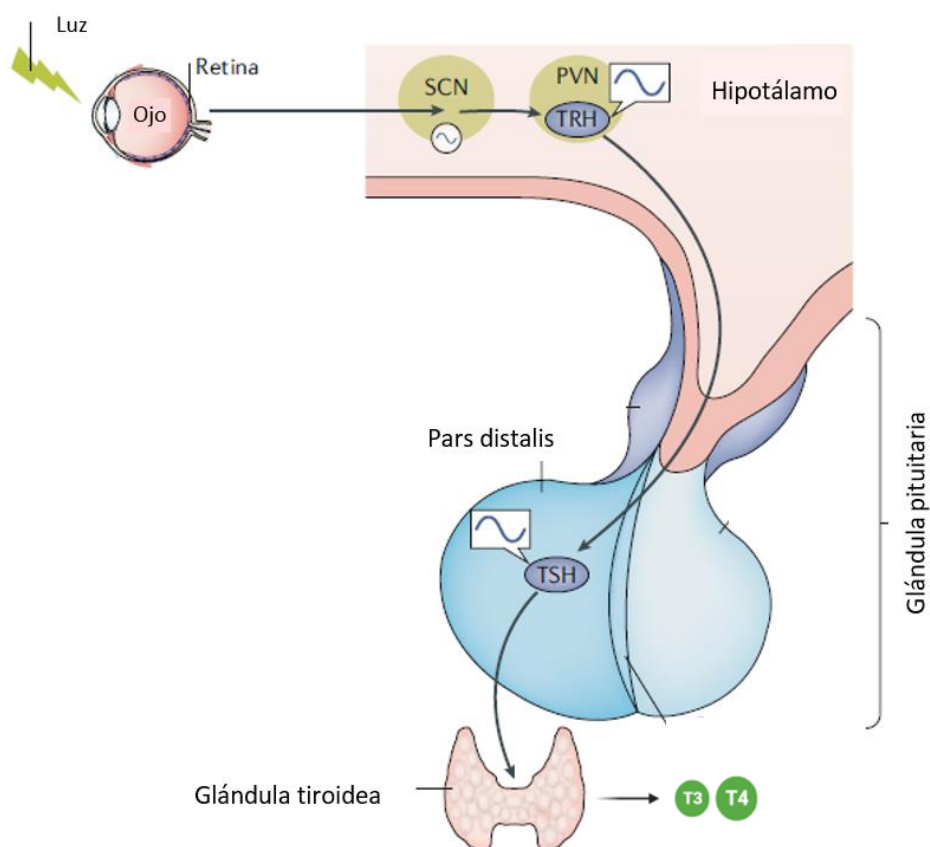


**Figura 2.** Activación del tejido adiposo pardo (BAT) por la inducción aguda al frío. (Editado de Sentis et al., 2021; Zhang et al., 2018).

### 1.5 El ciclo circadiano y la regulación de las hormonas de tirotropina (TSH), tiroxina (T4) y triyodotironina (T3)

Para facilitar la adaptación a los cambios diarios en el entorno impuesto por la rotación de la tierra, la mayoría de los organismos han desarrollado estructuras que tienen una función similar a la de un reloj. En mamíferos y humanos esta adaptación ha resultado en el desarrollo del núcleo supraquiasmático (SCN por sus siglas en inglés) (Kalsbeek et al., 2000a), una estructura ubicada en el hipotálamo anterior por encima del quiasma óptico. El SCN se considera el marcapasos maestro, recibe información lumínica directa de la retina a través del tracto retinohipotalámico sobre el periodo de luz/oscuridad. Este núcleo controla los relojes circadianos, que son mecanismos de cronometraje endógeno altamente conservados. Estos relojes representan oscilaciones autosostenidas con un periodo aproximado de 24 horas denominado ritmo circadiano (Ikegami et al., 2019) (fig. 3). Los ritmos circadianos son

generados por bucles de retroalimentación de transcripción-traducción y modulan múltiples procesos fisiológicos, y de comportamiento como el ciclo de sueño/vigilia, y la liberación de hormonas a determinados tiempos del día, por mencionar algunos. Este reloj circadiano interno regula el eje HPT de los mamíferos y la función tiroidea. La secreción de TSH está controlada en parte por el mecanismo circadiano central en el SCN (Ikegami et al., 2019). Se ha estudiado poco sobre el papel del reloj circadiano en la secreción de las hormonas tiroideas, pero se ha visto que existen fluctuaciones diarias en los niveles plasmáticos de hormonas como TSH, T3, T4 e incluso de corticosterona; y si se lesiona el SCN, se pierde la ritmicidad de estas hormonas (Kalsbeek et al., 2005).



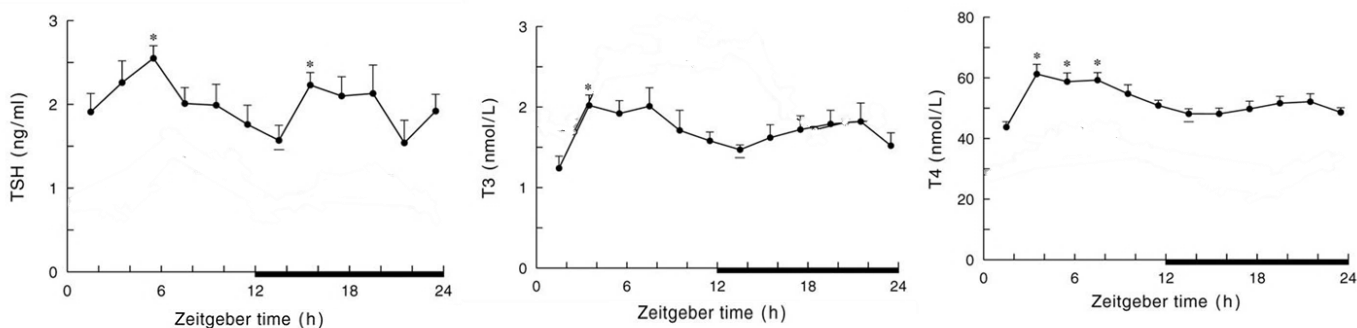
**Figura 3.** Regulación circadiana del eje hipotálamo-pituitario-tiroideo (HPT) (Ikegami et al., 2019). La luz entra a través de la retina y el núcleo supraquiasmático (SCN) recibe estas señales, controlando los relojes circadianos (ritmos circadianos) para modular expresiones de retroalimentación transcripción-traducción de TRH, TSH y HT en determinados tiempos



del día. (PVN: núcleo paraventricular, TRH: hormona liberadora de tirotrópina, TSH: tirotrópina, TH: hormonas tiroideas, T4: tiroxina, T3: triyodotironina).

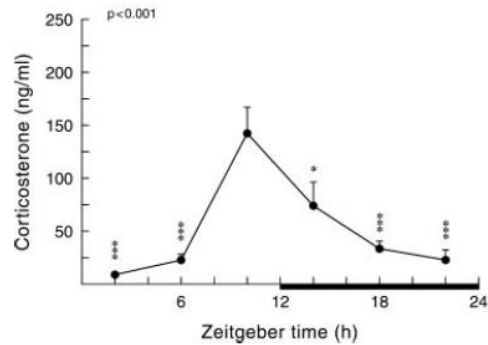
#### 1.6 Variación de las concentraciones en suero de tirotrópina (TSH), tiroxina (T4), triyodotironina (T3) y corticosterona en el periodo de luz/oscuridad

La concentración circulante de las hormonas TSH, T4 y T3 en ratas macho presenta fluctuaciones durante el periodo de luz/oscuridad. Las ratas mostraron un pico máximo en los niveles de T3, T4 y TSH durante la primera mitad del periodo de luz y niveles más bajos al principio del periodo de oscuridad. Sin embargo, hay un segundo periodo de picos máximos de TSH durante la mitad del periodo de oscuridad, aunque estos picos máximos son menores en comparación al observado en el periodo de luz (Kalsbeek et al., 2000a) (fig. 4), lo que demuestra que los niveles séricos de TSH y T4 tienen picos máximos durante el periodo de luz, mientras que T3 muestra picos ligeramente más elevados durante el periodo de oscuridad (Gutiérrez-Mariscal et al., 2012). Por otro lado, también se midieron los niveles de corticosterona, mostrando fluctuaciones significativas durante las 24 horas, observándose niveles bajos al inicio del periodo de luz y 6 horas después del inicio del periodo de oscuridad, demostrando un pico máximo 2 horas antes de iniciar el periodo de oscuridad (ZT10) (Kalsbeek et al., 2005) (fig. 5).



**Figura 4.** Fluctuaciones del nivel de tirotrópina (TSH), triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) durante 24 horas en ratas macho Wistar. La cuantificación de la concentración sérica de las hormonas se realizó por la toma de muestras de plasma cada 2 horas por 24 horas. Las

hormonas tiroideas T3 y T4 se determinaron mediante radioinmunoensayo y TSH mediante un inmunoensayo quimioluminiscente. El periodo de oscuridad se muestra con una línea negra más gruesa que el periodo de luz en la gráfica (Editado de Kalsbeek et al., 2000).



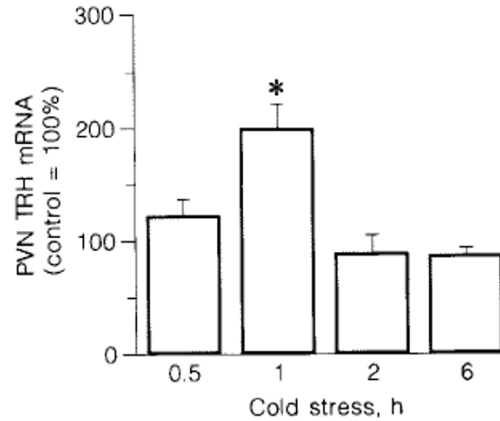
**Figura 5.** Monitoreo de la concentración de corticosterona cada 4 horas por 24 horas en el plasma de ratas macho Wistar. La corticosterona plasmática fue determinada por radioinmunoensayo. El periodo de oscuridad se muestra con una línea negra más gruesa que el periodo de luz en la gráfica (Kalsbeek et al., 2005).

## 2. ANTECEDENTES

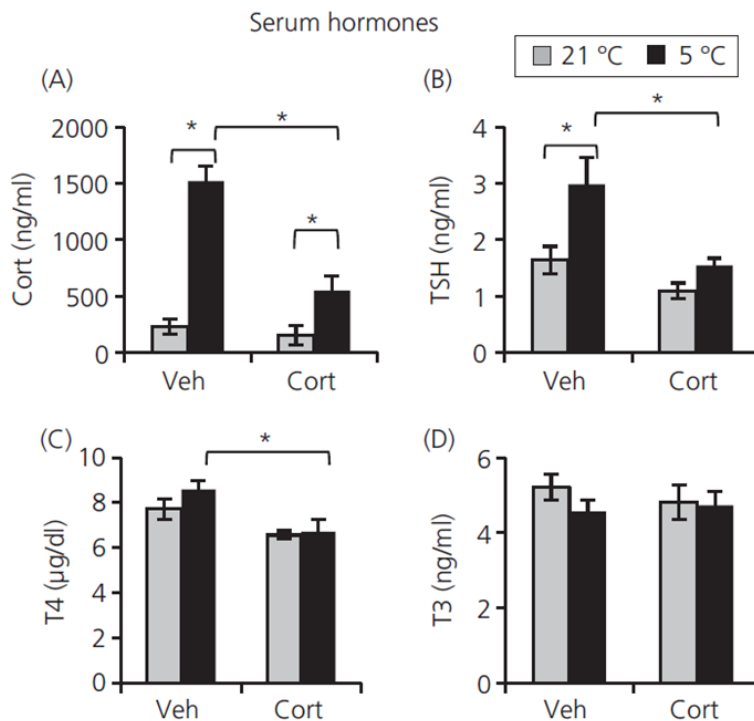
### 2.1 Regulación de la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-tiroide ante la exposición al frío en el periodo de luz

La exposición al frío representa un estímulo de estrés que activa tanto el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal como el tiroideo. Uribe y colaboradores observaron que, al exponer a ratas a 1, 2 y 6 horas al frío durante el periodo de luz, estas presentaban niveles máximos en suero de T3 a las 2 horas. La concentración de corticosterona mantuvo niveles máximos a 1 y 6 horas después de la exposición al frío, mientras que los niveles de *ARNm de Trh* aumentan de manera transitoria en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo 1 hora después de la exposición al frío, regresando a niveles basales después de 2 horas de la exposición aguda al frío (Uribe et al., 1993) (fig. 6). Los animales expuestos al frío en su periodo de actividad durante 6 horas, no mostraron cambio significativo con el grupo que se mantuvo a temperatura ambiente (Uribe et al., 1993). Mientras que cuando, las ratas fueron expuestas a 5 °C por un periodo de 6 horas durante su periodo de reposo (periodo de luz), se observó un aumento significativo en el nivel de *ARNm de Trh* con respecto al grupo control (Zoeller et al., 1990). Es importante notar, que en la respuesta a la exposición al frío hay una coordinación entre la liberación de TRH de la eminencia media (EM) (45 min) y la biosíntesis de *ARNm de Trh* (60 min) en el núcleo paraventricular (Arancibia et al., 1996; Uribe et al., 1993). De igual manera en un estudio realizado por Sotelo-Rivera y colaboradores se observó que, durante la exposición al frío de 1 hora, aumentan los niveles séricos de TSH y de corticosterona (Sotelo-Rivera et al., 2014) (fig. 7). Sin embargo, si el animal presenta niveles elevados de corticosterona previo a ser expuesto al frío, inhibe la biosíntesis de TRH y la liberación de TSH e incluso de la misma corticosterona y en menor medida de la T4 (Sotelo-Rivera et al., 2014).

Tiempo de exposición, h	T <sub>3</sub>	Corticosterona
0.5	117 ± 13 (25)	177 ± 36 (13)
1	122 ± 21 (15)	192 ± 26 (12)*
2	179 ± 12 (16)*	167 ± 42 (13)
6	143 ± 7 (6)	472 ± 136 (11)*



**Figura 6.** Niveles de triyodotironina (T<sub>3</sub>) y corticosterona en suero, y niveles de ARNm de *Trh* en el núcleo paraventricular (PVN) después de 0.5, 1, 2 y 6 horas de la exposición al frío. Las concentraciones de corticosterona y T<sub>3</sub> séricas se determinaron por radioinmunoensayo (Editado de Uribe et al., 1993).

