



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Distribución de la proteína desacopladora tipo
1 (UCP-1) en tejido adiposo pardo de crías
centrales y periféricas del conejo doméstico

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Jessica Ivonne Muñoz Carreto

Codirectores:

Dr. Amando Bautista Ortega

Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Distribución de la proteína desacopladora tipo
1 (UCP-1) en tejido adiposo pardo de crías
centrales y periféricas del conejo doméstico

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Jessica Ivonne Muñoz Carreto

Comité Tutorial

Dr. Amando Bautista Ortega

Dr. Francisco Castelán

Dra. Robyn Hudson

Dra. Margarita Martínez Gómez

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2018

Financiamiento

El presente trabajo se realizó bajo la codirección de los doctores Amando Bautista Ortega y Francisco Castelán en las instalaciones del laboratorio de Psicobiología del Desarrollo del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

La Maestría en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional Padrón Nacional de Posgrado (PNP) en la categoría consolidado.

Contribuyeron al desarrollo del trabajo de tesis de maestría fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Nos. 706474 (beca de maestría) y 225126 (Infraestructura2014) y de la Universidad Nacional Autónoma de México DGAPA-IN212416.

Se contó con la asistencia técnica de Carolina Rojas Castañeda y Laura García Rivera.

Agradezco al laboratorio de Psicobiología del Desarrollo del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en la Universidad Autónoma de Tlaxcala por su cálido cobijo durante mi estancia en sus instalaciones.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial.

A la Doctora Margarita Martínez Gómez por sus muy oportunos comentarios y por la confianza brindada desde el momento que la conocí hasta la fecha.

A la Doctora Robyn Hudson por la confianza brindada y por cada comentario que me realizó durante la duración de mi estancia en el laboratorio.

Al Doctor Francisco Castelán por la atención brindada en cada una de mis dudas y por compartir sus conocimientos conmigo.

Y al Doctor Amando Bautista Ortega por cada uno de los comentarios, correcciones y llamadas de atención, además, por todo el apoyo y confianza brindada durante estos años de conocerlo y de aprender de usted, me es grato expresar que lo aprecio mucho y estoy muy agradecida con usted por todo el apoyo y conocimientos que de la mejor manera compartió conmigo.

Agradezco también a la Doctora Esmeralda García por el apoyo brindado en las revisiones de la presente tesis de maestría y por cada una de sus correcciones.

Así mismo agradezco a la Doctora Laura Guadalupe Hernández Aragón por su excelente apoyo en la estandarización de las técnicas, por su paciencia, apoyo y por la amistad brindada.

Agradecemos también la excelente asistencia técnica de Carolina Rojas Castañeda y Laura García Rivera.

A mi hermosa hija Jennifer Mairim

A mi amado esposo Miguel Angel

A mis maravillosos padres Jorge Arturo y Ma. Josefina

A mis grandiosas hermanas Jacqueline Andrea y Diana Laura

Resumen

Los estudios sobre las diferencias inter-individuales en conducta, así como de los mecanismos fisiológicos subyacentes, se han incrementado significativamente en la última década entre los biólogos conductuales y evolutivos.

El ambiente físico y el ambiente social son factores que explican en cierto grado el origen de las diferencias individuales. Dentro de los componentes del ambiente físico, la temperatura ambiental, es uno de los factores responsables del surgimiento de diferencias individuales tanto en conducta como en fisiología y, en cuanto al ambiente social, la conspicua presencia de los hermanos, es otro de los factores que modulan el desarrollo de diferencias inter-individuales.

La temperatura ambiental en la que se desarrollan las crías de mamíferos altriciales, como el caso del conejo doméstico, es un factor crítico para su supervivencia, desarrollo y crecimiento. Para mantener su temperatura corporal en sus primeros días de vida postnatal las crías del conejo dependen del aislamiento que les provee tanto el material del nido como la presencia de sus hermanos de la camada además del calor generado endógenamente por el tejido adiposo pardo (TAP).

Como resultado de la dinámica de termorregulación conductual que ocurre dentro del agrupamiento de la camada de las crías del conejo, bajo condiciones de frío, hay crías que durante los primeros días de vida ocupan consistentemente posiciones centrales (C) y crías que consistentemente ocupan posiciones periféricas (P) térmicamente menos favorables. Como consecuencia las crías C *versus* las P, presentan una menor activación de la proteína desacopladora tipo 1 (UCP-1), mantienen temperaturas corporales más altas, ingieren mayores cantidades de leche, convierten más eficientemente la leche a biomasa y, al destete y en la adultez, muestran diferencias conductuales ante retos estresantes.

Específicamente partimos del hecho de que las crías P, contrario a crías C, presentan una mayor cantidad de UCP-1, lo cual se traduciría en una mayor activación. Por lo tanto, proponemos la hipótesis de que la interacción intracamada para la termorregulación

conductual de las crías del conejo doméstico, tiene el potencial de moldear la distribución de la proteína UCP-1 y esta es diferencial en crías centrales y periféricas así como entre distintas secciones del TAP interescapular (TAPi). En este trabajo, mediante técnicas histológicas, caracterizamos la distribución de la proteína UCP-1 en crías centrales y periféricas así como en diferentes secciones del TAPi.

Para probar nuestra hipótesis utilizamos seis camadas de conejo doméstico. Durante sus primeros cuatro días postnatales (DP) permanecieron en un cuarto frío. En el DP4 las crías C y P de cada camada fueron sacrificadas para extraer el TAPi el cual, posteriormente, fue procesado histológicamente. Mediante técnicas inmunohistoquímicas marcamos la cantidad de UCP1 con el anticuerpo M17.

El análisis cualitativo indicó que las crías C presentaron un menor marcaje de UCP-1 y la distribución del marcaje de UCP-1 es diferencial entre las secciones analizadas. Concluimos que la interacción entre hermanos, a través de la conducta termorregulatoria del agrupamiento de la camada, moldea diferencialmente la presencia de UCP-1 en el TAPi de crías del conejo europeo.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 Interacciones entre hermanos.....	15
1.2 Termorregulación en crías altriciales.....	16
1.2.1 Mecanismos conductuales.....	16
1.2.2 Mecanismos fisiológicos.....	17
1.3 Tejido adiposo pardo (TAP).....	17
1.3.1 Características del TAP.....	18
1.3.2 Origen y desarrollo del TAP.....	18
1.3.3 Mecanismo de producción de calor en el TAP.....	20
1.3.4 Proteína UCP1.....	20
2. ANTECEDENTES.....	22
2.1 El conejo europeo como modelo de estudio.....	22
2.2 Termorregulación conductual en el conejo europeo.....	22
2.3 Termorregulación fisiológica.....	23
2.3.1 Inervación y vascularización del TAP.....	24
2.3.2 Fisiología del TAP.....	25
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVO.....	26
5. METODOLOGÍA.....	26
5.1 Animales.....	26
5.2 Procedimiento.....	27
5.2.1 Número de hermanos en contacto.....	29
5.3 Técnica histológica.....	29
5.4 Técnica Inmunohistoquímica.....	30
5.5 Análisis de las imágenes.....	31
5.6 Análisis de los datos.....	32
6. RESULTADOS.....	32

7. DISCUSIÓN.....	39
8. PERSPECTIVAS.....	41
9. REFERENCIAS.....	41

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Interacciones entre hermanos

Muchas especies de mamíferos crecen en compañía de hermanos de la misma o diferente edad. Esta condición expone a los individuos a interacciones entre ellos que pueden influir en sus historias de vida y en el desarrollo de diferencias individuales en morfología, fisiología y fenotipos conductuales (Bautista y cols. 2003, 2005; Drummond 2006; Hudson y Trillmich 2008; Reyes-Meza y cols. 2011 y Bautista y cols. 2013, 2015). Con omisión de los humanos, en otros mamíferos se ha prestado poca atención a la influencia que las interacciones entre hermanos ejercen sobre el desarrollo de las diferencias individuales (Tam y cols. 2012).

La presencia de los hermanos modula el desarrollo de las diferencias individuales incluso desde la etapa de desarrollo intrauterino de los individuos. Por ejemplo, el sexo de los fetos adyacentes afecta los rasgos conductuales, morfológicos y reproductivos (Ryan y Vandenberg 2002 y Bánszegi y cols. 2009) de sus hermanos. Además, el sitio de implantación de los fetos en los cuernos uterinos repercute en el crecimiento individual prenatal (Argente y cols. 2003 y Bautista y cols. 2015). También se ha reportado que existe una relación negativa entre el tamaño de camada y el peso corporal de las crías al nacimiento (Drummond y cols. 2000; Kraus y cols. 2005 y Rödel y cols. 2008). Mendl (1998) reportó evidencia de competencia en roedores en el laboratorio, donde las crías de camadas grandes tienden a ser más ligeras al nacimiento, crecen y se desarrollan más lentamente y su mortalidad posnatal es mayor en comparación con las crías de camadas pequeñas. Pero la presencia de los hermanos no solo significa desventajas para los individuos; en el caso de mamíferos altriciales, proveen beneficios a los individuos en términos de mantenimiento de una temperatura corporal adecuada influyendo positivamente en el crecimiento y sobrevivencia de las crías (Bautista y cols. 2003).