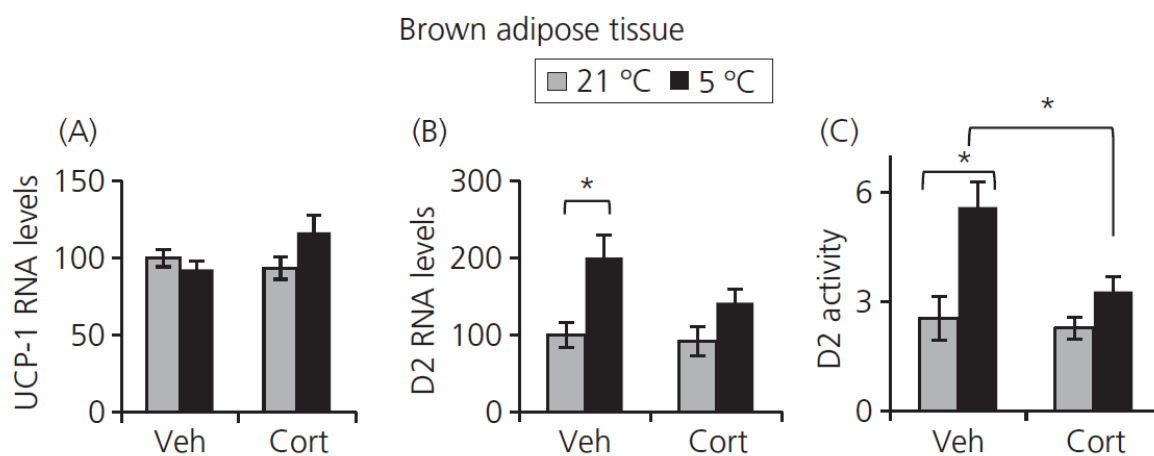


**Figura 7.** Efecto de la aplicación periférica de corticosterona previo a la exposición al frío, sobre la respuesta de corticosterona, tiotropina (TSH), tiroxina (T<sub>4</sub>) y triyodotironina (T<sub>3</sub>) en suero después de una exposición al frío de 1 hora. Las concentraciones de TSH y

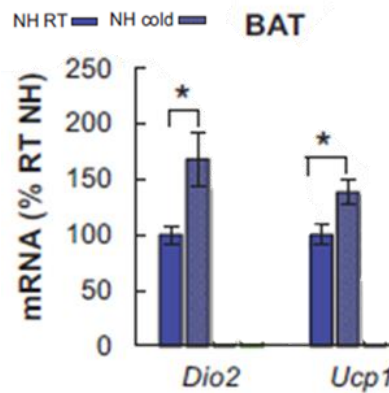
corticosterona sérica se determinaron mediante radioinmunoensayo; las hormonas T4 y T3 se determinaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Veh: inyección de solución salina estéril, Cort: inyección de corticosterona con una dosis de 2.5 mg/kg. (Sotelo-Rivera et al., 2014).

### 2.2 La exposición aguda al frío aumenta los niveles de ARNm de la yodotironina desyodasa tipo 2 (Dio2) y de la proteína de desacoplamiento 1 (Ucp1) en el tejido adiposo pardo (BAT)

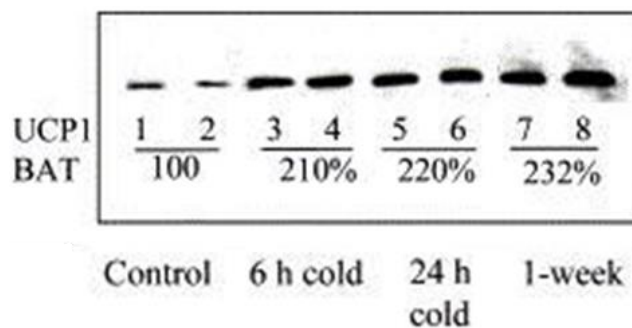
Como se mencionó anteriormente, los mamíferos pequeños son capaces de regular su temperatura corporal al generar calor a través de la termogénesis adaptativa, gracias a la activación de distintos efectores moleculares en el BAT. Por ejemplo, los niveles de ARNm de *Dio2* y la actividad enzimática, así como la expresión de *Ucp1* aumentan en el BAT después de una exposición al frío de 1 hora en el periodo de luz (fig. 8 y 9) (Jaimes-Hoy et al., 2021; Sotelo-Rivera et al., 2014). Sin embargo, niveles elevados de corticosterona previos a la exposición al frío, atenúan significativamente el aumento en la actividad de la DIO2 en BAT en respuesta a la exposición al frío, como se describió para el caso de la concentración de TSH (Sotelo-Rivera et al., 2014). Adicionalmente, Jakus y colaboradores mostraron que la expresión de la proteína UCP1 en el BAT de ratas aumenta gradualmente, en función del tiempo, durante una semana de exposición al frío (Jakus et al., 2002) (fig. 10).



**Figura 8.** Influencia de la administración periférica de corticosterona previa a la exposición al frío, sobre los niveles de ARNm de la proteína de desacoplamiento 1 (*Ucp1*), yodotironina desyodasa tipo II (*Dio2*) y su actividad enzimática en BAT en respuesta a una exposición aguda al frío de 1 hora. Veh: inyección de solución salina estéril, Cort: inyección de corticosterona con una dosis de 2.5 mg/kg. (Tomado de Sotelo-Rivera et al., 2014).



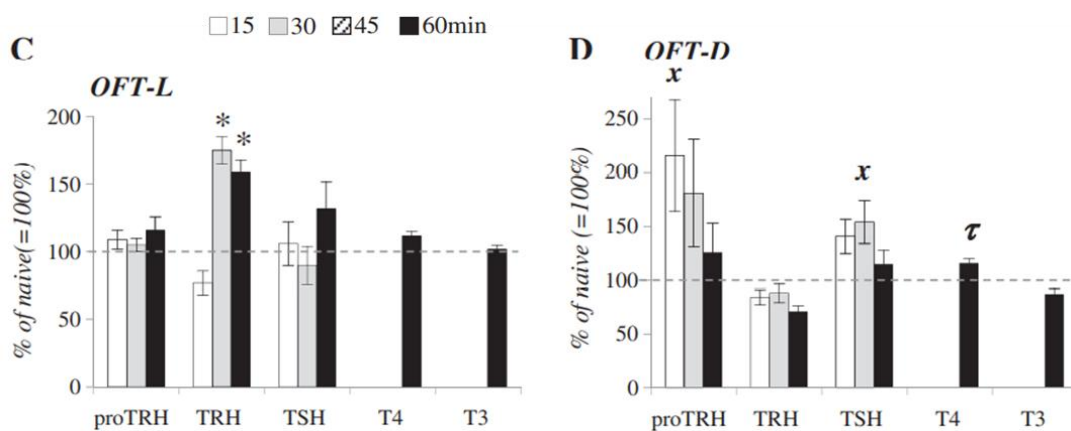
**Figura 9.** Niveles de ARNm de yodotironina desyodasa tipo II (*Dio2*) y de la proteína de desacoplamiento 1 (*Ucp1*) de ratas macho Wistar en el tejido adiposo pardo (BAT), después de una exposición aguda al frío. La concentración de las hormonas T4 y T3 séricas fue determinada mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. NH RT: no manipuladas con exposición a temperatura ambiente, NH cold: no manipuladas con exposición al frío. (Editado de Jaimes-Hoy et al., 2021).

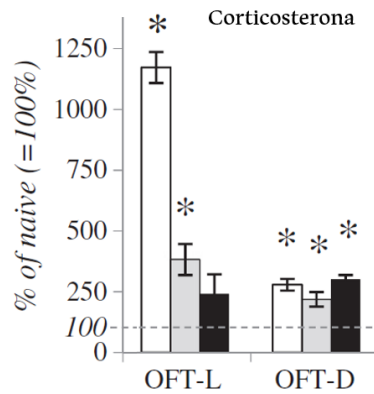


**Figura 10.** Cinética de la respuesta en la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) durante 1 semana de exposición al frío en el BAT de ratas macho. La detección de la proteína UCP1 fue realizada por Western blot (Jakus et al., 2002).

### 2.3 Regulación del eje hipotálamo-pituitaria-tiroide (HPT) en respuesta a un estrés agudo dependiente del periodo de luz/oscuridad

La actividad del eje HPT es particularmente sensible al estrés, y su regulación es modulable dependiendo del tipo y duración del mismo. En un estudio realizado por Gutiérrez-Mariscal y colaboradores, evaluaron la respuesta del eje HPT de ratas macho sometidas a una prueba de estrés psicológico, y compararon la respuesta durante el periodo de luz contra oscuridad. Las ratas fueron sometidas a la prueba de campo abierto (OFT por sus siglas en inglés) en el periodo de luz u oscuridad, esta prueba permite evaluar una conducta de ansiedad, así como locomoción. Se observó que en la prueba de OFT en el periodo de luz no hubo cambios en los niveles de *ARNm de pro-Trh*, TSH sérica o concentraciones de hormonas tiroideas. Sin embargo, sí hubo un aumento en el contenido de TRH del hipotálamo mediobasal (MBH) a los 30 y 60 min del estímulo, lo que indica inhibición de la liberación del péptido relacionado con los niveles más elevados de corticosterona en suero. Mientras que en la prueba de OFT en el periodo de oscuridad, el *ARNm de pro-Trh* aumentó a los 15 min y el contenido de TRH en el MBH disminuyó a los 60 min indicando una mayor liberación en comparación con la prueba realizada en el periodo de luz. También se observó un aumento de TSH sérica a los 30 min y un ligero aumento de T4 a los 60 min sin cambios en T3 sérica (Gutiérrez-Mariscal et al., 2012) (fig. 11). En conclusión, hay una activación del eje HPT en las ratas sometidas a la prueba de OFT durante la oscuridad, y una inhibición en el periodo de luz. Estos resultados sugieren que la regulación del eje HPT en respuesta a un estrés puede depender de la fase circadiana en la cual se exponen las ratas al estrés.





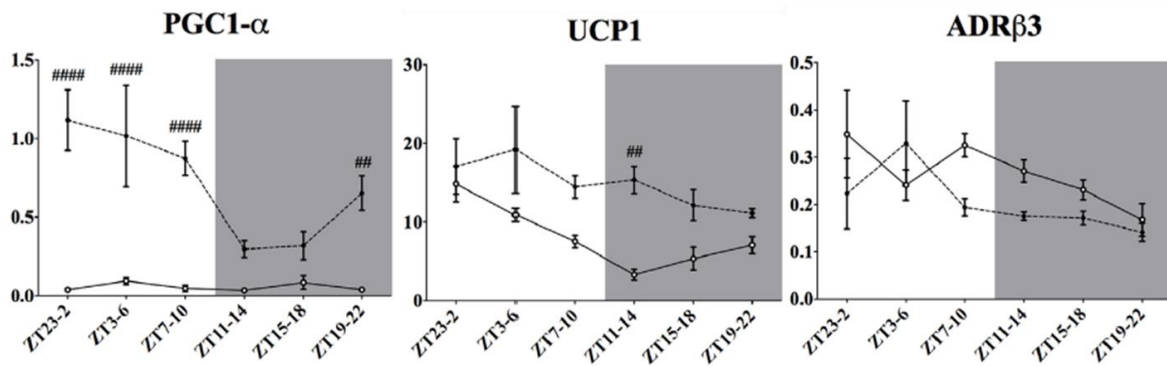
**Figura 11.** Cambios de la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-tiroide (HPT) después de la prueba de campo abierto (OFT) durante el periodo de luz/oscuridad. Niveles de expresión de ARNm de *pro-Trh* en el núcleo paraventricular del hipotálamo, contenido del péptido TRH en el hipotálamo mediobasal (incluye eminencia media donde se libera TRH) y concentración de hormonas TSH, T4, T3 y corticosterona en suero de ratas Wistar macho. Las hormonas se determinaron por radioinmunoensayo. OFT-L: prueba de campo abierto durante el periodo de luz, OFT-D: prueba de campo abierto durante el periodo de oscuridad (Editado de Gutiérrez-Mariscal et al., 2012).

#### 2.4 Variación en la expresión de genes termogénicos ante un estímulo de frío en distintas ventanas de tiempo del periodo de luz/oscuridad

La exposición al frío aumenta la tasa metabólica a través de la termogénesis con escalofríos y sin escalofríos (adaptativa). Ambos están regulados a nivel del SNC, resultando en una mayor oxidación de lípidos y carbohidratos en el músculo esquelético y el BAT. La modulación de las vías termorreguladoras centrales por el reloj biológico en el núcleo supraquiasmático (SCN) puede dar lugar a cambios en los ajustes de exposición al frío según la hora del día. En un estudio realizado en ratas macho Wistar sometidas a un único episodio de 3 horas de frío en uno de los 6 Zeitgebers (3, 7, 11, 15, 19 y 23) se evaluó la expresión del ARNm de *Pgc1a*, *Ucp1* y *Adrb3* en BAT. Se mostró que la hora del día en el que se exponen las ratas a un tiempo prolongado de frío (3h) influye sobre la expresión de ARNm de estos genes, mostrándose las respuestas térmicas, conductuales y metabólicas. Este estudio mostró la regulación positiva de la actividad de BAT durante la exposición al frío de 3 horas en



diferentes zeitgebers (ZT) del día, observándose un aumento significativo en la expresión de *Pgc1a* durante el periodo de luz comparado al periodo de oscuridad (Machado et al., 2018) (fig. 12). Estos estudios sugieren que la regulación de la termogénesis adaptativa en BAT es compleja y depende de varios factores como señales metabólicas, endócrinas, así como del ciclo circadiano. Por tal motivo, resulta interesante estudiar algunos de los marcadores moleculares que participan en la regulación de la termogénesis en animales expuestos a tiempos más cortos de frío (1 hora) para evaluar si este estrés de corta duración altera de manera diferencial la expresión de algunos genes termogénicos, dependiendo de la fase de luz/oscuridad.



**Figura 12.** Evaluación de la expresión de ARNm de *Pgc1*, *Ucp1* y *Adrb3* en el BAT en respuesta al estímulo de frío en distintos zeitgebers (ZT) del periodo luz/oscuridad. Los puntos blancos muestran datos de las ratas a temperatura ambiente y los puntos negros muestran datos de las ratas expuestas al frío durante 3 horas. Los genes se determinaron mediante RT - PCR en tiempo real. (PGC1- $\alpha$ : Coactivador del peroxisoma del receptor gamma 1  $\alpha$ , UCP1: Proteína de desacoplamiento 1, ADR $\beta$ 3: Receptor adrenérgico  $\beta$ 3). (Machado et al., 2018)

### **3. HIPÓTESIS**

El sistema circadiano y el termorregulador influyen de manera recíproca entre sí; además, distintos estímulos estresantes tienen un efecto diferencial sobre la actividad del eje HPT dependiendo de la fase del ciclo circadiano en el cual son expuestos los animales. Por lo tanto, hipotetizamos que una exposición aguda al frío durante 1 hora en la fase de luz producirá una mayor respuesta del eje tiroideo, así como en la expresión de genes que regulan la termogénesis adaptativa del tejido adiposo pardo de ratas macho.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 *Objetivo general*

- Estudiar la expresión de genes termogénicos en el tejido adiposo pardo en la respuesta aguda al frío en el periodo de luz y oscuridad.

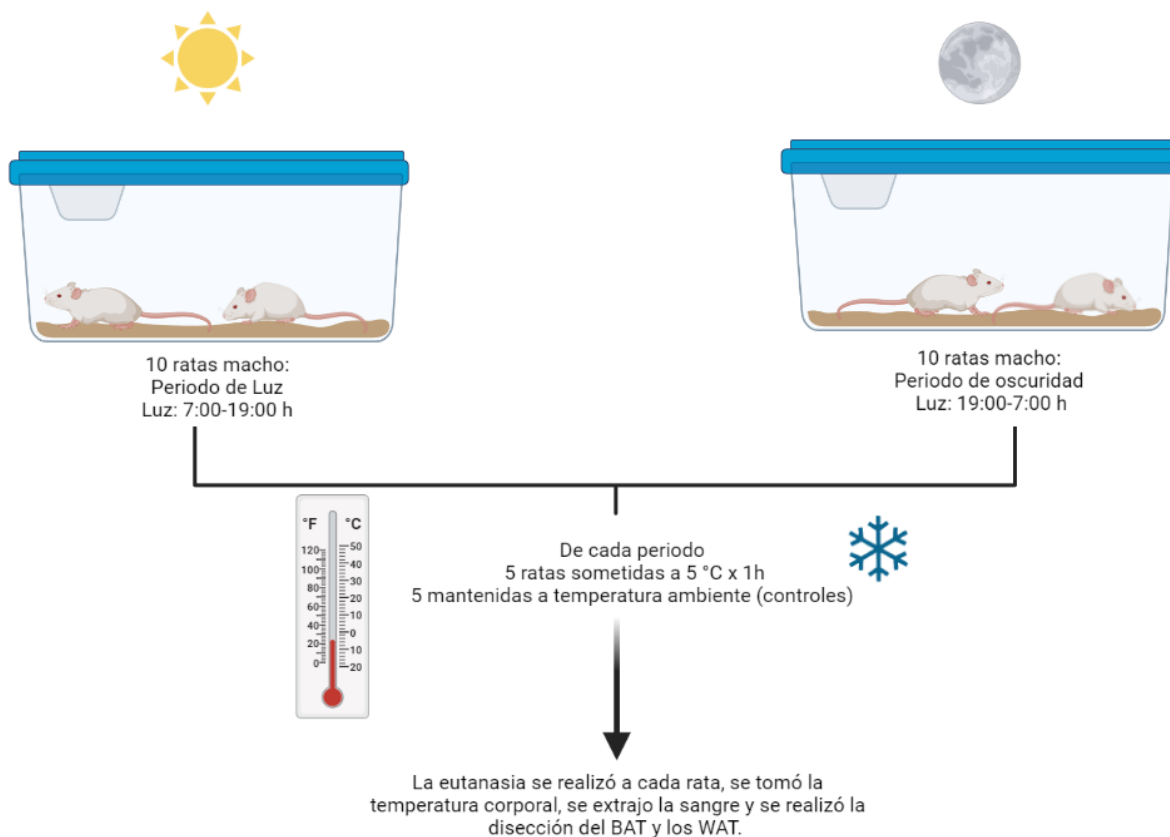
### 4.2 *Objetivos específicos*

- Determinar si hay una respuesta diferencial al estrés inducido por una exposición aguda al frío dependiendo del periodo de luz/oscuridad, a través de la cuantificación sérica de corticosterona por el método de radioinmunoensayo.
- Evaluar el efecto de la exposición aguda al frío en el periodo de luz/oscuridad sobre la concentración sérica de las hormonas que regulan el eje HPT, por el método de inmunoensayo.
- Evaluar la expresión de genes termogénicos en BAT por RT-PCR punto final después de 1 hora de exposición al frío agudo en el periodo de luz/oscuridad.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 *Periodo de luz/oscuridad*

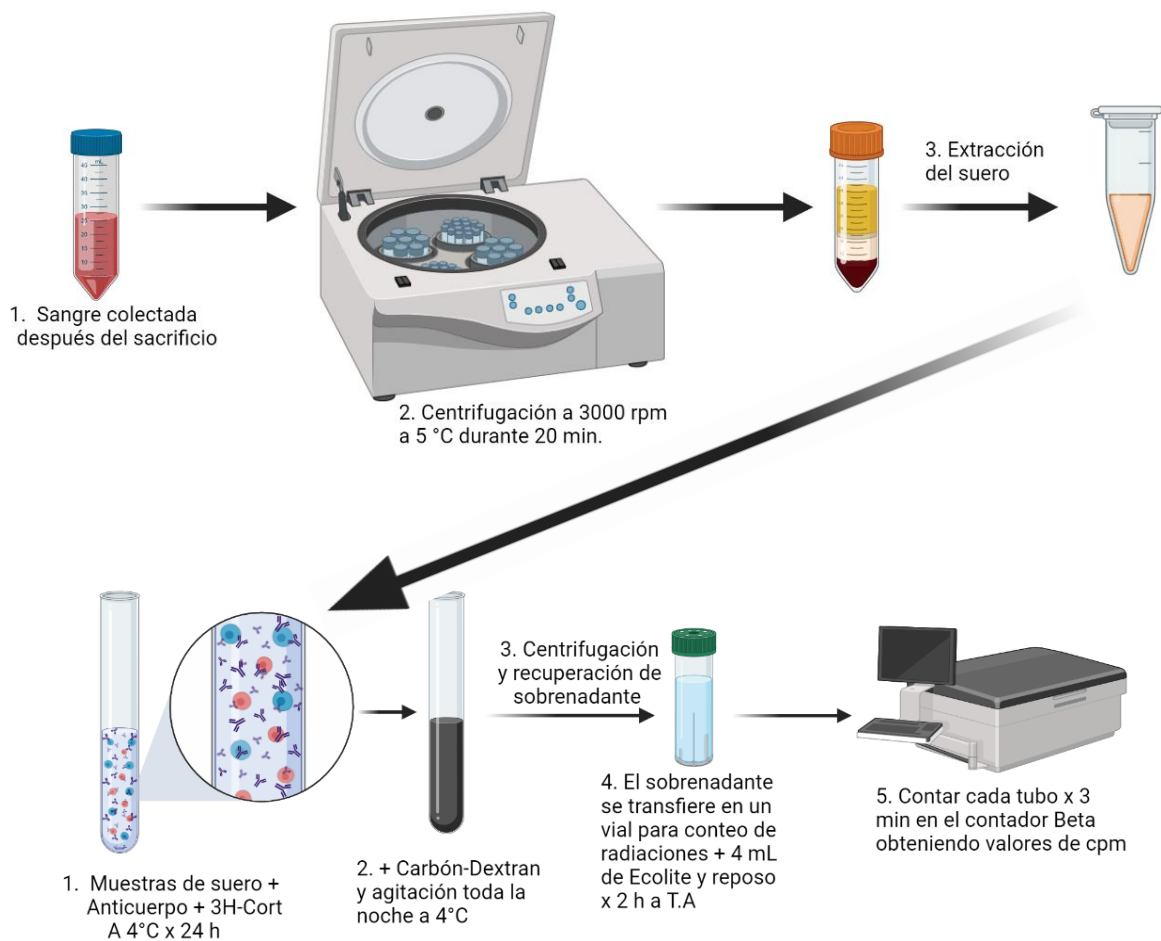
Se utilizaron 20 ratas Wistar macho nacidas en el bioterio del IBT, las cuales fueron destetadas el día posnatal 21 (DPN 21) y se mantuvieron 4 ratas por cada caja en un periodo de luz/oscuridad de 12 horas, la luz se encendía de 7:00-19:00 horas y se apagaba de 19:00 - 7:00 horas. Al día posnatal 37, todas las ratas fueron alojadas en parejas, y la mitad de las ratas (n = 10) fueron transferidas a una sala en donde la luz se encendía de 19:00 - 7:00 horas (grupo periodo de oscuridad), mientras que la otra mitad del grupo se mantuvo (n = 10) con el horario de luz/oscuridad habitual (grupo periodo de luz). Todos los animales tuvieron libre acceso a comida y agua durante todo el experimento y se registró el peso semanalmente, siempre el mismo día y tres horas después del inicio de la fase de luz o de oscuridad. Una semana antes de iniciar el experimento de la exposición aguda al frío, se habituó a las ratas a ser transportadas de su sala al cuarto experimental para reducir el estrés el día del experimento. Al día posnatal 77, la mitad de las ratas que se encontraban en el periodo de luz (n = 5) u oscuridad (n = 5) fueron colocadas en cajas individuales y sometidas durante 1 hora al frío (5 °C). La otra mitad de los animales del ciclo de luz (n = 5) u oscuridad (n = 5), también se aislaron en cajas individuales y permanecieron a temperatura ambiente (TA, 22 °C) durante 1 hora (Figura 13). Posterior a la exposición de frío o de haber permanecido a temperatura ambiente que también se mantuvieron aisladas, a las ratas se les dio muerte inmediatamente con una guillotina, se midió la temperatura corporal, y se recolectó la sangre, se disectó el tejido adiposo blanco retroperitoneal, epididimal, interescapular y el BAT, estos tejidos se pesaron y congelaron inmediatamente en hielo seco (fig. 13). Posteriormente, se centrifugó la sangre y se obtuvo el suero, el cual se almacenó a -70 °C en alícuotas para análisis posteriores de las hormonas: tiroideas, corticosterona y tirotropina.



**Figura 13.** Diagrama experimental (Imagen realizada con Biorender).

### 5.2 Cuantificación de corticosterona por radioinmunoensayo

La concentración de corticosterona se cuantificó en suero por radioinmunoensayo (descrito en el anexo 1). Brevemente, se agregó al suero un anticuerpo específico previamente desnaturalizado, corticosterona tritiada (3H-Cort) y se incubaron las muestras a 4 °C por 24 horas, pasado ese tiempo se agregó carbón - dextran y se mantuvieron en agitación toda la noche a 4 °C, al día siguiente se centrifugó y se recuperó el sobrenadante transfiriéndolo a un vial para conteo de radiaciones beta, se agregó 4 mL de líquido de centelleo (Ecolite) dejando reposar por 2 horas a temperatura ambiente para después contar cada tubo por 3 min en el contador Beta obteniendo las cuentas por minuto (cpm) (fig. 14), para su posterior análisis.

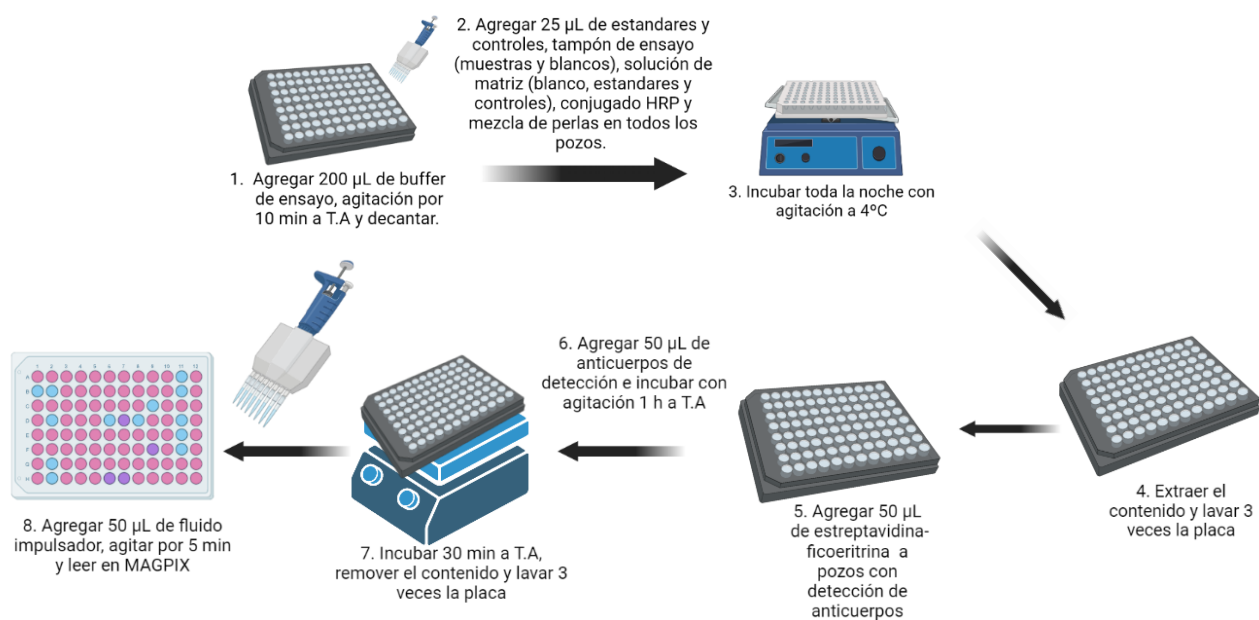


**Figura 14.** Cuantificación de la concentración de corticosterona en suero por radioinmunoensayo (Imagen realizada con Biorender).