1.2 Termorregulación

La termorregulación, o regulación de la temperatura corporal es la capacidad que tiene un organismo para modificar su temperatura dentro de ciertos límites, incluso cuando la temperatura ambiental a la que están expuestos difiere del rango en el que el organismo se desempeña adecuadamente. La termorregulación representa una de las funciones fundamentales para la homeostasis en el organismo y es controlada en parte por el cerebro (Morrison y Nakamura 2011). En términos fisiológicos, la temperatura corporal se refiere al contenido de calor de un cuerpo o sistema (Hill y cols. 2012). Los animales son diferentes en función a las relaciones térmicas que mantienen con su entorno. Para categorizar las relaciones térmicas de los animales, se han denominado ectotermos (ecto "fuera") o poikilotermos (poikilo "variable") a aquellos organismos cuyas condiciones térmicas fuera de sus cuerpos determinan su temperatura corporal (Hill y cols. 2012). Los animales que mantienen su temperatura corporal a partir del calor resultante de la actividad metabólica de su propio cuerpo son denominados endotermos (endo "dentro"; Hill y cols. 2012). Los mamíferos y las aves son ejemplos de animales endotermos (Hill y cols. 2012). Para conservar la homeostasis térmica, los mamíferos han desarrollado eficientes mecanismos de termorregulación tanto conductuales como fisiológicos.

1.2.1 Mecanismos conductuales

Al nacimiento las crías de mamíferos altriciales, como en el caso de las crías del conejo doméstico, se agrupan dentro del nido para reducir la pérdida de calor corporal al incrementar su índice de aislamiento por contacto con sus compañeros de camada lo que resulta en efectos positivos en su sobrevivencia y desarrollo (Bautista y cols. 2008). Sin embargo, este aislamiento no es igual para todos los miembros de la camada y las crías compiten por sitios térmicamente ventajosos dentro del agrupamiento (Bautista y cols. 2015). Esta competencia por los sitios térmicamente ventajosos se relaciona con diferencias conductuales asociadas a variables fisiológicas como la temperatura corporal, ingestión de leche, crecimiento y sobrevivencia. Las crías centrales (C), aquellas que permanecen constantemente en el centro

del agrupamiento, son las que obtienen los mayores beneficios en las variables fisiológicas mencionadas anteriormente (Bautista y cols. 2008) en la vida postnatal temprana. Las crías periféricas (P), al estar expuestas a temperaturas ambientales más frías dentro del agrupamiento, activan mecanismos fisiológicos para mantener su homeostasis térmica (Dawkins y Hull 1964; Pérez-Roldán y cols. 2010 y Bautista y cols. 2013).

1.2.2 Mecanismos fisiológicos

Los mecanismos termogénicos son clasificados como obligatorios y facultativos. Los obligatorios son esenciales para la vida de todas las células del cuerpo y se refiere a la producción de calor en condiciones termoneutrales (Schönbaum y Lomax 1990). Los procesos termogénicos facultativos se refieren a la producción de calor adicional en respuesta a temperaturas bajas (Silva 2001), particularmente la que requiere que el músculo esquelético tire (TCT) y la que ocurre en el tejido adiposo pardo (Schönbaum y Lomax 1990).

Las crías altriciales activan la termogénesis y contrarrestan la pérdida de calor en etapas tempranas del desarrollo. Los organismos altriciales nacen con los ojos y meatos auditivos cerrados, sin pelo y tienen un área relativamente grande de exposición a la pérdida del calor en relación a su volumen corporal. Además, dependen del cobijo que la madre les provee y del asilamiento que les proporciona el material del nido. Bajo esta condición de altricialidad, la exposición a temperaturas por debajo de la zona termoneutral genera la disyuntiva de que la homeostasis se dirija hacia el mantenimiento de la temperatura corporal o hacia el crecimiento (Bautista y cols. 2003).

1.3 Tejido adiposo pardo (TAP)

El TAP fue identificado por primera vez por Gesner en 1551 en marmotas europeas *Muris alpines* y casi 400 años después se le denominó “la glándula de la hibernación” (Sheldon, 1924). El TAP recibe una densa inervación del sistema nervioso simpático (SNS), y esta inervación juega un papel importante en la producción de calor por el TAP (Bamshad y cols. 1999). En ratas (Bartness y cols. 1984) el tejido adiposo pardo interescapular (TAPi) ha

recibido mayor atención debido a su gran tamaño, accesibilidad, y clara inervación del SNS (Bamshad y cols. 1999).

1.3.1 Características del TAP

El TAP está compuesto primordialmente de adipocitos pardos los cuales se caracterizan por contener vesículas lipídicas multiloculares, un gran número de mitocondrias, densa inervación de nervios simpáticos y abundante expresión de UCP-1 (Xiao y cols. 2007). La proteína UCP-1 se localiza en la membrana interna de la mitocondria y desacopla las tasas de oxidación del sustrato y la producción de ATP liberando energía en forma de calor (Tam y cols. 2012).

Los adipocitos pardos son de menor tamaño que los adipocitos de grasa blanca, miden de 30 a 40 μm de diámetro, generalmente tienen forma poliédrica y poseen un núcleo ovalado de posición ligeramente excéntrica (Rosenwalt y Wolfrum 2014). En los adipocitos pardos existen muchas cisternas de retículo endoplásmico liso y cantidades apreciables de gránulos de glucógeno. Las mitocondrias de los adipocitos pardos poseen abundantes citocromo-oxidasas; la presencia de estas enzimas le confiere el color pardo amarillento dorado característico de este tipo de tejido adiposo, en los adipocitos pardos abundan capilares sanguíneos y una gran cantidad de terminaciones nerviosas (Saely y cols. 2010). El funcionamiento del TAP está regulado por el sistema nervioso autónomo. La noradrenalina (NA) es el neurotransmisor responsable de la transformación de la grasa almacenada, en energía calórica (Bartness y cols. 2010).

1.3.2 Origen y desarrollo del TAP

El TAP evolucionó para generar calor y proteger a los animales mamíferos de la hipotermia (Kajimura y Saito 2014). Los adipocitos de grasa unilocular se diferencian a partir de células mesenquimatosas. En el caso de los humanos en el quinto mes fetal, aparecen gotitas de lípidos en el citoplasma de las células y a partir de este momento se denominan adipoblastos o adipocitos inmaduros. A partir de aquí se van confluyendo para constituir una

gran gota de grasa que ocupa casi la totalidad del volumen de la célula, obligando al núcleo, citoplasma y orgánulos a ocupar una posición periférica del adipocito maduro (Tam y cols. 2012). Los adipocitos multiloculares del TAP, por otro lado, están más relacionados con el músculo esquelético que con el tejido adiposo blanco (Kajimura y Saito 2014). Los análisis genéticos indican que los adipocitos pardos de la región interescapular y del músculo esquelético surgen de células que expresan Myf5 (un gen que se suponía que estaba presente casi exclusivamente en los precursores comprometidos del músculo esquelético) (Kajimura y Saito 2014). En roedores, se ha determinado que se expresa Myf5 en células precursoras de adipocitos, además, han sido identificados factores transcripcionales como proteína 7, dominio PR, Mir193b-365, orexina, Plac8 y RIP 140 (Tam y cols. 2012; Fig. 1).