### 5.3 Cuantificación de las hormonas tirotropina (TSH), tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) por inmunoensayo (Milliplex)

La concentración de las hormonas TSH, T3 y T4 se cuantificó en suero, por inmunoensayo (Milliplex) descrito en el anexo 3. Brevemente, se añadió 200  $\mu$ L de tampón de ensayo en cada pozo, se selló y mantuvo en agitación por 10 min a temperatura ambiente, posteriormente el tampón de ensayo se decantó golpeando la placa suavemente sobre una toalla absorbente. Se agregaron 25  $\mu$ L de estándares y controles de calidad de ensayo en los pozos correspondientes. Se añadieron 25  $\mu$ L de tampón de ensayo a las muestras y los blancos (estándar de 0 pg/mL). Se añadieron 25  $\mu$ L de solución de matriz a blancos, estándares y

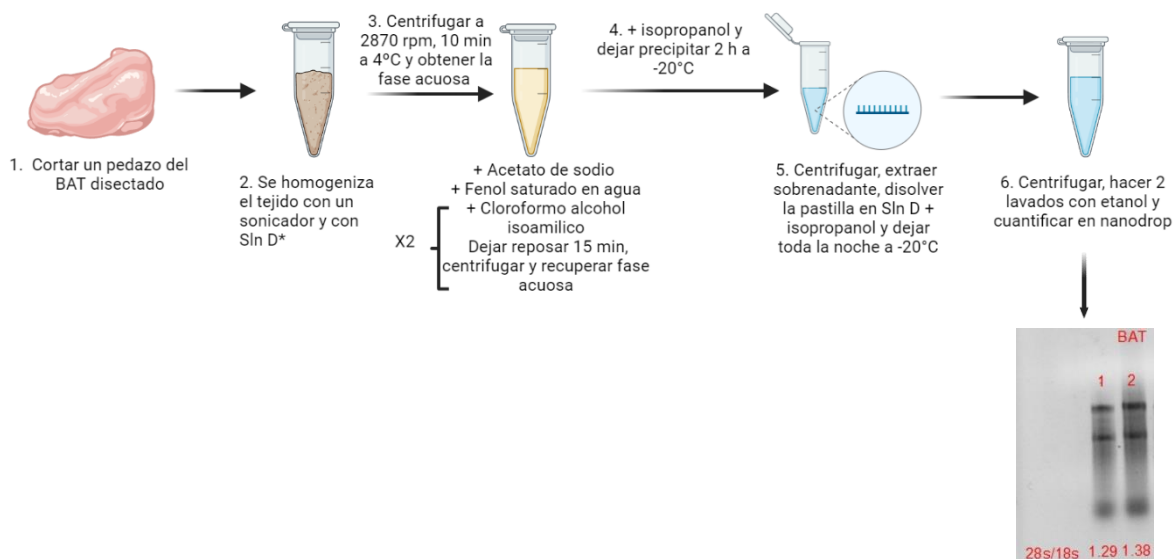
controles. Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de muestras en los pozos adecuados y se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de conjugado HRP (enzima de peroxidasa de rábano picante) en todos los pozos. Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de perlas a cada pozo homogenizando la botella antes de cada agregado, se selló, se tapó con papel de aluminio y se agitó durante toda la noche a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se removió todo el contenido y se lavó la placa 3 veces. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de anticuerpos de detección. Se selló y tapó con papel de aluminio, y se agitó 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de estreptavidina-ficoeritrina a cada pozo que contenía detección de anticuerpos, se selló y tapó con papel de aluminio, y se incubó 30 min a temperatura ambiente. El contenido se colectó y se lavó 3 veces. Se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de fluido impulsor a todos los pozos y se agitó la placa durante 5 min para leerla en el equipo MAGPIX y obtener los valores de pg/mL (fig. 15).



**Figura 15.** Diagrama de la cuantificación de la concentración de hormonas de TSH, T3 y T4 en suero por inmunoensayo (Milliplex) (Imagen realizada con BioRender).

#### 5.4 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total del tejido adiposo pardo se realizó por el método de tiocianato de guanidina, descrito en el anexo 4. Brevemente, se tomó una porción pequeña del BAT previamente disectado y congelado, se homogenizó con solución D, posteriormente se centrifugó a 2870 rpm por 10 min, la fase acuosa se recuperó y colocó en otro tubo eppendorf agregando acetato de sodio 2M, pH 4, fenol saturado en agua fría, cloroformo alcohol isoamílico 49:1 y se mezcló fuertemente por 4 segundos después de agregar cada solución para dejar reposando los tubos 15 min en hielo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm, 22 min a 4 °C. La fase acuosa se recuperó y se repitieron los pasos desde que se añade el cloroformo alcohol isoamílico. Una vez obtenida la fase acuosa se agregó isopropanol, se mezcló y se dejó a -20 °C por 2 horas. Las muestras se centrifugaron a 13,500 rpm a 4 °C, por 30 min. El sobrenadante se desechó y las pastillas se disolvieron en solución D, se adicionó isopropanol frío, se mezclaron las muestras y se mantuvieron a -20 °C toda la noche. Al día siguiente los tubos se centrifugaron a 13,500 rpm, por 30 min a 4 °C, el sobrenadante se retiró y se hicieron dos lavados de las pastillas con etanol al 70% centrifugando a 13,500 rpm para recuperar la pastilla (fig. 16).

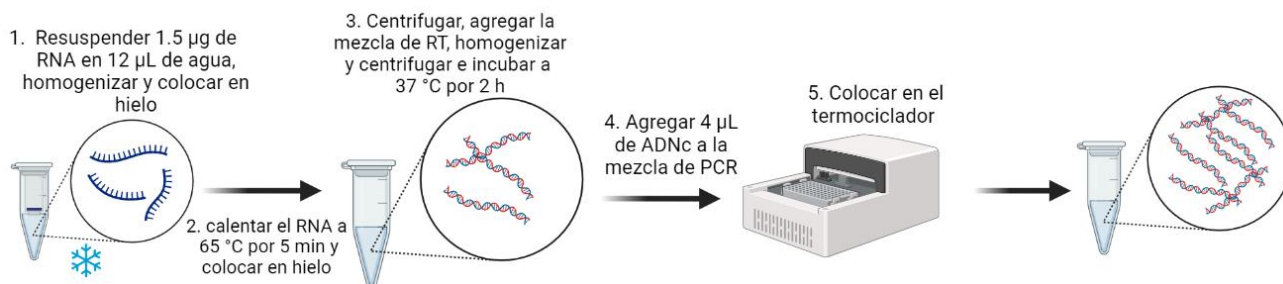


**Figura 16.** Diagrama de la extracción de ARN del BAT (Imagen realizada con BioRender).



### 5.5 RT-PCR

Después de la extracción de ARN total del tejido, se midió la concentración y pureza del ARN en el nanodrop y se verificó la integridad de este por medio de electroforesis en gel de agarosa, finalmente se prepararon alícuotas de 12  $\mu\text{L}$  que contenían en total 1  $\mu\text{g}$  de ARN conservado a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  (descrito en el Anexo 5). Brevemente, se preparó la mezcla de reacción de la transcripción reversa (RT) para la generación de ADNc para cada muestra. Las alícuotas de ARN se calentaron a  $65\text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min y se pasaron inmediatamente en hielo, se centrifugó y se agregó la mezcla de RT a cada tubo de ARN, y se mezcló fuertemente, se centrifugó, y se incubó a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  por 2 horas, Al término de la reacción de RT se preparó la mezcla de reacción para PCR, se tomaron 4  $\mu\text{L}$  de la reacción de RT y se agregó a la mezcla de PCR. Los tubos se colocaron en el termociclador y se seleccionaron los parámetros para cada gen (fig. 17).



**Figura 17.** Diagrama experimental de RT-PCR (Hecho con BioRender).

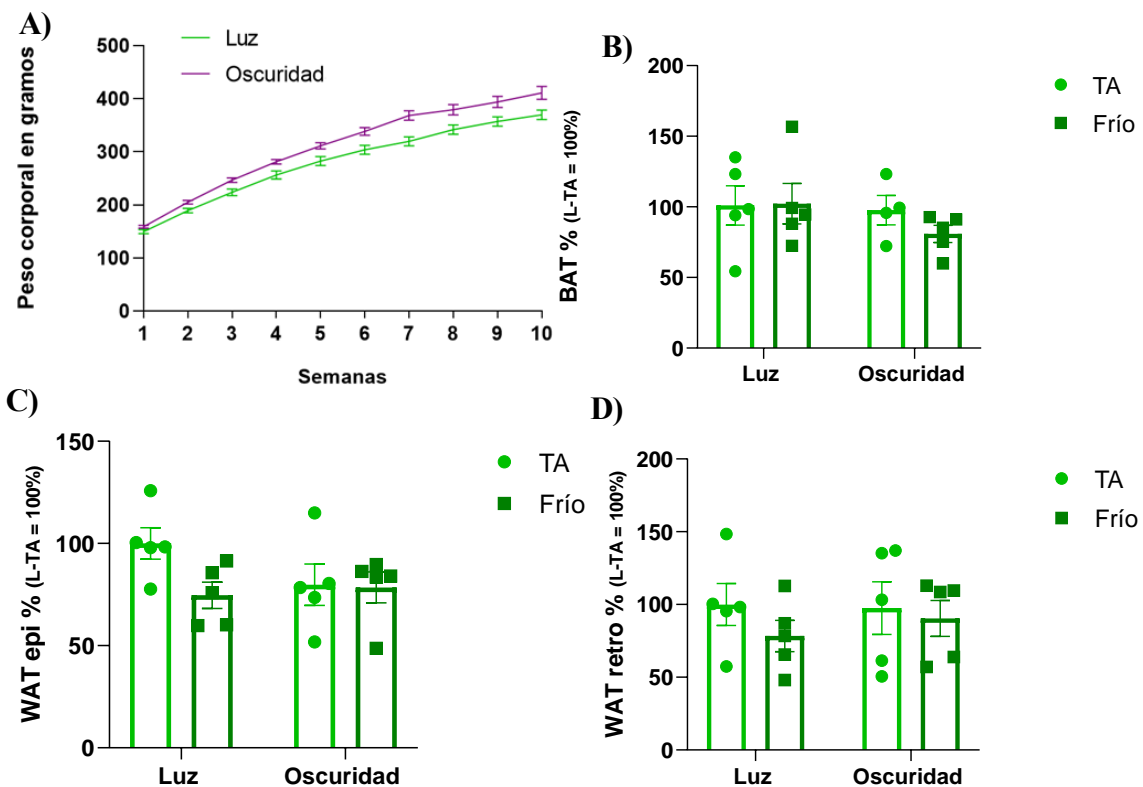
### 5.6 Análisis estadísticos

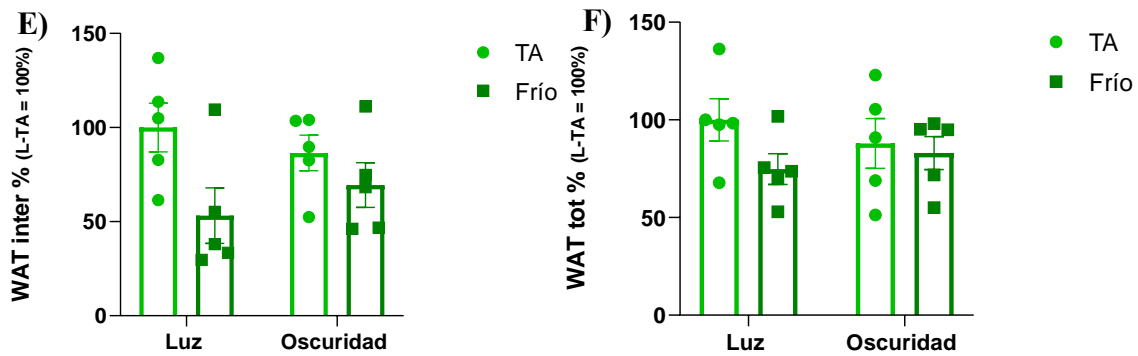
Los datos están presentados como la media  $\pm$  EEM y fueron analizados con un ANOVA de dos vías y la prueba post-hoc de Tukey, se consideró estadísticamente significativo una  $p < 0.05$ . Los análisis y gráficas se realizaron con el programa estadístico GraphPad Prism versión 8.02.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 *Peso corporal y de los tejidos adiposos en animales sometidos a 5 °C durante el periodo de luz y oscuridad.*

Registré el peso de las ratas semanalmente a partir de que la mitad de los animales fueron transferidos a la sala con el ciclo invertido (periodo de oscuridad) y hasta el final del experimento. Como se observa en la figura 18A, los pesos de las ratas en el periodo de oscuridad, fue ligeramente mayor al comparar los con los animales que se mantuvieron con el periodo de luz-oscuridad regular, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. En ambos grupos, después de la exposición al frío de 1 hora o mantenidos a temperatura ambiente de 1 hora, el peso de los tejidos adiposos tanto pardo (BAT) como blanco (WAT) no mostraron diferencia significativa durante el periodo de luz/oscuridad (fig. 18B-F).

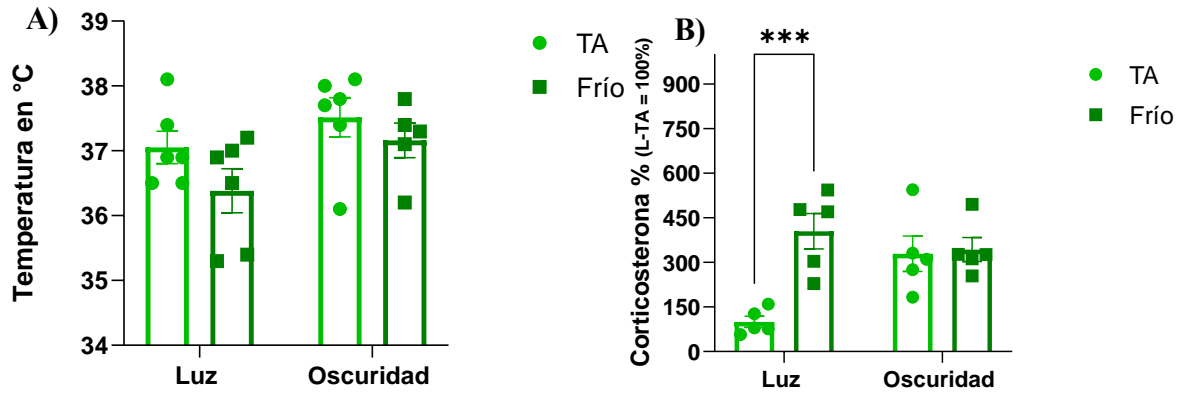




**Figura 18.** Peso corporal y peso del tejido adiposo pardo (BAT por sus siglas en inglés) y blanco (WAT por sus siglas en inglés). A) Peso corporal registrado semanalmente a partir del cambio de horario hasta el día previo al experimento de frío. B) Peso del tejido adiposo pardo (BAT) C) Peso del tejido adiposo blanco epididimal (WAT epi). D) Peso del tejido adiposo blanco retroperitoneal (WAT retro). E) Peso del tejido adiposo blanco interescapular (WAT inter). F) Peso del tejido adiposo blanco total (WAT tot). Los datos de los pesos de los tejidos están presentados como el porcentaje con respecto al grupo en el periodo de luz mantenido a temperatura ambiente y presentan una n = 4/5 para cada grupo y periodo.

### 6.2 Temperatura corporal y concentración de corticosterona después de 1 hora de exposición aguda al frío

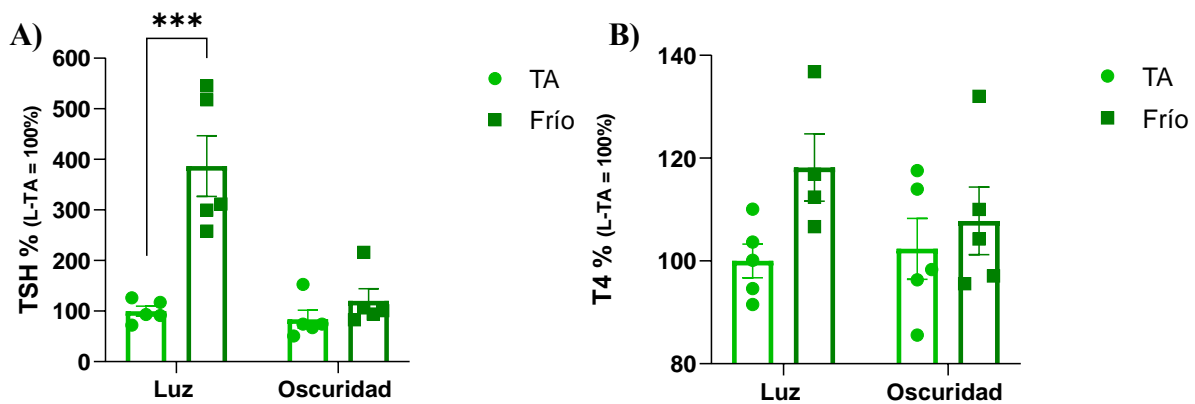
La temperatura corporal de las ratas expuestas a 1 hora de frío se mantuvo en valores similares a la de los animales mantenidos a temperatura ambiente, tanto en la fase de luz como en la de oscuridad (fig. 19A). En respuesta al frío, se observó un aumento significativo en la concentración de corticosterona en suero, solamente en los animales expuestos al frío en el periodo de luz, debido a que el frío es un estímulo que induce un estrés fisiológico que se ve reflejado en el aumento significativo de la concentración sérica de corticosterona. Sin embargo, este efecto no se observó en los animales del periodo de oscuridad en donde la corticosterona mantuvo valores similares para ambas temperaturas (fig. 19B).

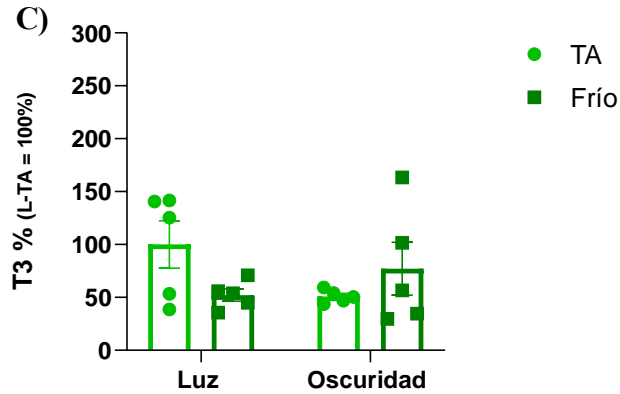


**Figura 19.** Temperatura corporal (A) y porcentaje de la concentración de corticosterona con respecto al grupo en el periodo de luz a temperatura ambiente (B) después de una exposición aguda al frío de 1 hora. Significancia estadística: [\*\*\*P < 0.004]. Los datos presentan una n = 6/5 para cada grupo y periodo.

### 6.3 Efectos del frío durante el periodo de luz/oscuridad sobre las hormonas del eje hipotálamo-pituitaria-tiroide (HPT)

La exposición al frío de 1 hora indujo un aumento significativo de la concentración de tirotrópina (TSH) en suero en el periodo de luz como se ha reportado previamente (Sotelo-Rivera et al., 2014). Sin embargo, este estímulo no se observó en el periodo de oscuridad (fig. 20A). Mientras que las concentraciones séricas de tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) no tuvieron cambios significativos (fig. 20B y C), como se ha reportado anteriormente (Sotelo-Rivera et al., 2014; Uribe et al., 1993), estas hormonas aumentan su concentración sérica en tiempos más prolongados de exposición al frío.

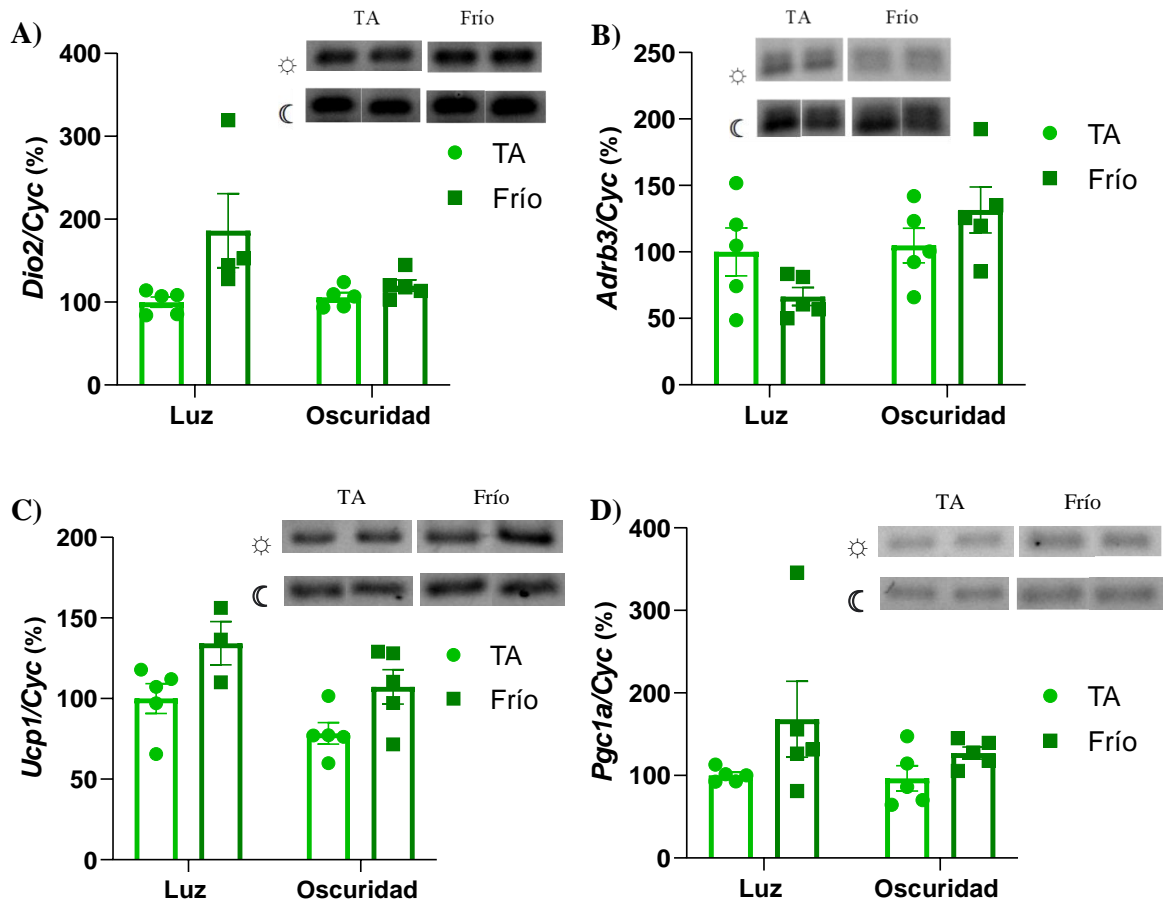




**Figura 20.** Influencia de la exposición al frío sobre la actividad de las hormonas del eje HPT. Porcentaje de la concentración en suero de tirotrópina (TSH) (A), tiroxina (T4) (B) y triyodotironina (T3) (C) con respecto al grupo en el periodo de luz mantenido a temperatura ambiente. Los datos presentan una n = 5 para cada grupo y periodo.

#### 6.4 Efectos del frío sobre la expresión de genes que participan en la termogénesis del tejido adiposo pardo (BAT)

Se cuantificó la expresión de algunos genes (*Ucp1*, *Dio2*, *Adrb3*, *Pgc1a*) que participan en la actividad termogénica del BAT. No encontramos diferencias significativas en la expresión de ninguno de estos genes estudiados después de 1 hora de exposición al frío en el periodo de luz u oscuridad. Solamente observamos que, en los animales expuestos al frío durante la fase de luz, hay una tendencia de aumento en el ARNm de los genes que son blanco de las hormonas tiroideas (*Ucp1*, *Dio2* y *Pgc1a*), sin tendencia en el gen de *Adrb3*.



**Figura 21.** Niveles de ARNm de los genes que regulan la actividad termogénica en BAT después de una exposición aguda al frío. Expresión del gen de *Dio2* (A), *Adrb3* (B), *Pgc1a* (C) y *Ucp1* (D) ante una exposición al frío de 1 hora. En cada panel se muestra una imagen representativa del gel de agarosa con los genes de interés. Los datos presentan una n = 5 para cada grupo y periodo. Además, están presentados como el porcentaje con respecto al grupo en el periodo de luz mantenido a temperatura ambiente.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 *Temperatura corporal, peso corporal y peso de los tejidos adiposos*

Entender cómo influyen los ritmos circadianos sobre distintos aspectos biológicos es importante para estudiar la respuesta neuroendocrina del organismo ante un estrés. En este estudio monitoreamos semanalmente la ganancia de peso de todas las ratas siempre en el mismo horario (3 - 4 horas después de prenderse [periodo de luz] o apagarse la luz [periodo de oscuridad]). Si bien no encontramos diferencias significativas en el peso corporal entre las ratas del periodo de luz y oscuridad, se observó que las ratas del periodo de oscuridad tienden a pesar un poco más que las ratas del periodo de luz. Esta diferencia de peso entre el día vs la noche se explica por la diferencia de consumo de alimento durante los periodos de reposo y actividad de la rata (Le Magnen & Devos, 1982). Las ratas son animales nocturnos y el mayor porcentaje de ingesta de alimentos se lleva a cabo en la fase de oscuridad, de hecho, la ingesta calórica excede el gasto calórico en un 32% (Le Magnen & Devos, 1982). Incluso se ha reportado que las ratas macho pesan hasta 10 - 12 g más en la fase oscura comparada a la fase de luz (Sumitomo Chemical Co., Ltd. & Kawamura, 2020). Este ciclo de ganancia-pérdida de peso en un periodo de 24 horas se ha asociado a una mayor lipogénesis en el periodo de oscuridad y una mayor lipólisis en el periodo de luz (cuando los animales consumen la menor cantidad de alimento) (Le Magnen & Devos, 1982). En línea con lo observado en el peso corporal, tampoco encontramos diferencias significativas en el peso de los tejidos adiposos blancos y pardo entre las ratas del grupo luz vs oscuridad mantenidas a temperatura ambiente o expuestas al frío. Tiempos prolongados de exposición al frío (varias semanas) produce un aumento sostenido en el tono simpático induciendo la diferenciación de nuevos adipocitos marrones, lo que lleva a la hiperplasia e hipertrofia tisular (Bukowiecki et al., 1986). Sin embargo, durante la exposición al frío de 1 hora, los tejidos adiposos tanto el BAT y los WAT, no mostraron un aumento de peso, esto debido al tiempo de exposición al frío que fue un periodo corto.

Estímulos externos como cambios en la temperatura ambiental son señales que modulan mecanismos adaptativos en el organismo. El sistema de termorregulación de los mamíferos está adaptado a los cambios periódicos de la temperatura ambiental, y se ha demostrado una

interacción recíproca entre la regulación de la termogénesis y el sistema que regula el ciclo circadiano (Machado et al., 2018). La temperatura corporal de las ratas oscila a lo largo del día, observándose un pequeño aumento en el periodo de oscuridad, el cual es la fase activa de las ratas. Este incremento en la temperatura corporal se debe a una mayor actividad locomotora asociado a un mayor consumo de agua y alimentos (Machado et al., 2018). En nuestros experimentos también observamos que la temperatura corporal de las ratas mantenidas a temperatura ambiente fue mayor en la fase de actividad vs la fase de reposo (38 °C vs 37 °C). Después del experimento de la exposición al frío, se midió la temperatura corporal y no se observó una diferencia significativa en la temperatura en ningún grupo de ratas comparado con los animales mantenidos a temperatura ambiente, sugiriendo que todos los animales fueron capaces de mantener la temperatura corporal independientemente del periodo de luz u oscuridad en el que se encontraban ante la exposición al frío. Sin embargo, se observó que los animales expuestos al frío durante el periodo de oscuridad tienden a mantener una mayor temperatura corporal comparada a las ratas del grupo L-frío (37 °C vs 36 °C). Se ha reportado que la temperatura corporal cambia en respuesta al frío dependiendo de la hora del día, por ejemplo, 3 horas de exposición al frío induce una hipertermia transitoria en el periodo de luz (entre el zeitgeber 3 y 5), mientras que en el periodo de oscuridad la temperatura corporal se mantiene elevada durante las última dos horas de exposición al frío (Machado et al., 2018).

### *7.2 Concentración sérica de corticosterona y de las hormonas tiroideas (TSH, T4 y T3) después de la exposición aguda al frío*

Los niveles plasmáticos de corticosterona muestran un ritmo circadiano, y los valores más altos ocurren durante la fase de oscuridad en los animales (Kalsbeek et al., 2005), justo en la ventana de tiempo donde realizamos los experimentos, confirmando que nuestras ratas del grupo de oscuridad tendieron a presentar valores más elevados de corticosterona con respecto al grupo de luz (75 vs 122 ng/mL). Las situaciones estresantes, como la exposición al frío, induce un aumento de los niveles de corticosterona (Takeuchi et al., 1977). Después del experimento de exposición al frío durante 1 hora, los niveles séricos de corticosterona aumentaron significativamente en las ratas del grupo del periodo de luz, como se ha reportado



anteriormente (Uribe et al., 1993). Sin embargo, las ratas expuestas al frío durante el periodo de oscuridad no mostraron una mayor liberación de corticosterona comparada a las ratas mantenidas a temperatura ambiente, estas diferencias podrían explicarse en parte debido a que la respuesta endócrina al estrés también presenta variaciones circadianas. El mayor aumento de corticosterona en respuesta al estrés ocurre cuando la hormona está en su nivel circadiano más bajo (fase de luz) y las respuestas mínimas ocurren en el punto máximo (fase de oscuridad) (Gutierrez-Lopez et al., 2012; Retana-Márquez et al., 2003). Trabajos del laboratorio han demostrado que el aumento de corticosterona inducido por un estrés agudo (Uribe et al., 2011) o por su administración vía i.p. (Sotelo-Rivera et al., 2014) previo a la exposición al frío atenúa significativamente el aumento de la corticosterona en suero después de la exposición al frío.