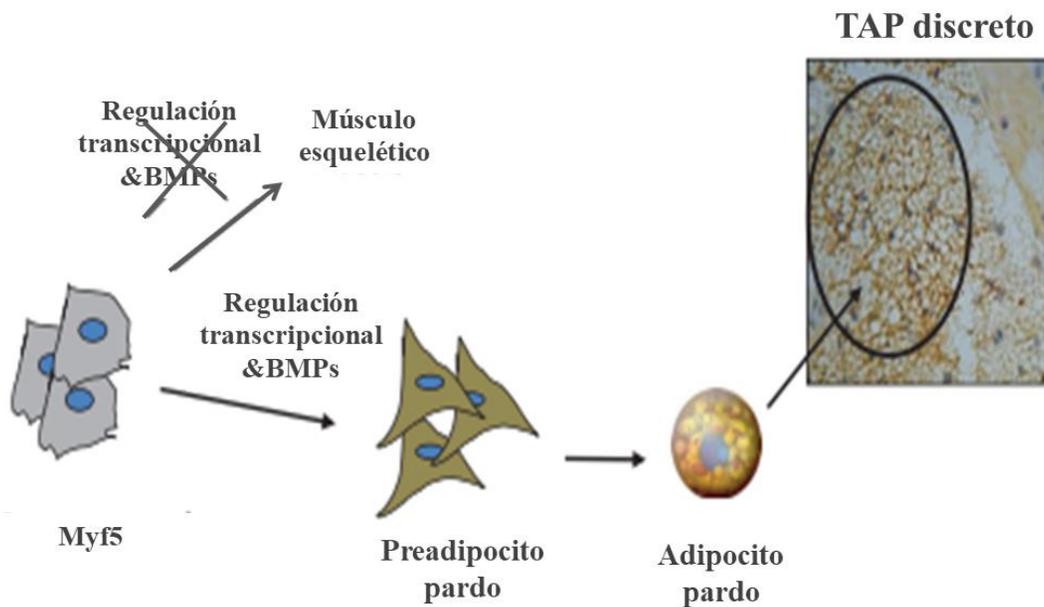


Figura 1. Regulación de la adipogénesis en roedores, en la imagen de TAP discreto (refiriéndose al TAP bien delimitado) observamos la proteína desacopladora UCP-1 inmunoreactiva donde las células de grasa corresponden al tejido adiposo pardo. Las células grises con núcleo azul representan células precursoras de adipocitos las cuales expresan el factor Myf5 (Modificado de Tam y cols. 2012).

1.3.3 Mecanismo de producción de calor en el TAP

Después de unas horas de exposición al frío, la producción de calor en la grasa parda tiene un papel dominante en el reemplazo de la TCT (termogénesis con tiriteo) por la TST (termogénesis sin tiriteo) como la principal fuente de calor adicional para evitar la hipotermia. A pesar del alto contenido de mitocondrias y altas tasas de respiración celular, los adipocitos pardos tienen una capacidad notablemente baja para la síntesis de ATP. La mayoría de las células carecen de proteínas UCPs y producen ATP a través de la ATP sintetasa, utilizando el gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial. A diferencia de la UCP1, el desacople de la mitocondria producido por UCP2 y UCP3 no es esencial para el control del balance energético, pero ambas proteínas son de gran interés por su homología con la UCP1, por expresarse en tejidos muy importantes para el gasto energético tales como el músculo esquelético, hígado y grasa parda, por participar en el metabolismo de los lípidos y en la producción de calor a través de mecanismos distintos al desacople mitocondrial, porque tendrían efectos relevantes en la etiopatogenia de la diabetes tipo 2 y de la obesidad y, finalmente, por proteger a las células de la disfunción y muerte causadas por las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Zaninovich 2005). Por el contrario, los adipocitos pardos expresan niveles sustancialmente bajos de ATP sintetasa y en su lugar utilizan la UCP-1, que disminuye el gradiente de protones desacoplando la respiración celular y la síntesis de ATP mitocondrial, para estimular la termogénesis (Kajimura y Saito 2014).

1.3.4 Proteína UCP1

La proteína UCP-1 fue identificada por Ricquier y Kader (1976). Su peso molecular varía entre 32 y 33 kDa entre especies (Freeman y cols. 1985). Ricquier y cols. (1986) describieron que una banda proteica de 32 kDa aumentaba de modo muy notable en las mitocondrias del TAP de ratas que habían sido expuestas al frío. La proteína UCP-1 desacopla la fosforilación oxidativa y participa como un translocador de protones durante la termogénesis. La concentración de UCP-1 cambia en respuesta a los requerimientos fisiológicos de los

organismos incrementándose durante la exposición al frío y disminuyendo en la exposición al calor (Trayhurn 1993).

Estudios recientes demostraron un aumento de la transcripción y actividad de esta sintasa en músculo e hígado de ratas hipotiroideas y una disminución en ratas hipertiroideas, reflejando así que la sintasa del óxido nítrico es un importante vector de los efectos termogénicos de las hormonas tiroideas (Zaninovich 2005).

La tiroides participa en la termogénesis adaptativa o facultativa, actuando en forma sinérgica con la NE en situaciones en que el organismo requiere calor adicional para mantener la normotermia durante la exposición al frío. Esta acción promueve la expresión de UCP-1 en grasa parda y UCP-3 en músculo esquelético y grasa parda de mamíferos, al igual que activa el consumo de oxígeno en otros tejidos. El proceso de adaptación al frío está bajo el control del hipotálamo, que activa al sistema nervioso simpático y la secreción de NE y promueve la expresión de UCP-1. La UCP1 se expresa únicamente en mitocondria de grasa parda y desacopla las óxido-reducciones de la fosforilación del ADP, en particular cuando la grasa parda es estimulada en el frío vía las fibras simpáticas que la inervan y, en menor grado, después de una excesiva ingestión de alimentos. El desacople no se produce sin estimulación simpática, pero tampoco ocurre en ausencia de hormona tiroidea (Zaninovich 2005).

La síntesis de UCP1 también puede ser bloqueada por tóxicos ambientales como el cadmio y el zinc. Ambos metales pesados tienen gran afección por los grupos sulfhidrilos de la enzima 5'-deiodinasa tipo 2, a la que se unen inhibiendo la deiodinación de T4 a T3. El cadmio también puede bloquear la termogénesis por otro mecanismo, inhibiendo la secreción hipotalámica de TRH seguida de depresión de la secreción de TSH y de la función tiroidea (Zaninovich 2005).

Se puede concluir que la acción de la hormona tiroidea es central para estimular el consumo de energía en las células a través de variados mecanismos. Durante la adaptación al frío, esta actividad depende de la presencia de NE, sin la cual el consumo de energía y la producción de calor colapsan casi de inmediato (Zaninovich 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 El conejo europeo como modelo de estudio

El estudio de las interacciones entre hermanos durante el desarrollo posnatal (PN) temprano en mamíferos ha sido un tópico difícil de estudiar debido a que muchas especies son nocturnas, tienen a sus crías en madrigueras o nidos subterráneos (Mock y Parker 1997) y además las madres pasan largos periodos de tiempo con sus crías por lo que es difícil distinguir entre la influencia maternal y la de los hermanos sobre el desarrollo de las crías (Hudson y Trillmich 2008). Sin embargo, un buen modelo para investigar las consecuencias de la interacción entre hermanos en mamíferos lo ofrece el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). Después del parto las crías permanecen con sus hermanos en el nido y la madre sólo visita a las crías una vez al día durante el periodo de amamantamiento que dura de 3 a 4 min aproximadamente y el resto del tiempo permanece ausente (Hudson y Distel 1982). Además, las crías de conejo europeo son altriciales y todo el tiempo las crías están agrupadas dentro del nido en contacto con sus hermanos de camada. El cuidado maternal limitado nos permite manipular a las crías sin interferir en la relación madre-cría (Hudson y cols. 1998).

2.2 Termorregulación conductual en crías del conejo europeo

Las crías altriciales de conejo europeo se desarrollan en un nido aislado dentro de la madriguera de crianza, que les brinda protección ante las bajas temperaturas ambientales a las que están expuestos (González-Mariscal y Rosenblat 1996). Con excepción de los 3 minutos que dura en promedio el amamantamiento, las crías permanecen solas y agrupadas en la región más caliente del nido bajo una cubierta aislante provista por pasto seco y pelo con el que la madre construye el nido (Hudson y Distel 1982). La presencia de hermanos beneficia el crecimiento y sobrevivencia de los individuos de la camada a través del calor y aislamiento que reciben las crías de sus hermanos. (Bautista y cols. 2003)

En crías sometidas a temperaturas ambientales por debajo de su zona termoneutral se encontró que permanecen agrupadas casi todo el tiempo (Bautista y cols. 2008). Para poder

mantenerse en un sitio térmicamente ventajoso (posiciones centrales en el agrupamiento) las crías de conejo europeo presentan dos conductas proactivas: la conducta de *tregar* en donde las crías suben encima de sus hermanas y se desplazan sobre ellas, y la conducta de *rooting* es cuando las crías se desplazan por debajo o entre sus hermanas adyacentes. Ambas conductas proactivas mejoran del “índice de agrupamiento”, que es una estimación del grado de aislamiento de una cría en un momento dado. Por el contrario, permanecer inmóvil resulta en una disminución del índice de agrupamiento (Bautista y cols. 2008).