La exposición al frío activa el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides, aumentando la síntesis de *Trh* en el núcleo paraventricular del hipotálamo, la liberación de TSH y la concentración de hormonas tiroideas en la circulación, en conjunto activan la termogénesis y la adaptación al frío (Zhang et al., 2018). Sin embargo, estos cambios son transitorios, la expresión del ARNm de *Trh* llega a su máximo pico a la hora de exposición al frío, regresa a valores basales a las 2 horas, mientras que la concentración de T3 aumenta significativamente a las 2 horas y posteriormente regresa a valores basales (Uribe et al., 1993). En nuestros experimentos reproducimos el aumento significativo de TSH en suero de ratas expuestas 1 hora al frío durante la fase de luz, sugiriendo una activación del eje HPT, mientras que no encontramos cambios en la concentración de hormonas tiroideas en este tiempo; sin embargo, esta respuesta de TSH se encontró inhibida en los animales expuestos al frío durante la fase de oscuridad. Esta falta de respuesta de TSH ante el estímulo del frío durante la fase de oscuridad podría explicarse por la elevada concentración basal de corticosterona durante la ventana de tiempo que se realizó el experimento de frío. En el laboratorio se ha demostrado que una elevada concentración de corticosterona previo a la exposición de frío inhibe la síntesis y liberación de TRH y por tanto la de TSH (Gutierrez-Lopez et al., 2012; Sotelo-Rivera et al., 2014; Uribe et al., 2011). Adicionalmente, tanto la liberación hipotalámica de TRH como la concentración circulante de TSH presentan ritmicidad circadiana (Covarrubias et al., 1994; Kalsbeek et al., 2005). La liberación basal de TRH es mayor a las 7:00 horas y menor a las

19:00 horas (Covarrubias et al., 1994), coincidente con la mayor concentración de TSH en el día que en la noche (Angel Vargas et al., 2002; Kalsbeek et al., 2005).

### *7.3 Expresión de genes que participan en la actividad de la termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT) después de la exposición aguda al frío*

Una temperatura ambiental más baja estimula la actividad termogénica del tejido adiposo pardo (BAT) (Machado et al., 2018), que es necesaria para mantener la temperatura corporal bajo estas condiciones. De igual manera, la exposición aguda al frío aumenta la expresión de los niveles de ARNm para múltiples genes (*Dio2*, *Adrb3*, *Pgc1a* y *Ucp1*) que participan en la termogénesis adaptativa en BAT (Sentis et al., 2021). Esto sucede de manera transitoria y está regulado por componentes moleculares del reloj biológico endógeno que interactúa con los mecanismos térmicos y metabólicos directamente involucrados en la defensa de la temperatura corporal (Machado et al., 2018). Se ha reportado que la expresión de ARNm de *Dio2* tiene un aumento significativo después de 1 hora de exposición al frío (Jaimes-Hoy et al., 2021; Sotelo-Rivera et al., 2014). En nuestro experimento, no hubo una reproducción del aumento significativo de este gen en ratas expuestas durante 1 hora al frío en la fase de luz u oscuridad. Esta respuesta ausente de *Dio2* ante el estímulo de frío durante la fase de luz u oscuridad se podría explicar por una respuesta elevada de la concentración basal de corticosterona durante la ventana de tiempo en la que se realizó el experimento de frío. Se ha demostrado que una elevada concentración de corticosterona previa a la exposición de frío inhibe la expresión de ARNm de *Dio2* y su actividad enzimática (Sotelo-Rivera et al., 2014). Por otro lado, se ha reportado que la expresión de ARNm de *Adrb3* aumenta después de 2 horas de exposición al frío (8 °C) (Scarpace et al., 1999). En nuestro experimento de exposición al frío agudo durante 1 hora (4° C), no hubo un aumento significativo de este gen durante la fase de luz u oscuridad. Esta falta de respuesta de la expresión de ARNm de *Adrb3* al estímulo de frío agudo podría deberse por el tiempo corto de exposición, se ha demostrado también que una exposición al frío durante 3 horas (con monitoreo de 24 horas) presenta fluctuaciones diarias de *Adrb3* con picos elevados durante la fase de luz y niveles en descenso durante la fase de oscuridad que podrían estar relacionados con la hora del día y la regulación del SCN (Machado et al., 2018), y el tiempo de exposición al frío, debido a que el frío cambia la expresión de los receptores catecolaminérgicos (*Adrb3*) en el BAT, lo que indica que

también factores hormonales y autonómicos, es decir, no metabólicos, podrían estar involucrados en este proceso de cambio (Machado et al., 2018) por la durabilidad de la exposición al frío causando la respuesta ausente de este gen. En cuanto al cambio de expresión de *Ucp1* ante el estrés causado por el frío durante 1 hora, se han reportado resultados variables en ratas macho, o un aumento significativo en la expresión de ARNm de *Ucp1* (Jaimes-Hoy et al., 2021), o ningún cambio (Sotelo-Rivera et al., 2014) como observamos en los resultados presentados en este trabajo. Aunado a esto, se ha reportado que la expresión de *Pgc1a* aumenta principalmente durante la fase de luz después de una exposición al frío de 3 horas (entre el ZT2-10) comparado con las ratas mantenidas a temperatura ambiente, mientras que la fase de oscuridad aumenta solamente hacia el final del ciclo (entre ZT19-22) (Machado et al., 2018), que apunta hacia un cambio pronunciado en la actividad mitocondrial de BAT en respuesta a la transición de la fase de luz a oscuridad (Orozco-Solis et al., 2016) y a cambios en la temperatura ambiente a través de un posible mecanismo de compensación de temperatura (Machado et al., 2018). En nuestro experimento de exposición al frío agudo durante 1 hora, no observamos un aumento significativo en la expresión de ARNm de *Pgc1a* durante la fase de luz u oscuridad. Sin embargo, nuestros resultados apuntan a una ligera tendencia de aumento en la expresión de ARNm durante la exposición al frío en la fase de luz. Esto podría estar relacionado a que estas respuestas metabólicas inducidas por el frío y los cambios en la expresión génica de BAT difieren dependiendo de la hora del día de la exposición al frío (Machado et al., 2018), y del tiempo de exposición del mismo.

Además de lo anterior, resulta importante resaltar que distintos factores regulan la expresión génica de las hormonas, por lo tanto, cada hormona y expresión de genes presenta oscilaciones transitorias durante los ciclos circadianos de 24 horas (Kalsbeek et al., 2000), siendo una regulación compleja. Estas variaciones diarias en las concentraciones hormonales se han estudiado y se ha reportado que TSH, T4, y T3 mantienen picos elevados de las concentraciones séricas tan solo unas horas después de encender la luz (aproximadamente 5 horas después) (Kalsbeek et al., 2000), mientras que la concentración de corticosterona empiezan a aumentar en la primera mitad del periodo de luz con un pico máximo después de 12 horas de haber prendido la luz (Kalsbeek et al., 2000, 2005), tomando en cuenta estas oscilaciones diarias y lo antes reportado, podríamos relacionar nuestros resultados con un

bajo aumento de las hormonas tiroideas, y una baja expresión de genes debido a la hora del día en la que los animales fueron expuestos al frío, esto considerando que hubo un sesgo de tiempo de 10 minutos entre un animal y otro al ser introducidos a la cámara frigorífica con la finalidad de que los tiempos de muerte no se empalmaran. Durante cada periodo (luz u oscuridad) se registró una variación de tiempo de entre 15 – 40 minutos de la entrada del primer animal al último a la cámara frigorífica para cada grupo. Además, las ratas del periodo de O – TA / O – Frío fueron expuestas al frío de 2 a casi 3 horas después del cambio de periodo, mientras que las ratas del periodo de L – TA / L – Frío fueron expuestas al frío unos minutos antes de las 4 horas del cambio de periodo, y unos minutos después de las 4 horas del cambio de periodo respectivamente. Estas variaciones en el tiempo podrían estar afectando nuestros resultados debido a las fluctuaciones diarias que existen. La hora de la exposición al frío en trabajos antes reportados después del cambio de periodo es en la hora 0, 1 y 2 (Gutiérrez-Mariscal et al., 2012; Jaimes-Hoy et al., 2021; Sotelo-Rivera et al., 2014; Uribe et al., 1993) mientras que en nuestro experimento las horas de exposición al frío tuvieron variaciones aproximadas de entre 2 – 4 horas para cada periodo y entre 15 – 40 minutos para cada grupo, lo que posiblemente afectó la respuesta de las hormonas y de la expresión de los genes estudiados debido al sesgo de tiempo en donde se presentan oscilaciones distintas.

## 8. CONCLUSIONES

El frío es un estrés físico que dependiendo del tiempo de exposición puede poner en riesgo la supervivencia del animal, nuestros datos demuestran que a pesar de que se han reportado cambios en la expresión de algunos genes termogénicos ante el frío dependiendo de la hora del día, las ratas son capaces de mantener su temperatura corporal independientemente del periodo de luz u oscuridad. Además, nuestros datos sugieren que las oscilaciones diarias de la concentración sérica de corticosterona influyen en la liberación de TSH, posiblemente al inhibir la síntesis de TRH en la fase de oscuridad, pero no en la fase de luz; y probablemente también esté afectando el aumento en la expresión del ARNm de *Dio2*. En conclusión, nuestros datos apuntan a que distintos parámetros fisiológicos son modulables dependiendo de la hora del día en que se realizan los experimentos y mediciones, debido a que la regulación del núcleo supraquiasmático del hipotálamo y sus mecanismos de cronometraje endógeno presentan ritmicidades diarias de transcripción-traducción, y liberación hormonal en determinados tiempos del día para cubrir necesidades básicas diarias.

## 9. PERSPECTIVAS

A partir de este estudio, se observó que la tirotropina tuvo un aumento significativo ante la exposición al frío en el periodo de luz, pero no durante el periodo de oscuridad. Por lo cual las perspectivas de trabajos futuros podrían orientarse en evaluar si este efecto en el periodo de oscuridad podría relacionarse a una inhibición de la síntesis y/o liberación de TSH por la corticosterona que esté relacionado con el momento de la exposición al frío, debido a que los niveles séricos de corticosterona se mantienen más elevados durante la fase de oscuridad. Además de examinar la actividad enzimática de Dio2 y la concentración de la proteína Ucp1, ya que los niveles del ARNm de los genes no reflejan si hay cambios en la proteína. También sería interesante analizar y comparar los efectos del frío en el ciclo de luz vs oscuridad sobre la expresión de *Trh* y de *Tshb* en el núcleo paraventricular y adenohipófisis, respectivamente, ya que posiblemente las respuestas sean más rápidas que en BAT por el tiempo corto de exposición al frío. Además, también sería importante definir si el nivel del receptor de TRHR1 fluctúa durante el ciclo de luz-oscuridad en la adenohipófisis y ver si esto explica las respuestas al frío.

## REFERENCIAS

- Angel Vargas, M., Uribe, R. M., Cisneros, M., Romero, F., González, S., Joseph-Bravo, P., & Charli, J.-L. (2002). Thyrotropin-releasing hormone regulates the diurnal variation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity in the male rat adenohypophysis. *European Journal of Endocrinology*, *147*(3), 363-369.  
<https://doi.org/10.1530/eje.0.1470363>
- Arancibia, S., Rage, F., Astier, H., & Tapia-Arancibia, L. (1996). Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology*, *64*(4), 257-267. <https://doi.org/10.1159/000127126>
- Bianco, A. C., Dumitrescu, A., Gereben, B., Ribeiro, M. O., Fonseca, T. L., Fernandes, G. W., & Bocco, B. M. L. C. (2019). Paradigms of Dynamic Control of Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Reviews*, *40*(4), 1000-1047.  
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00275>
- Bukowiecki, L. J., Géloën, A., & Collet, A. J. (1986). Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *The American Journal of Physiology*, *250*(6 Pt 1), C880-887.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1986.250.6.C880>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiological Reviews*, *84*(1), 277-359.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Covarrubias, L., Redondo, J. L., Vargas, M. A., Uribe, R. M., Méndez, M., Joseph-Bravo, P., & Charli, J. L. (1994). In vitro TRH release from hypothalamus slices varies

during the diurnal cycle. *Neurochemical Research*, 19(7), 845-850.

<https://doi.org/10.1007/BF00967454>

Gutierrez-Lopez, L., Garcia-Sanchez, J. R., Rincon-Viquez, M. de J., Lara-Padilla, E., Sierra-Vargas, M. P., & Olivares-Corichi, I. M. (2012). Hypocaloric diet and regular moderate aerobic exercise is an effective strategy to reduce anthropometric parameters and oxidative stress in obese patients. *Obesity Facts*, 5(1), 12-22.

<https://doi.org/10.1159/000336526>

Gutiérrez-Mariscal, M., Sánchez, E., García-Vázquez, A., Rebolledo-Solleiro, D., Charli, J.-L., & 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. *Regulatory Peptides*, 179(1-3), 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.08.010>

Ikegami, K., Refetoff, S., Van Cauter, E., & Yoshimura, T. (2019). Interconnection between circadian clocks and thyroid function. *Nature Reviews. Endocrinology*, 15(10), 590-600. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0237-z>

Jaimes-Hoy, L., Pérez-Maldonado, A., Narváez Bahena, E., de la Cruz Guarneros, N., Rodríguez-Rodríguez, A., Charli, J.-L., Soberón, X., & Joseph-Bravo, P. (2021). Sex Dimorphic Changes in Trh Gene Methylation and Thyroid-Axis Response to Energy Demands in Maternally Separated Rats. *Endocrinology*, 162(8), bqab110. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab110>

Jakus, P. b, Sipos, K., Kispal, G., & Sandor, A. (2002). Opposite regulation of uncoupling protein 1 and uncoupling protein 3 in vivo in brown adipose tissue of cold-exposed rats. *FEBS Letters*, 519(1-3), 210-214. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02707-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02707-2)



- Kalsbeek, A., Buijs, R. M., van Schaik, R., Kaptein, E., Visser, T. J., Doulabi, B. Z., & Fliers, E. (2005). Daily variations in type II iodothyronine deiodinase activity in the rat brain as controlled by the biological clock. *Endocrinology*, *146*(3), 1418-1427. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0763>
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Franke, A. N., Wortel, J., & Buijs, R. M. (2000a). Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology*, *141*(10), 3832-3841. <https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7709>
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Franke, A. N., Wortel, J., & Buijs, R. M. (2000b). Functional Connections between the Suprachiasmatic Nucleus and the Thyroid Gland as Revealed by Lesioning and Viral Tracing Techniques in the Rat. *Endocrinology*, *141*(10), 3832-3841. <https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7709>
- Le Magnen, J., & Devos, M. (1982). Daily body energy balance in rats. *Physiology & Behavior*, *29*(5), 807-811. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(82\)90329-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90329-8)
- Machado, F. S. M., Zhang, Z., Su, Y., de Goede, P., Jansen, R., Foppen, E., Coimbra, C. C., & Kalsbeek, A. (2018). Time-of-Day Effects on Metabolic and Clock-Related Adjustments to Cold. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 199. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00199>
- Orozco-Solis, R., Aguilar-Arnal, L., Murakami, M., Peruquetti, R., Ramadori, G., Coppari, R., & Sassone-Corsi, P. (2016). The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, *23*(3), 467-478. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.02.003>
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive

Thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829-839. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81410-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81410-5)

Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Domínguez-Salazar, E., Martínez-García, R., & Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 28(2), 207-227. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(02\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(02)00017-3)

Scarpace, P. J., Matheny, M., & Tümer, N. (1999). Differential down-regulation of  $\beta$ 3-adrenergic receptor mRNA and signal transduction by cold exposure in brown adipose tissue of young and senescent rats. *Pflügers Archiv*, 437(3), 479-483. <https://doi.org/10.1007/s004240050804>

Sentis, S. C., Oelkrug, R., & Mittag, J. (2021). Thyroid hormones in the regulation of brown adipose tissue thermogenesis. *Endocrine Connections*, 10(2), R106-R115. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0562>

Sotelo-Rivera, I., Jaimes-Hoy, L., Cote-Vélez, A., Espinoza-Ayala, C., Charli, J.-L., & Joseph-Bravo, P. (2014). An acute injection of corticosterone increases thyrotrophin-releasing hormone expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus but interferes with the rapid hypothalamus pituitary thyroid axis response to cold in male rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(12), 861-869. <https://doi.org/10.1111/jne.12224>

Sumitomo Chemical Co., Ltd., & Kawamura, S. (2020). Diurnal Gain And Nocturnal Reduction Of Body Weight In Young Adult Rabbits: The Reverse Of The Circadian Rhythm Observed In Rats And Mice. *Toxicology: Current Research*, 4(1), 1-5. <https://doi.org/10.24966/TCR-3735/100016>

- Takeuchi, A., Kajihara, A., & Suzuki, M. (1977). Effect of acute exposure to cold on the levels of corticosterone and pituitary hormones in plasma collected from free conscious cannulated rats. *Endocrinologia Japonica*, *24*(1), 109-114. <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.24.109>
- Uribe, R. M., Cisneros, M., Vargas, M. A., Lezama, L., Cote-Vélez, A., Joseph-Bravo, P., & Charli, J.-L. (2011). The systemic inhibition of nitric oxide production rapidly regulates TRH mRNA concentration in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and serum TSH concentration. Studies in control and cold-stressed rats. *Brain Research*, *1367*, 188-197. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.011>
- Uribe, R. M., Redondo, J. L., Charli, J. L., & Joseph-Bravo, P. (1993). Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*, *58*(1), 140-145. <https://doi.org/10.1159/000126523>
- Watanabe, M., Yamamoto, T., Kakuhata, R., Okada, N., Kajimoto, K., Yamazaki, N., Kataoka, M., Baba, Y., Tamaki, T., & Shinohara, Y. (2008). Synchronized changes in transcript levels of genes activating cold exposure-induced thermogenesis in brown adipose tissue of experimental animals. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1777*(1), 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.10.014>
- Zhang, Z., Boelen, A., Kalsbeek, A., & Fliers, E. (2018). TRH Neurons and Thyroid Hormone Coordinate the Hypothalamic Response to Cold. *European Thyroid Journal*, *7*(6), 279-288. <https://doi.org/10.1159/000493976>
- Zoeller, R. T., Kaber, N., & Albers, H. E. (1990). Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology*, *127*(6), 2955-2962. <https://doi.org/10.1210/endo-127-6-2955>

## 10. ANEXOS

### *Anexo 1 Radioinmunoensayo*

Muestras de suero: En tubos eppendorf de borosilicato de 2 mL realizar una dilución 1:500 (tomar 3 µL de suero y adicionarlos a 1.5 mL de buffer diluyente de esteroides). Usar como buffer diluyente de esteroides un buffer constituido de fosfatos 10 mM de fosfatos pH 7.5, 150 mM de cloruro de sodio y 0.1 % de gelatina (Buffer RIA).

Todos los tubos de suero diluido se calientan a 90 °C durante 10 min (para liberar la corticosterona de la transcortina). Permitir que los tubos se enfríen hasta que estén a temperatura ambiente. Centrifugar a 10000 rpm por 5 min. Poner, por duplicado, 500 µL de cada suero en tubos de ensayo 12 X 75 mm.

Curva estándar: Para la curva estándar, se preparan diluciones seriadas de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 pg de corticosterona estándar en 500 µL de buffer RIA (50 mM buffer fosfatos de sodio pH7.5, 150 mM NaCl, 0.1% gelatina grado RIA (Biorad)) con 0.2 % de suero libre de esteroides (SLE). De cada dilución poner 500 µL, por triplicado, en tubos de ensayo 12 X 75 mm.

Tubos control: Marcar 3 tubos de ensayo, 12 X 75 mm, como cuentas por minuto (cpm) Totales (T) y añadirles 800 µL de buffer RIA con SLE. Marcar 3 tubos de ensayo como cpm de unión inespecífica (NSB) y adicionarles 600 µL de buffer RIA con SLE. Marcar 3 tubos de ensayo como cuentas de unión en ausencia de corticosterona (BO) y añadirles 500 µL de buffer RIA con SLE.

Anticuerpo: El anticuerpo está en alícuotas de 5 µL. A una alícuota adicionarle 500 µL de buffer RIA para tener una dilución 1:100. De acuerdo con el número de tubos de ensayo que se tengan (estándares y muestras). Tomar un volumen dado para diluirlo con buffer RIA de modo que se tenga una dilución de trabajo del anticuerpo de 1:10000 y se añaden 100 µL a cada tubo de ensayo (NO SE AÑADE ANTICUERPO A LOS TOTALES NI A LOS NSB).

Corticosterona tritiada (<sup>3</sup>H-Cort): A todos los tubos de ensayo adicionar 100 µL de <sup>3</sup>H-Cort (PERKIN ELMER 85 Ci/nmol). Que equivalgan a, aproximadamente 10000 cpm. La <sup>3</sup>H-Cort se diluye 1:1 con buffer RIA. Si 3 µL de esta dilución se ponen en

10 mL de buffer RIA, entonces en 100  $\mu$ L de esta dilución se tendrán aproximadamente 10000 cpm.

Agitar la mezcla de suero o estándar, anticuerpo y  $^3\text{H}$ -Cort. E incubar a  $4^\circ\text{C}$  por aprox. 24 horas.

Carbón–Dextran: Hacer una suspensión de 16 mg de carbón-dextran (SIGMA) por cada mililitro de buffer RIA. Dejarla agitando toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Añadir 200  $\mu$ L de la suspensión a cada tubo de ensayo. Agitar e incubar durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . Centrifugar a 4000 rpm durante 15 min. El sobrenadante de cada tubo se transfiere a un vial para conteo de radiaciones beta y se adicionan 4 mL de líquido de centelleo (Ecolite, MPBiomedicals). Conservar los tubos a temperatura ambiente por 2 horas. Contar cada tubo por 3 min en el contador de centelleo (LS6000SC BECKMAN). Se obtienen los valores de cpm para cada muestra.

Para determinar la concentración de corticosterona en cada muestra de suero, se emplea un programa de regresión lineal de log de  $B/B_0$  vs el logaritmo de la concentración de los estándares es alimentado con los datos de cpm de los estándares, los totales, los NSB y los  $B_0$ , de modo que se obtiene una gráfica de dosis-respuesta lineal con la cual se calcula la concentración al meter los datos de cpm de las muestras.

$$\text{Log } (B_n/B_0) = \text{In } [(B_n/B_0)/(1 - B_n/B_0)] \quad n = \text{estándar 1 o 2 o 3 etc.}$$

Donde  $B/B_0$  representa el porcentaje de desplazamiento de la marca radiactiva que cada concentración estándar de corticosterona produce.

$$B_n/B_0 = \text{cpm } B_n / \text{cpm } B_0$$

$$\% B_n/B_0 = (\text{cpm } B_n / \text{cpm } B_0) \times 100$$

Anexo 2 Reporte de ANOVA

Variable	Luz/Oscuridad	Temperatura	Interacción
WAT Retro	F (1, 16) = 0.11 P= 0.740	F (1, 16) = 1.0 P= 0.325	F (1, 16) = 0.26 P= 0.615
WAT Inter	F (1, 16) = 0.012 P= 0.913	F (1, 16) = 6.6 P= 0.020	F (1, 16) = 1.4 P= 0.247
WAT Epi	F (1, 16) = 1.0 P= 0.326	F (1, 16) = 2.7 P= 0.117	F (1, 16) = 2.2 P= 0.156
WAT Total	F (1, 16) = 0.036 P= 0.853	F (1, 16) = 2.2 P= 0.158	F (1, 16) = 1.0 P= 0.333
BAT	F (1, 15) = 1.1 P= 0.317	F (1, 15) = 0.43 P= 0.523	F (1, 15) = 0.57 P= 0.463
Temperatura Corp.	F (1, 19) = 4.4 P= 0.049	F (1, 19) = 3.0 P= 0.099	F (1, 19) = 0.28 P= 0.606
Corticosterona	F (1, 16) = 3.1 P= 0.098	F (1, 16) = 11 ***P= 0.004	F (1, 16) = 9.3 P= 0.008
TSH	F (1, 16) = 17 P< 0.001	F (1, 16) = 23 P<.001	F (1, 16) = 14 P= 0.002
T4	F (1, 15) = 0.50 P= 0.492	F (1, 15) = 4.3 P= 0.056	F (1, 15) = 1.2 P= 0.281
T3	F (1, 16) = 0.50 P= 0.490	F (1, 16) = 0.39 P= 0.539	F (1, 16) = 4.7 P= 0.046
Dio2	F (1, 15) = 2.3 P= 0.153	F (1, 15) = 6.2 P= 0.025	F (1, 15) = 2.7 P= 0.123
Adrb3	F (1, 16) = 5.8 P= 0.028	F (1, 16) = 0.056 P= 0.816	F (1, 16) = 4.3 P= 0.053
Pgc1a	F (1, 16) = 0.80 P= 0.370	F (1, 16) = 4.0 P= 0.062	F (1, 16) = 0.58 P= 0.458
Ucp1	F (1, 14) = 5.9 P= 0.029	F (1, 14) = 10 P= 0.007	F (1, 14) = 0.074 P= 0.789
Variable	Grupos	Semanas	Interacción
Peso	F (3, 20) = 2.9 P= 0.060	F (1.1, 22) = 1029 P< 0.001	F (27, 180) = 2.2 P= 0.001

Anexo 3 Inmunoensayo (MILIPLEX, Merck Millipore)

Protocolo del kit: Panel de perlas magnéticas de hormona tiroidea de rata

PROCEDIMIENTO DE INMUNOENSAYO

Todos los reactivos se llevaron a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de usarlos en el ensayo. Se realizó un diagrama de la ubicación de los estándares [0 (fondo), los tubos estándar n.º 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7], los controles 1 y 2 y las muestras en la hoja de trabajo del mapa de pozos en una configuración vertical. Se utilizó una placa de filtro en el soporte de placa durante los pasos de incubación y dispensación de reactivos de modo que la parte inferior de la placa no tocó ninguna superficie.

1. Se añadieron 200 µL de tampón de ensayo en cada pozo de la placa. Se selló y mezcló en un agitador de placas durante 10 min a temperatura ambiente (20-25°C).
2. El tampón de ensayo se decantó y eliminó la cantidad residual de todos los pocillos invirtiendo la placa y golpeándola suavemente sobre toallas absorbentes varias veces.
3. Se añadieron 25 µL de cada estándar y control en los pozos apropiados. El tampón de ensayo se utilizó para el estándar de 0 pg/mL (blanco).
4. Se añadieron 25 µL de tampón de ensayo a los pozos de las muestras.
5. Se añadieron 25 µL de solución de matriz a los pozos del blanco, estándares y controles.
6. Se añadieron 25 µL de muestra (suero 1:6 en tampón de ensayo) en los pozos apropiados.
7. Se añadieron 25 µL de conjugado HRP (enzima de peroxidasa de rábano picante) en todos los pozos.
8. Se homogeneizó la botella de la mezcla de perlas y se añadieron 25 µL a cada pozo.
9. Se selló la placa con un sellador de placas y se envolvió con papel de aluminio e incubó con agitación en un agitador de placas durante la noche durante 16 a 18 horas a 4 °C.
10. El contenido de los pozos se extrajo con cuidado y se lavó la placa 3 veces siguiendo las instrucciones en la sección de lavado de placas.
11. Se añadieron 50 µL de anticuerpos de detección en cada pozo.
12. Se selló y cubrió con papel de aluminio. Se incubó en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C).

13. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de estreptavidina-ficoeritrina a cada pozo que contenía 50  $\mu\text{L}$  de detección anticuerpos.
14. Se selló y cubrió con papel de aluminio. Se incubó en un agitador de placas durante 30 min a temperatura ambiente (20-25°C).
15. El contenido de los pozos se extrajo con cuidado y se lavó la placa 3 veces siguiendo las instrucciones en la sección de lavado de placas.
16. Se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de fluido impulsor a todos los pozos. Se mantuvo en un agitador de placas durante 5 min.
17. La placa se leyó en MAGPIX® con el software xPONENTE®.