Durante la primera semana de vida PN las crías pueden categorizarse en centrales o periféricas de acuerdo al grado de aislamiento que presentan en el agrupamiento formado por la camada (Bautista y cols. 2008; Rödel y cols. 2008 y Bautista y cols. 2013). Estas categorías están asociadas con variables fisiológicas como la temperatura corporal, la ingestión de leche y conversión de leche a biomasa, siendo las crías C quienes obtienen los valores más altos de tales variables (Bautista y cols. 2008, Bautista y cols. 2013). Contrariamente, las crías P son quienes presentan con mayor frecuencia conductas proactivas y tienen un índice de agrupamiento significativamente más bajo (Bautista y cols. 2008; Rödel y cols. 2008 y Bautista y cols. 2013).

2.3 Termorregulación fisiológica en crías del conejo europeo

En el conejo recién nacido el peso del TAP varía de 2.5 a 3.5g, representando un 5.5% del peso corporal del individuo (Hull y Segall 1965). La mayoría de la grasa parda aparece durante la última semana de gestación (Dawkins y Hull 1964). Una semana después del nacimiento, el TAP es remplazado gradualmente por tejido adiposo blanco en un periodo de tres meses aproximadamente (Dawkins y Hull 1964). Hull y Segal (1965) encontraron que tanto el TAP, como su contenido de grasa, disminuyen significativamente durante los primeros 3 días de vida PN.

Las crías altriciales de conejo europeo al experimentar temperaturas por debajo de su zona termoneutral activan el TAP (Dawkins y Hull 1964) para compensar la pérdida de calor corporal. Las crías periféricas del agrupamiento en el nido son las que experimentan las

temperaturas más bajas durante el agrupamiento y, por lo tanto, activan en mayor medida el metabolismo del TAP con una mayor expresión de la proteína UCP-1 (Bautista y cols. 2013).

2.3.1 Inervación y vascularización del TAP

En el conejo europeo se ha descrito que los nervios simpáticos están distribuidos en el TAP cervical a lo largo de las arterias y algunas ramas del ganglio estrellado que van junto a la arteria subclaviana. Las ramas de la arteria carótida común suministran el extremo cefálico del lóbulo anterior, el lóbulo superior entero, el extremo cefálico del lóbulo posterior y el ápice del lóbulo anterior lateral. La masa del lóbulo lateral además es irrigada por la arteria subclaviana. Las ramas de esta arteria pasan a través del lóbulo lateral al lóbulo posterior. El extremo caudal del lóbulo posterior es irrigado por una rama de la arteria axilar. El TAP axilar es vascularizado por esta rama después de salir del vaso principal. El extremo cefálico de la almohadilla es suministrado por una rama de la arteria axilar (Hull y Segal 1965a). (Fig. 2).

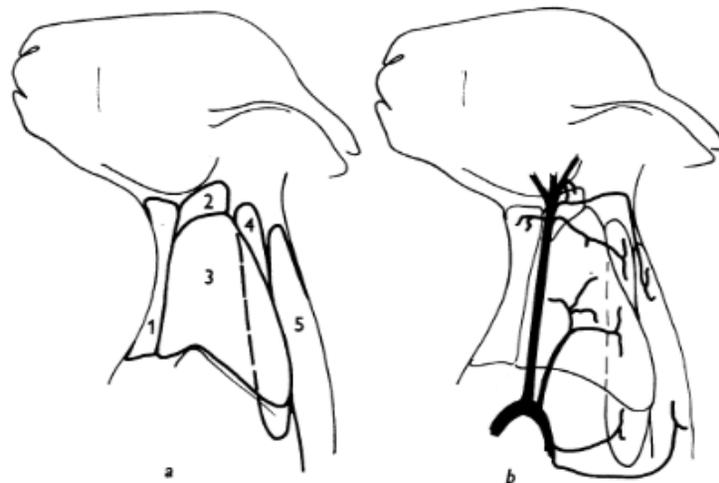


Figura 2. Morfología (a) e irrigación sanguínea (b) del TAP interescapular y cervical del conejo recién nacido. 1.- lóbulo cervical anterior; 2.- lóbulo cervical superior; 3.- lóbulo cervical lateral; 4.- lóbulo cervical posterior; 5.- almohadilla interescapular (Tomada de Hull y Segal 1965a).

El TAPi (tejido adiposo pardo interescapular) en su porción superior está innervado por los nervios espinales torácicos (Hull y Segal 1965b). Hull y Segal denervaron los lóbulos del TAPi y, después de 48 horas de ayuno en animales mantenidos a una temperatura de 30 °C, observaron retención de grasa en la almohadilla denervada, lo que demostró que el vaciado de grasa del TAP cervical está bajo control de la innervación simpática (Fig. 3).

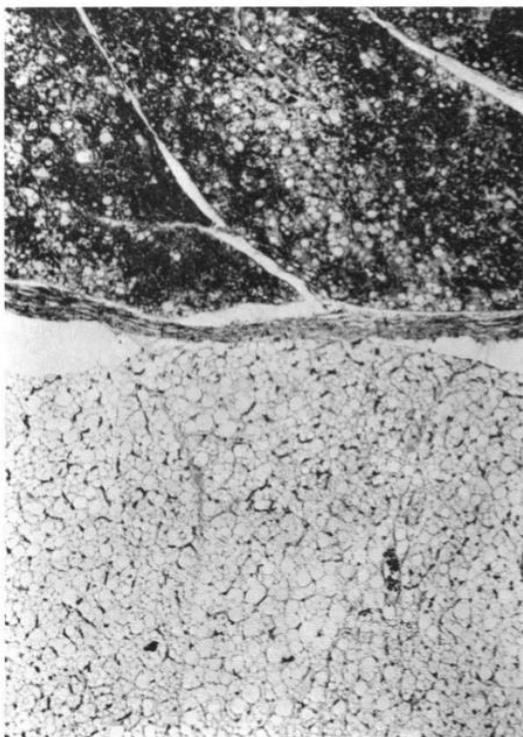


Figura 3. Vista histológica del tejido adiposo pardo cervical, lóbulo innervado (imagen superior) y lóbulo denervado (imagen inferior) en conejos recién nacidos a las 48 h de ayuno mantenidos a temperatura ambiental de 30 °C. (Bartness y cols. 2010).

2.3.2 Fisiología del TAP

La termogénesis del TAP es desencadenada por la liberación de noradrenalina (NA) desde sus terminales nerviosas simpáticas, estimulando los receptores β 3-adrenérgicos que activan una cascada de eventos intracelulares concluyendo en la activación de la proteína UCP-1.

Bautista y col. (2013) demostraron que crías centrales de 3 días posnatales presentaban una menor expresión de la proteína UCP-1 en contraste con los individuos periféricos que mostraron una mayor cantidad de UCP-1. Los hallazgos en crías periféricas estuvieron asociados a una menor masa corporal y una menor temperatura corporal durante los 3 días de exposición a temperaturas por debajo de su zona termoneutral. García-Torres y col. (2015) demostraron que las crías no nacen con estas diferencias si no que las adquieren en el periodo temprano de vida encontrando diferencias entre crías C y P respecto al número de vacuolas y niveles de triglicéridos los cuales están directamente relacionados con la actividad del TAP.

Recordando los dos hallazgos en que las crías centrales presentan una menor expresión de la proteína UCP-1 y un mayor número de vacuolas de triglicéridos nos llevan al planteamiento de la siguiente hipótesis.

3. HIPÓTESIS

La distribución de la proteína desacopladora UCP-1 es diferencial en crías centrales y periféricas, así como entre distintas secciones del TAPi.

4. OBJETIVO

Caracterizar la distribución de la proteína desacopladora UCP-1 en crías centrales y periféricas, así como en diferentes secciones del TAPi.

5. METODOLOGÍA

5.1 Animales

Se utilizaron seis camadas experimentales de conejo europeo de la raza Chinchilla (*Oryctulagus cuniculus*) obtenidas de cuatro diferentes conejas adultas, 4 nulíparas y 2 múltiparas (se usaron dos veces a dos hembras). Las conejas se mantuvieron en jaulas de acero inoxidable de 90 x 60 x 40 cm, bajo un ciclo luz-oscuridad 16:8h, correspondiente a las condiciones de la estación reproductiva para esta especie en Europa. La temperatura ambiental osciló entre los 17 y 24 °C. Se les proporcionó diariamente agua potable ofrecida *ad libitum* y alimento (Cre-C[®]), en sus respectivas jaulas. Todos los animales fueron mantenidos en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, México.

5.2 Procedimiento

Un par de horas después del parto la caja de crianza que contenía a las crías se retiró de la jaula de la madre y se registró el peso corporal de cada cría con una balanza (Scout Pro SP2001). Se marcó a cada cría con un marcador permanente negro (Faber-Castell[®]) en la parte ventral y se le asignó un número al azar (del uno en adelante dependiendo del número de individuos por camada) para su posterior identificación. Después, la caja de crianza con las crías se regresó a la jaula de la madre para que la primera alimentación de la camada ocurriera sin perturbación humana.