#### *Anexo 4 Extracción de ARN por el método de tiocianato de guanidina*

Día 1:

1. Del tejido congelado cortar pedazos equivalentes ■
2. Sonicar el tejido en 400  $\mu\text{L}$  de solución D\* (concentración de reactivos) preparada al momento. (Depende del tamaño del tejido). Enjuagar el vástago del homogeneizador entre muestra y muestra o grupo experimental con agua libre de RNAsas ( $\text{H}_2\text{O}$  tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) 1 ml de agua/L de agua grado milliQ esteril, se mantienen en agitación toda la noche, posteriormente se le aplica dos ciclos de esterilización para eliminar el DEPC, se preparan alicuotas en condiciones de esterilidad) recién autoclaveada, secar exceso de agua con gasa ESTÉRIL (Nota: limpiar la punta del sonicador entre cada muestra con gasa estéril).
3. Centrifugar el homogenado a 2870 rpm por 10 min a 4 °C. Obtener el sobrenadante y colocarlo en otro tubo con tapa de seguridad (Recuperar 380  $\mu\text{L}$  evitando la capa de grasa).

\*Solución D: se prepara en una campana de extracción el día del experimento a partir de un stock agregando  $\beta$ -mercaptoetanol en la siguiente proporción: 5 mL solución D (Stock) + 35  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoetanol.



4. Agregar 38  $\mu\text{L}$  (1/10 del vol homogenado) de Acetato de  $\text{Na}^+$  2M, pH 4. Tapar el tubo y mezclar unos segundos.
5. Agregar 380  $\mu\text{L}$  (un volumen) de fenol saturado en agua libre de RNAsas, frío. Homogenizar 1 min y poner en hielo.
6. Agregar 380  $\mu\text{L}$  (1 vol.) cloroformo alcohol isoamílico 49:1. Homogenizar 1 min (las muestras deben ponerse blancas-lechosas).
7. Dejar reposando en hielo 15 min. No volver a homogenizar.
8. Centrifugar a 10,000 rpm, 22 min a 4°C. Recuperar la fase acuosa (cuantificándola, aprox 380  $\mu\text{L}$ ) y repetir del punto 6 al 8.
9. Recuperar la fase acuosa (cuantificándola 380  $\mu\text{L}$ ). Agregar un volumen (respecto al volumen recuperado de 380  $\mu\text{L}$ ) de isopropanol. Mezclar unos segundos. Dejar a -20 °C 2 horas. Verificar que no se ponga lechoso en este paso.
10. Centrifugar a 13500 rpm a 4 °C por 30 min. Recuperar el sobrenadante con pipeta ladeando el tubo sin tocar la pastilla; colocar el sobrenadante en otro tubo etiquetado como sobrenadante a -20 °C por si hubiera pérdida de la pastilla de RNA.
11. Disolver la pastilla en 127  $\mu\text{L}$  (1/3 del vol homogenado inicial) de solución D\*. Es muy importante que se disuelva el pellet. Si no se disuelve agregar más solución D\* en un vol no mayor de 1/2 a la inicial. Homogenizar unos segundos hasta que el pellet se desprenda del fondo del tubo.
12. Agregar el mismo volumen (127  $\mu\text{L}$ ) del punto anterior de isopropanol frío al 100%. Homogenizar unos segundos.
13. Mantener a -20 °C toda la noche.

Día 2:

14. Centrifugar a 13500 rpm por 30 min a 4 °C. Sacar sobrenadante cuidadosamente con pipeta de puntas amarillas sin tocar la pastilla y guardar en sobrenadantes. Limpiar la tapa con gasa estéril (si se han acumulado sales).
15. Lavados de etanol: Agregar 300  $\mu\text{L}$  de etanol frío al 70 %, mezclar suavemente y centrifugar 13500 rpm por 15 min a 4 °C. Sacar sobrenadante con pipeta de puntas amarillas (se puede guardar todos los etanoles en un solo tubo). Regresar al hielo y seguir con las demás muestras. Limpiar con gasa estéril en cada lavado. Al terminar

de sacar el sobrenadante de la última muestra, regresar a la primera y extraer el alcohol que se haya depositado al fondo con la pipeta sin tocar la pastilla. Hacer 2 lavados en total. Deja los tubos secando destapados en grupos por aprox. 5 min.

16. Guardar la pastilla en hielo seco a  $-70^{\circ}\text{C}$ . (Si no se lee en nanodrop ese día).

17. Resuspender en  $30\ \mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNAsas. Homogenizar hasta que la pastilla se resuspenda completamente y leer en el nanodrop. **Nota:** el volumen de resuspensión puede variar dependiendo de la pastilla obtenida en cada extracción.

**Nota:** Si al leer las muestras en nanodrop no tienen la relación 230/260 y 280/260 óptima se puede hacer lo siguiente:

1. Resuspender en  $32\ \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNAsas usando alícuotas recién autoclaveadas. Homogenizar.

2. Precipitar todas las muestras en 1/10 de vol de resuspensión de acetato de sodio 3M pH 5 ( $32\ \mu\text{L}$ ) + 2 vols de etanol absoluto ( $64\ \mu\text{L}$ ), homogenizar y dejar a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche.

3. Sacar sobrenadante cuidadosamente con pipeta sin tocar la pastilla. Limpiar la tapa con gasa estéril. Y regresar al paso 15 y 17 para leer las muestras nuevamente en el nanodrop.

#### *Anexo 5 Protocolo para RT-PCR*

Los materiales, soluciones y superficies deben ser libres de RNAsas cuando purifican y usan RNA; usar guantes y no tocar cabello, piel o superficies potencialmente contaminadas. Esto no es crítico una vez formado el cDNA, pero se tiene que mantener la esterilidad de las soluciones acuosas (no aplica para los solventes que deberían manipularse en una campana de extracción). Después de la extracción de ARN total del tejido, debe medirse la concentración y pureza del ARN en el nanodrop y verificar la integridad de este por medio de electroforesis en gel de agarosa. Se preparan alícuotas de  $12\ \mu\text{L}$  que contengan en total  $1\ \mu\text{g}$  de ARN conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## RT

### 1. Mezcla para ADNc por reacción (mezcla RT)

Calentar el ARN 5 min a 65 °C y luego colocar en hielo.

H <sub>2</sub> O libre de RNAsas (DEPC)	8.9 µL
Buffer RT (BRL) 5X	6.0 µL
DTT (ditiotreitól) 0.1 M, 10X	3.0 µL
dNTPs 10 mM	0.6 µL (200 µM)
Oligos dT 0.5 µg / µL	1.0 µL
RT (BRL) 200 µg / µL	0.5 µL

---

\*20 µL

\* Se multiplica por el número de tubos que se tengan

2. Resuspender 1.5 µg de ARN en 12 µL de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas (DEPC), mezclar cada tubo y colocar en hielo.
3. Calentar el ARN a 65 °C durante 5 min y colocar en hielo.
4. Centrifugar para bajar lo condensado de la tapa.
5. Agregar la mezcla de RT al ARN y homogenizar. Centrifugar e incubar a 37 °C durante 2 horas.

## PCR

### 6. Mezcla para PCR por reacción

ADNc	4.0 µL
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril (DPC)	33.5 µL
Buffer Taq ADN polimerasa 10X	5.0 µL
dNTPs 10 mM	1.0 µL
Oligo nucleótidos S (25 pmol)	1.0 µL
Oligo nucleótidos AS (25 pmol)	1.0 µL

Taq ADN pol 50 µL (al final)	0.5 µL
MgCl <sub>2</sub> 30 mM Biotech	2.5 µL
-----	
50 µL	

- Al término de la incubación de la reacción de RT tomar 4 µL de esta reacción y agregarlos a la mezcla de PCR.
- Colocar los tubos en el termociclador.

### Secuencias de oligonucleótidos

Gen	Amplificado (Pb)	5'-3' Sentido	5'-3' Antisentido	Ciclos	Tm (°C)
Cyc	250	GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA	GGC TGG ATG GCA AGC ATG T	20	64
Cyc	503	CGAGCTGTTTCAGACAAAGTTCC	GATGGGGTGGGGGTGCTCTC	20	64
Dio2	200	GAT GCT CCC AAT TCC AGT GT	AGG CTG GCAGTT GCC TAG TA	27	64
Ucp1	396	GGATCAAACCCCGCTACTG	CAGGATCCGAGTCGCAGAAAA	17	64
Pgc1a	223	CAG CTC CAA GAC CAG GAA AT	CCC AAG GGT AGC TCA GTT TAT C	26	64
Adrb3	105	CTT CCC AGC TAG CCC TGT TG	TAG ATC TCC ATG GTC CTT CAT GTG	25	64

### Anexo 6 Tabla de datos

PERIODO	BAT g/Kg	WATe g/Kg	WATr g/Kg	WATi g/Kg	WATt g/Kg	Cort ng/mL	TSH (ng/mL)	T4 (ug/dL)	T3 (ng/mL)	Temp °C
L-TA	1.45653	23.42079	20.25515	3.20528	46.88121	91.4118	0.590	7.163	1.877	37
L-Frío	1.37380	17.47951	15.86846	1.70427	35.05224	370.199	2.281	7.416	0.980	36
O-TA	1.35546	18.69418	19.75263	2.77180	41.21862	300.741	0.495	7.332	0.955	38
O-Frío	1.53474	18.37923	18.30807	2.22655	38.91385	313.587	0.709	7.721	1.449	37

Tabla de datos presentada en unidades especificadas de cada muestra/dato después de su obtención.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Presente.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **BUENO HERNÁNDEZ CINTHIA** con número de matrícula **10018669** cuyo título es:

**“Estudio de la expresión de genes termogénicos en respuesta al frío agudo en el periodo de luz/oscuridad en ratas”**

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

Cuernavaca, Mor a 22 de junio del 2023

Atentamente  
Por una universidad culta

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

<b>DRA. VERÓNICA MERCEDES NARVÁEZ PADILLA</b>	<b>(PRESIDENTE)</b>
<b>DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN</b>	<b>(SECRETARIO)</b>
<b>DRA. ELIZABETH LORRAINE JAIMES HOY</b>	<b>(VOCAL)</b>
<b>DRA. DELIA VANESSA LÓPEZ GUERRERO</b>	<b>(SUPLENTE)</b>
<b>DRA. ROSA MARÍA URIBE VILLEGAS</b>	<b>(SUPLENTE).</b>



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

**DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha:2023-06-22 09:41:34 | Firmante**

LeoopSF5JihjEIMhBGKx+JuFsTQ8RsQw3i+a6mRLNiXaD/0ZS/0ptqZnTpAaQPTlu3KdZJklsEixdlSdtYnQ1YWEWeGnoc6iQDWaGr3tyypuyj5bVpuX6ZerpfC1Ap1IXcfqYbhOABG  
C4yesk13se0Ji77hjgYoe8gWTrWAjdSxgPwNLQ+Ssw2bCcFtKXan1Di6Bp7VKhkRi8Z+vxUCGsnUksWCNQVrpfBSBRkj9ZCWhH1d7Kk1Y6k95WLoWLHB3Pjws+ujfuEnHbxxUd  
EB6nnKN7sDZMB5+yYfXwnb3dZEhR2HwtX3H+6WADpDIEDQGIE+ky+xHOQG8wr//gmtw==

**ELIZABETH LORRAINE JAIMES HOY | Fecha:2023-06-22 10:03:26 | Firmante**

F8fV/9Tz9o5EPKuw6k82y99L408MnzddBQ4V7oj80vylTBWdXlb02zFVJXUkdwtOHnNXTTJPCvzh5myC7pW2+/D/AN28DyAMylinpiZso8TN1Dehn6ZacW1B/hd8TqrsG00Ro41h  
KS5RwEabm+FIYZZ30Cwd7Ekx4pwwLgiYLjSjUtOennEqAux2jc4gvGUCzmAi+ORJGS2ieciqweqNsWMDKreTzcGTRK+Im0CuNp6TUfQ5FwdQz6CBaGGY26irP/11eRCXtQxl  
H0tc7S8bKXtAGeeWjT4A976zqlK9BWPmOQJYgf3OwV+dmBAgrh84THJfOXgWfeBIMivAYQ==

**VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2023-06-22 11:01:04 | Firmante**

CKPXGZOxGUWVZvW41VmO7dQ1STs6K3nfH/jC65qlp4mF9nkwmY4X/o9ztfjhWB6w9c0dP5f57DM6QmTNitVagLs1rmDrh/ElrQ6JdCKYU+KWYitfx1w16szaj4AEbA6NATHfHncl  
dDrHIPPATC8lxExiyNS/BTExG+qkjiplqMdTOly7HW8ezXHW8mP2G4xc7oC0TrdfYnk/+HluacObyicO9dE2NWWZqktbN4WXXyw+LBHQuCTTzDhmOmtuwd8NHAOa/2BT0kHFUu  
b8qU3SdgRCox1GoiTFW9miw6vuN4DJJWWrMRMz3Z0GOPmLGF0jwP2iX83halr6bS2R8la1yA==

**ROBERTA SALINAS MARIN | Fecha:2023-06-22 11:49:11 | Firmante**

Ix26waoaYX2FAJqROHvzvWp4SHTqBRUAP9g18whYw+P3yMlt0eoi+It0UDQIX5SuSoUTEEEQLMyZybc4sGg+wPzSufQnlvg/TWI8joY8EE6R25h1eAzLJ8wH3fy62U2g1yo3ku  
ulobo4/5bCywJvNUQu2WY56mimb12W6SWftOvVzictX8BT6ZGIDJ4L75R67QlgWxckTUTdyJdbboTgM6Z+/aFcy8uAt855RkR4aVUUFw3GMCZ1kLb5BN0BEgads2qrJBsaALZvY  
DWX3D5scCFSDT0PvmNsdvG3ePeM7rDhumiHjJgBjhUC53shZSDfXKmlcyzvSu9ha/kGqnmQ==

**ROSA MARÍA URIBE VILLEGAS | Fecha:2023-06-29 12:16:50 | Firmante**

wRx4u9J5c/G63+H7aPIGNOcfPawKDepS8BICD+qii5wg4KK43QKCVBWMki8VUpBicZMbl1mlAz4L1zZVG3RjFw1qOwc4Bikba7XrxN9NrzKtyQH0f6Ch6Nms5qNVh4SAyloxwga  
wzLTYk7hP6THEBRFnoQNRQT/b/IXOZXL508Pup90Cty2iCtiMZ3Q0nqzpAjboQDPp7S6hJNOSlwhbEqiyNZbfzA7TWKQjTzQy1T5V/NyBL9AqGPY9f8nNiVwmSq5NI+fJ0MUzuod  
7YsCz/TidBUVKqzVLcXyI2NckW5ynf3g5b1hX+jWUKVv+5eSsORRHITQkzyZpqbefMKw==

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



HyKbnF5dt

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ViaWAXOXA476GGBRUZ3JDQvK6ICexllq>