Al siguiente día, considerado como día posnatal 1 (DP1), a las 8:30 h la caja de crianza se retiró de la jaula individual de la madre y fue llevada al laboratorio. Allí se retiró la paja y pelo que formaban parte del nido y este material fue guardado y rotulado en una bolsa para su posterior regreso a la caja de crianza. Se verificó que las crías hubieran sido alimentadas por la noche y se registró el peso corporal de cada cría. A partir del peso al DP1 cada camada se estandarizó a 8 crías. Una vez estandarizada la camada, cada cría se remarcó (con el número que se le asignó al nacimiento) con un corrector blanco líquido no tóxico (Pelikan[®], Aqua fluid base agua) en la parte ventral, en el dorso, la cabeza y costados para facilitar su visualización.

A las 9:00 h las crías fueron introducidas a un cuarto frío con una temperatura ambiental de 25 °C. Esta temperatura se encuentra por debajo de la zona termoneutral del

conejo doméstico (Bautista y cols. 2005; Rödel y cols. 2008; Bautista y cols. 2013), lo cual indujo el agrupamiento sin comprometer la sobrevivencia de las crías. En la base de la caja de crianza se colocó una franela roja y sobre ella un aro de malla metálica de 28 cm de diámetro para contener a las crías en el centro evitando así el aislamiento térmico con las paredes de la caja de crianza. Cada cría se colocó dentro de la caja y se iniciaron las grabaciones a partir de las cuales se determinó a la cría central (C) y periférica (P) de cada camada.

Las grabaciones se realizaron a las 9:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 y 23:00 h. Cada videograbación tuvo una duración de 15 minutos. Inmediatamente después de cada video hasta las 17 h se tomó la temperatura de las crías en el cuello y la ingle (lo cual representa la temperatura más alta y más baja del cuerpo del animal) con un termómetro digital (thermocouple Fluke[®] 52 II). Para esto se consideró el esquema aleatorio descrito previamente por Bautista y cols. (2008). En el DP1 se obtuvieron seis grabaciones y cinco registros de temperatura corporal. La temperatura del cuarto frío disminuyó un grado centígrado cada día para continuar induciendo el agrupamiento, este cambio se realizó manualmente a las 19:30 h de cada DP correspondiente.

En el día posnatal 2 (DP2) y día posnatal 3 (DP3) el registro de videos se realizó en los siguientes horarios: 1:00, 3:00, 5:00, 7:00, 9:00, 11:00, 13:00, 15:00, 17:00 y 23:00 h y el registro de temperatura corporal se realizó inmediatamente después de la captura del video de las 9:00 a las 17:00 h. En el DP2 se obtuvieron 10 filmaciones y cinco registros de temperatura corporal. Posterior al registro de temperatura corporal de las 11:00 h a cada cría se le indujo la micción, se pesaron y fueron reintroducidas a la caja de crianza, después se llevó a la madre al cuarto frío y se colocó frente a la caja de crianza para que la coneja alimentara a la camada. Al término de éste, la coneja se regresó a su caja individual correspondiente. Las crías se pesaron nuevamente y se colocaron en la caja de crianza con el aro metálico para continuar con el protocolo correspondiente.

El día posnatal 4 (DP4) se continuó con el protocolo del día DP3 hasta el último video y registro de la temperatura corporal de las 17:00 h. En este día se determinó el número de hermanos que tuvo en contacto cada cría (a partir de los videos grabados) para seleccionar a la cría C y P.

5.2.1 Número de hermanos en contacto

Para determinar a la cría C y P de cada camada se examinaron cuatro cuadros de cada video registrado en el momento cero (iniciada la filmación), a los cinco, 10 y 15 min de grabación (al final de la grabación). En cada uno de los cuadros se contó el número de hermanos que estuvieron en contacto con alguna parte del cuerpo de cada cría focal (exceptuando orejas, patas y cola) y representando más de un 10% de la periferia del cuerpo del individuo (Bautista y cols. 2008, 2010; Rödel y cols. 2008 y Bautista y cols. 2013). Finalmente, a partir de estas observaciones del DP1 al DP4 se consideró el promedio del total de hermanos en todos los videos analizados identificando así a la cría C y P.

5.3 Técnica histológica

Después de la determinación de la cría C y P, éstas fueron separadas de la camada para su sacrificio por decapitación. Posterior a ello se procedió a la extracción del tejido adiposo pardo interescapular (TAPi) izquierdo. Esto se realizó mediante un corte en la piel a lo largo del dorso hasta descubrir los lóbulos de TAPi. El TAPi fue fijado por inmersión en una solución de Bouin-Duboscq durante 15 h. Transcurrido ese tiempo el tejido se colocó en alcohol etílico de concentraciones ascendentes (70, 80, 96 y 100%). Enseguida fue aclarado en una solución de etanol-xileno y xileno absoluto. El tejido se impregnó durante 12 h e incluyó en paraplast X-tra (Sigma-Aldrich).

Se realizaron cortes transversales de 7 μm de grosor en un microtomo Leica y se montaron en portaobjetos previamente tratados con solución de poly-L-lysina. Los cortes se realizaron a lo largo del tejido en tres secciones distintas: anterior, intermedia y posterior. De cada sección se montaron 10 portaobjetos de 8 cortes cada uno, se obtuvieron 80 cortes por región, dando un total de 240 cortes por tejido (fig. 4).

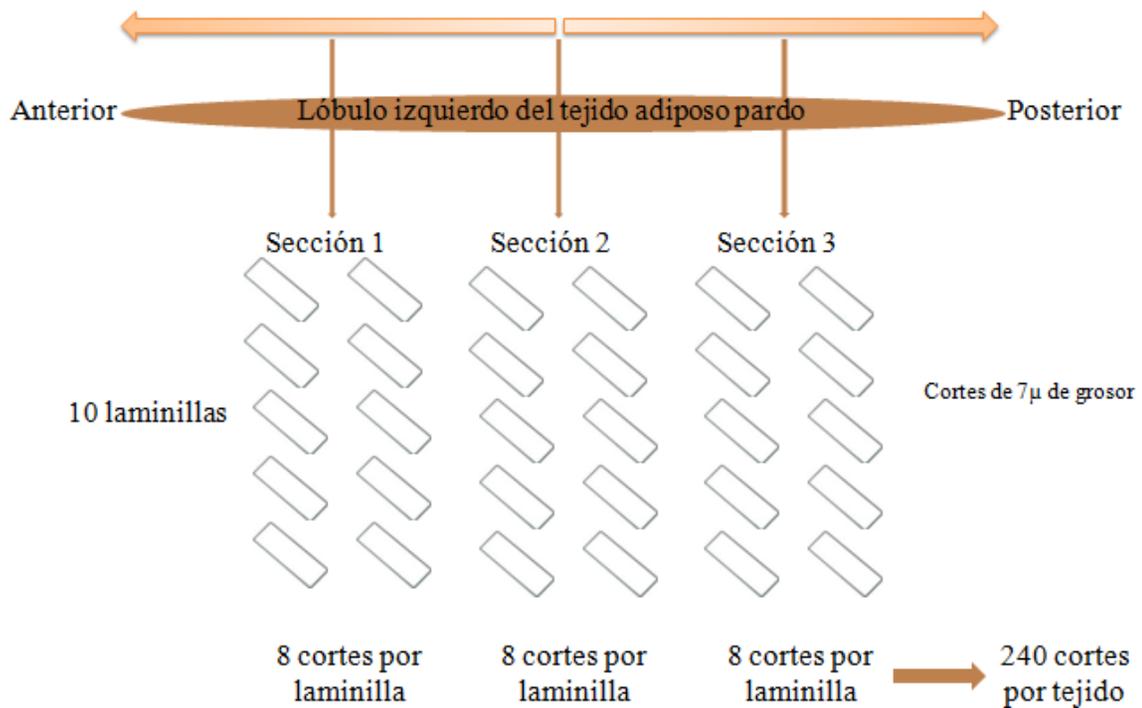


Figura 4. Esquema de la toma de los cortes histológicos del TAPi de crías C y P de conejo doméstico.

5.4 Técnica inmunohistoquímica

Para realizar la estandarización de la técnica inmunohistoquímica se realizaron controles negativos para evitar la tinción de fondo inespecífica que consiste en evitar el antisuero primario. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto fue verificado previamente a la estandarización de la técnica mediante ensayos. Los componentes que no se tiñeron demostraron la ausencia de tinción específica. Si en caso contrario se hubiese producido una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras no serían considerados como válidos.

Realizados los cortes del TAPi, éstos se dejaron secar por una semana. Después, se desparafinaron en xileno y alcohol etílico en concentraciones de 100, 96, 80 y 70%, se lavaron

con agua destilada y se dejaron en una solución de citrato de sodio por tres noches. Siempre se utilizaron las tres secciones de cada tejido de las crías C y P de cada camada. Las pruebas inmunohistoquímicas fueron de la siguiente manera:

Laminilla N° 1: para el marcaje de la proteína UCP1

Después de realizar el destape de antígenos con citrato de sodio, los tejidos se lavaron con solución salina amortiguada (PBS) al 1%. Posteriormente se inhibió la peroxidasa endógena con agua oxigenada (H_2O_2), se continuó con 3 lavados de PBS al 1% durante 5 minutos cada uno y se realizó un lavado con solución salina amortiguada y tritón (PBSt) al 0.2%. Se bloqueó con suero de cabra al 5% por 30 minutos, se lavó en PBSt y se incubó una noche con el anticuerpo primario UCP1 (1:25) en refrigeración a temperatura de 14 °C en una cámara húmeda. Al día siguiente los cortes se lavaron con solución de PSBt, se incubó con el anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG-FITC (1:250) durante dos horas a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBSt y se realizó un lavado con PBS al 1%. Se incubó con el Complejo Avidina Biotina (ABC) preparado en PBS al 1%. Posteriormente se lavó con PSB al 1% y se reveló con una solución de diaminobenzidina tetrahidroclorhídrica (DAB), al final se contrastó con hematoxilina de Harris durante 30 s y finalmente se montaron con solución de resina sintética y Xilol. Como control negativo se llevó a cabo el mismo proceso, pero sin utilizar el anticuerpo primario.

5.5 Análisis de las imágenes

De los 8 cortes en cada una de las laminillas teñidas, se seleccionó al azar un corte y se tomaron las fotografías necesarias al 10x para realizar las reconstrucciones y poder tener una mejor definición para poder observar los detalles de cada corte. Las imágenes de obtuvieron en un microscopio óptico de luz clara (Nikon D5.Ri2) con una resolución de 10x, 40x y 100x, las cuales fueron analizadas cualitativamente con el programa Image J 1.51. En total se realizaron 36 reconstrucciones las cuales se obtuvieron de 970 imágenes tomadas al 10x, con un promedio de 27 imágenes por reconstrucción. Las 36 reconstrucciones corresponden a las seis camadas con las que trabajamos, de cada camada a la cría C y su hermana P y de cada una de las crías las tres secciones analizadas (anterior, media y posterior). Para determinar la

intensidad de marcaje se tomó como referencia a las imágenes con mayor marcaje a las cuales se les asignó el valor de “3” indicando el mayor marcaje y de ahí para los marcajes de menor intensidad se asignaba el valor de “2” o “1” dependiendo su intensidad de marcaje positivo a la proteína UCP-1. Esto mismo se llevó a cabo para cada una de las secciones analizadas por cada cría.

5.6 Análisis de los datos

Las variables comparadas fueron el número de hermanos, peso corporal al nacimiento y al día posnatal cuatro, temperatura corporal. Para las comparaciones entre crías centrales y periféricas se utilizó una t-pareada o una prueba de Wilcoxon dependiendo de la naturaleza de los datos o de si mostraban una distribución normal de acuerdo con la prueba de Saphiro-Wilks. En todos los análisis se consideró un intervalo de confianza del 95% y los resultados son reportados como media (\pm DE) o mediana. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad 5.

6. RESULTADOS

Peso corporal al nacimiento

El peso corporal promedio de las crías centrales al nacimiento fue de 66.1 g (\pm 5.30) y de crías periféricas 51.3 g (\pm 9.39). Estas diferencias fueron significativas (t-pareada= 4.036, n=6, p= 0.01; Fig. 5).

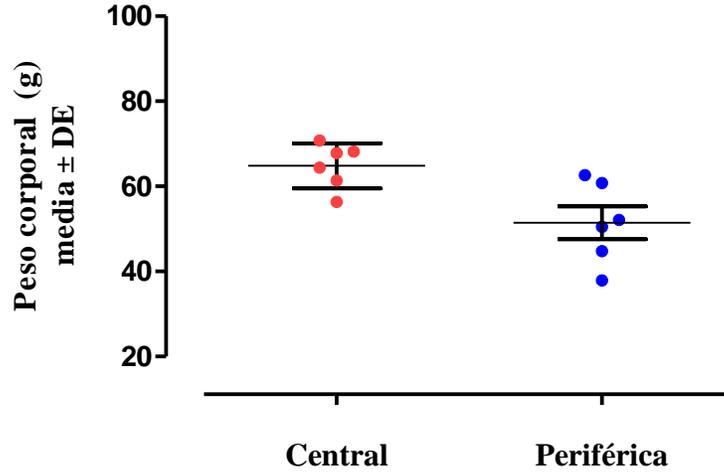


Figura 5. Comparación de la media (\pm DE) del peso corporal de crías centrales y periféricas al nacimiento.

Peso corporal al DP 4

El peso corporal promedio de las crías centrales en el DP 4 fue de 83.25 g (\pm 9.40) y crías periféricas 61.25 g (\pm 9.49). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (t- pareada= 3.15, n=6, p= 0.02; Fig. 6).

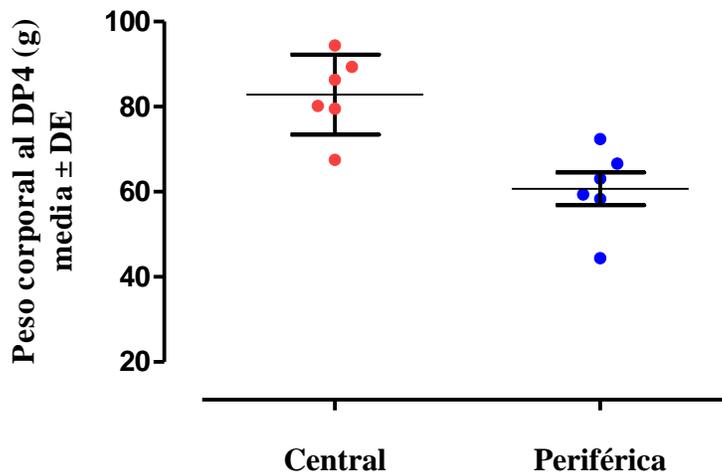


Figura 6. Comparación de la media (\pm DE) del peso corporal de crías centrales y periféricas en el DP 4.

Temperatura corporal

La temperatura corporal promedio del DP 1 al DP 4 de las crías centrales fue de 36.57 °C (± 0.28) y en las crías periféricas fue de 35.69 °C (± 0.56). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (t -pareada= 3.58, $n=6$, $p= 0.01$; Fig. 7).

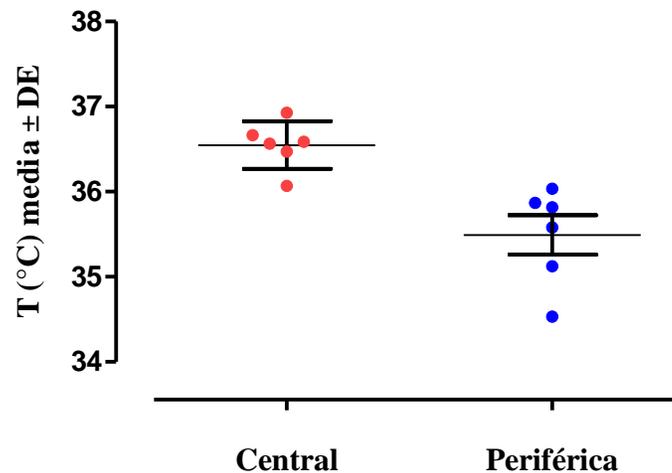


Figura 7. Comparación de la media (\pm DE) de la temperatura corporal de crías centrales y periféricas del DP 1 al DP 4.

Número de hermanos en contacto

El promedio del número de hermanos en contacto para las crías centrales del DP 1 al DP 4 fue de 2.8 (± 0.2) y en las crías periféricas fue de 2.29 (± 0.1). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (Wilcoxon, $W= 21$, $n=6$, $p= 0.03$; Fig. 8).

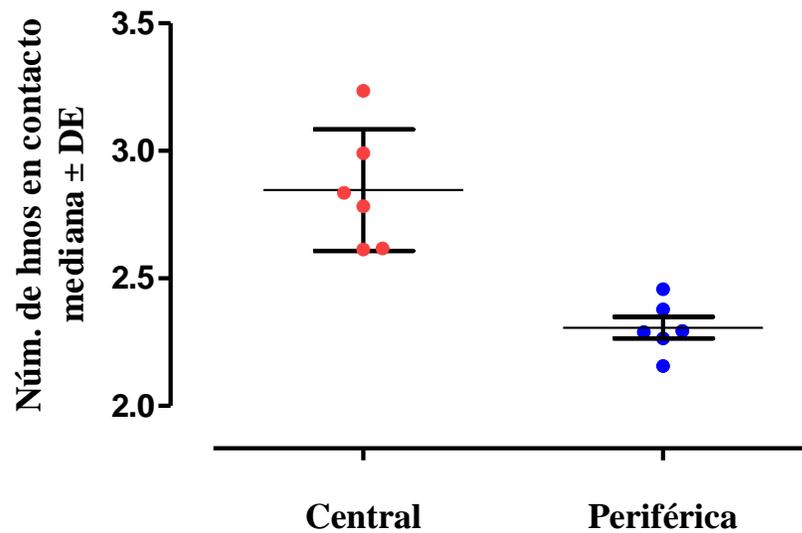


Figura 8. Comparación de la mediana del número de hermanos en contacto de crías centrales y periféricas del DP 1 al DP 4.

Descripción cualitativa

Marcaje de la proteína UCP1

Los cortes histológicos del TAP de las crías C en el DP 4 mostraron un menor marcaje de la proteína UCP-1 en comparación con las crías P (*t-pareada*= 3.05, n=6, p= 0.02; Fig. 9).

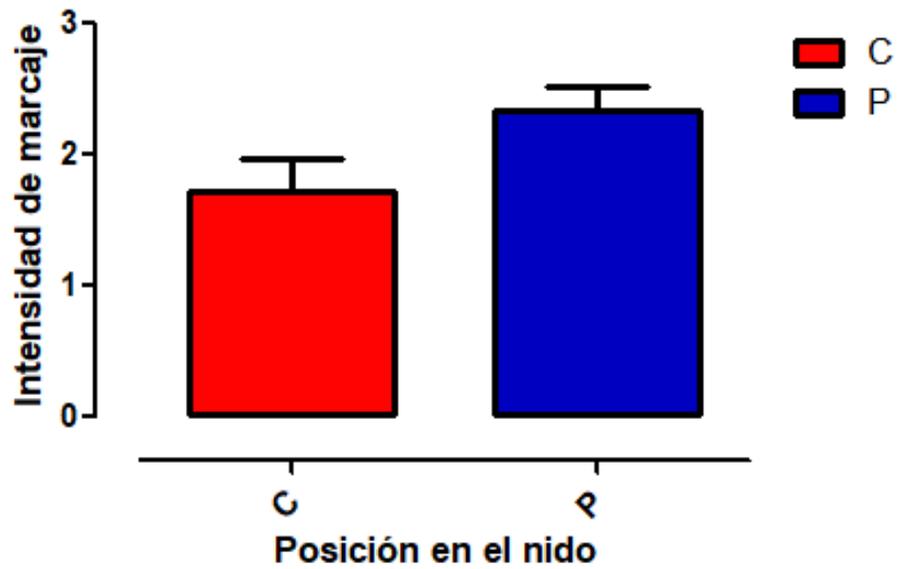


Figura 9. Comparación de la intensidad de marcaje de la proteína UCP-1 del TAP de crías centrales y periféricas al DP 4.

Los cortes histológicos de la región anterior del TAP de las crías C y P en el DP 4 no mostraron diferencias significativas en el marcaje de la proteína UCP-1 (t-pareada= 1.58, n=6, p= 0.17; Fig. 10).

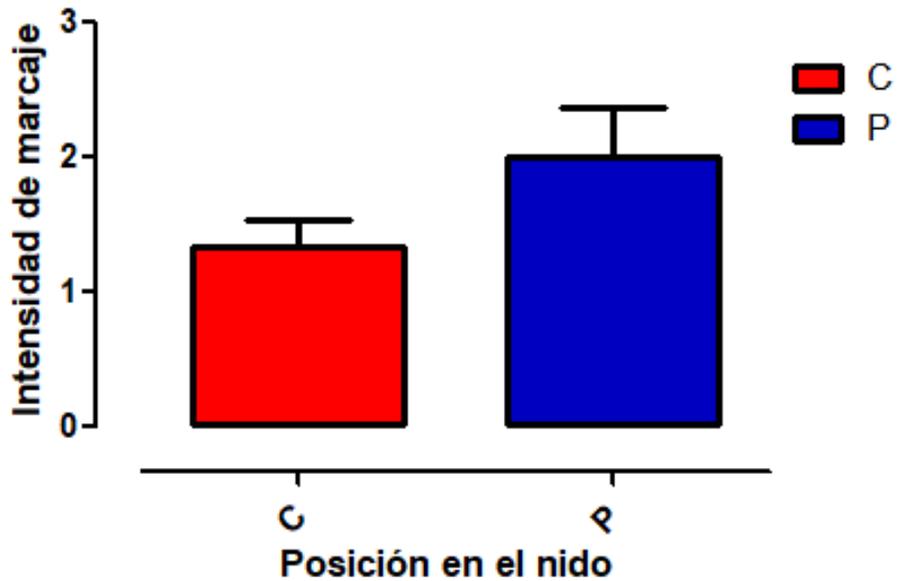


Figura 10. Comparación de la intensidad de marcaje de la proteína UCP-1 de la región anterior del TAP de crías centrales y periféricas al DP 4.

Los cortes histológicos de la región media del TAP de las crías C en el DP 4 mostraron un menor marcaje de la proteína UCP-1 en comparación con las crías P (t -pareada= 2.71, $n=6$, $p=0.04$; Fig. 11).

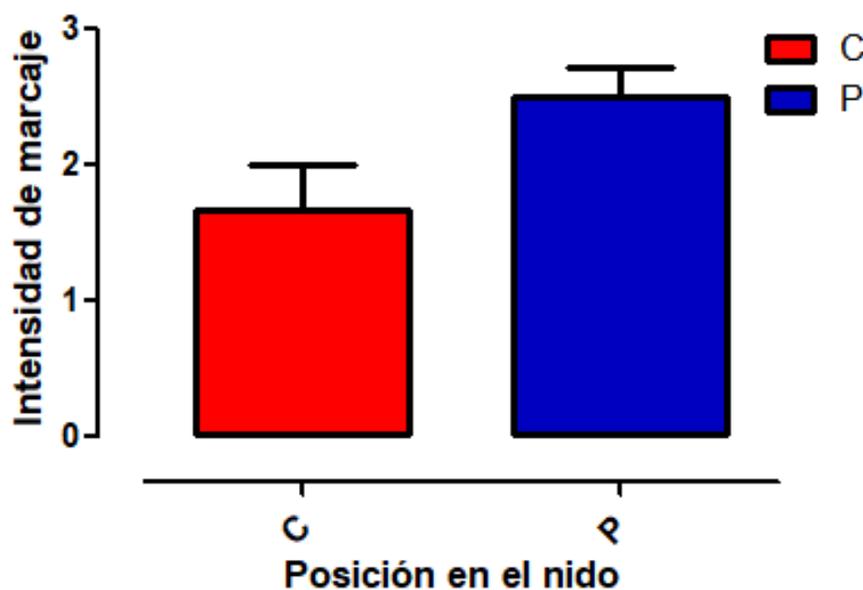


Figura 11. Comparación de la intensidad de marcaje de la proteína UCP-1 de la región media del TAP de crías centrales y periféricas al DP 4.

Los cortes histológicos de la región posterior del TAP de las crías C y P en el DP 4 no mostraron diferencia significativa en el marcaje de la proteína UCP-1 (t -pareada= $t= 1.00$, $n=6$, $p= 0.36$; Fig. 12).

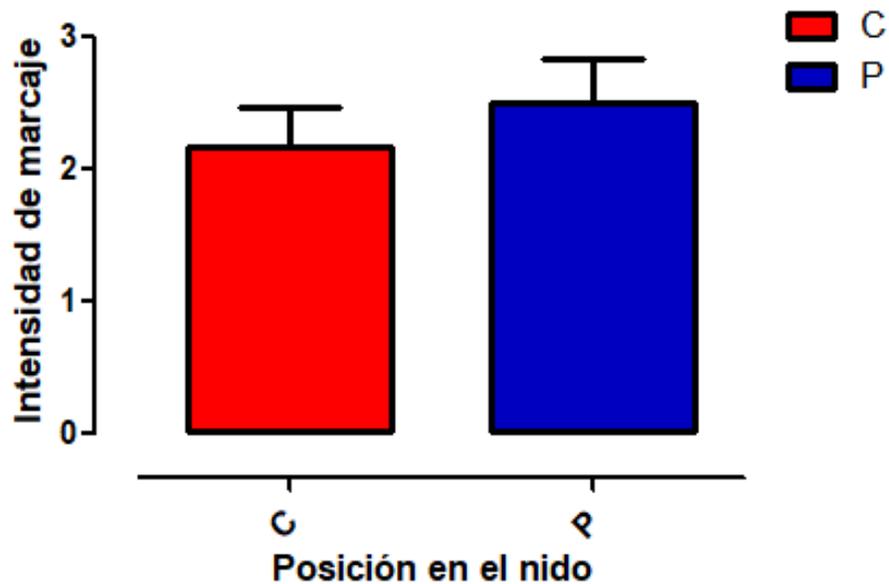


Figura 12. Comparación de la intensidad de marcaje de la proteína UCP-1 de la región posterior del TAP de crías centrales y periféricas al DP 4.

Cualitativamente los cortes histológicos de las crías C en el DP 4 mostraron una menor cantidad de la proteína UCP-1 en comparación con las crías P. La sección en donde se observó la mayor heterogeneidad en su composición fue la sección intermedia de las crías periféricas (Fig. 13).

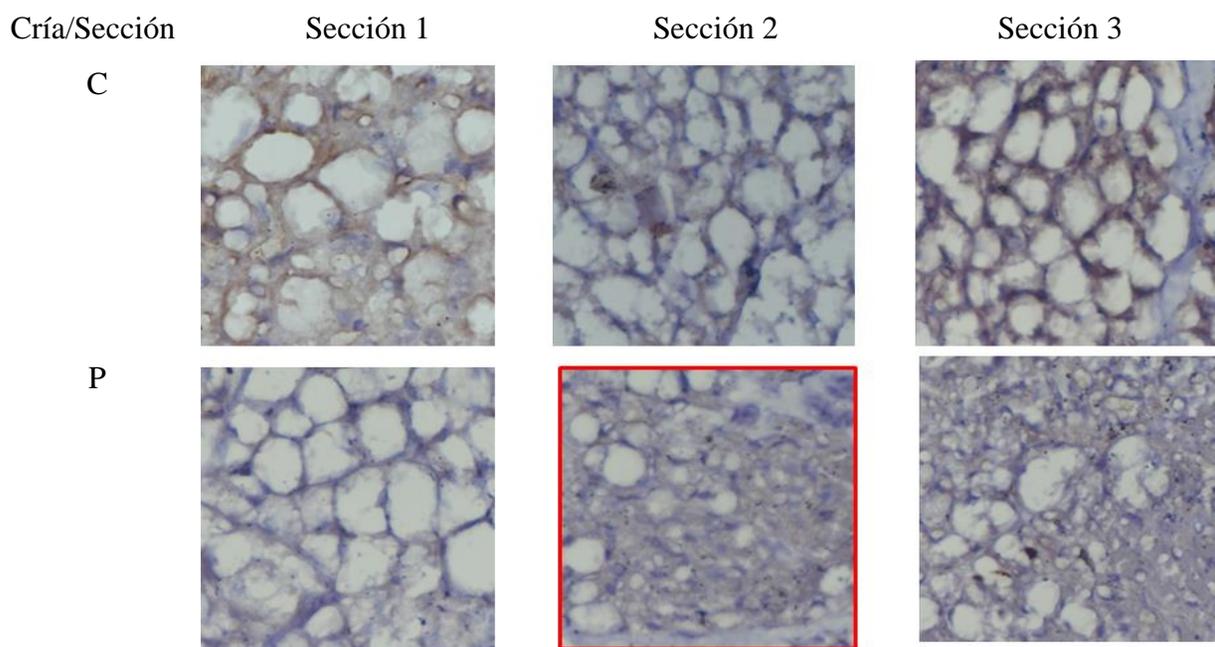


Figura 13. Tres secciones de tejido adiposo pardo interescapular (TAPi) marcadas con UCP-1. Cría central (C) y periférica (P) sacrificadas al DP 4. La imagen resaltada con rojo representa la sección media que corresponde a la zona más heterogénea de los cortes. Aumento 40x.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis se enfocó en la descripción histológica cualitativa y semi-cuantitativa del marcaje de la proteína UCP-1 dividiendo el TAP en tres secciones: anterior, media y posterior en relación a las interacciones intracamada en la vida posnatal temprana en camadas de crías de conejo europeo que durante sus primeros cuatro días de vida ocuparon las posiciones más centrales o periféricas dentro del agrupamiento.

Particularmente, y como ha sido replicado para varios de los trabajos de nuestro laboratorio, las crías que presentaron un peso más bajo al nacimiento ocuparon posiciones más periféricas dentro del agrupamiento implicando menos ventajas térmicas en el agrupamiento en contraste con sus hermanas de camada que desde el nacimiento presentaron mayores pesos ocupando las posiciones más centrales dentro del agrupamiento, además, las crías periféricas

presentaron una menor temperatura corporal (Bautista y cols. 2013; Reyes-Meza y cols. 2011) durante los primeros cuatro días de vida en contraste con sus hermanas de camada con posiciones centrales.

Histológicamente respecto a la cantidad de la proteína UCP1 encontramos que las crías centrales presentaron una menor proporción de la proteína UCP1 lo cual concuerda con trabajos reportados anteriormente (Bautista y cols. 2013) donde las crías centrales de tres días de vida presentaron una menor cantidad de la proteína UCP1. García-Torres (2015) indicó que era posible que las crías periféricas sean quienes presentan una activación simpática mayor que las crías centrales, ya que la utilización de grasa para la termogénesis del tejido adiposo pardo depende de la activación del tejido por el sistema nervioso simpático y de la liberación de noradrenalina (NE) por las terminales nerviosas (Cannon y Nedergaard 2004), lo cual es una característica que ocurre en animales criados en una temperatura ambiental fría, donde la densidad de la inervación simpática del tejido adiposo pardo se ve incrementada debido a la demanda para mantener una temperatura corporal adecuada y favorecer la supervivencia (Morrison y cols. 2000)

Los resultados que obtuvimos en el presente trabajo de tesis apoyan los hallazgos reportados en la literatura mostrando que en animales altriciales, como el conejo doméstico, en los recién nacidos la posición de las crías dentro del agrupamiento puede afectar la histología del tejido adiposo pardo modificando el marcaje diferencial de la proteína UCP-1 que se presenta en el tejido adiposo pardo. Reportes anteriores muestran que los mecanismos termorregulatorios son susceptibles durante la experiencia posnatal temprana (García-Torres y cols. 2015) con posibles efectos a largo plazo. Así, los animales criados a una temperatura baja, como fue el caso de las crías periféricas de este estudio, muestran una mejor defensa en exposiciones subsecuentes al frío en contraste con aquellos animales criados a una temperatura alta (Young y Shimano 1998) los cuales pueden responder de una manera no tan favorable ante un reto ambiental o de supervivencia.

Falta por investigar el significado funcional de las diferencias encontradas en la cantidad de UCP-1 a lo largo del tejido adiposo pardo entre las crías centrales y periféricas, Estas diferencias en expresión de UCP-1 posiblemente reflejen a su vez una inervación simpática diferencial a lo largo del TAPi, lo cual significaría que existiría un moldeamiento del sistema

nervioso simpático a partir de la experiencia temprana de los individuos es probable que también se pueda modificar el sistema nervioso central al nivel de los núcleos encargados de la termorregulación en mamíferos como lo son el área pre óptica y el núcleo paraventricular, además faltaría indagar en si las diferencias observables en las crías de cuatro días de edad se mantienen o tienen consecuencias a largo plazo en su termorregulación fisiológica pero además en su respuesta a retos estresantes.

8. PERSPECTIVAS

Finalmente, se propone para futuros experimentos incrementar el número de muestra, realizar análisis cuantitativos de los cortes que representen diferencias en el marcaje diferencial de la innervación de PGP 9.5 que es conocido como ubiquitina-carboxi-terminal-hidrolasa 1 (UCHL-1). Es una proteína específica de neuronas, en todos los niveles del sistema nervioso central y periférico. Además, investigar si las diferencias que encontramos en los individuos centrales y periféricos en etapas tempranas se mantienen o cambian cuando estos individuos son adultos teniendo implicaciones en su fisiología adaptándose o afectando negativamente la supervivencia de los individuos.

9. REFERENCIAS

1. Argente MJ, Santacreu MA, Client A y Blasco A. 2003. Relationships between uterine and fetal traits in rabbits selected on uterine capacity. *Journal of Animal Science*. 81:1265-1273.
2. Bamshad M, Kay SC y Bartness TJ. 1999. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *APS 30303*: R1569-R1578.
3. Bánszegi O, Altbäcker V y Bilká Á. 2009. Intrauterine position influences anatomy and behavior in domestic rabbits. *Physiol. Behav.* 98:258-262.

4. Bartness TJ, Vaughan CH y Song CK. 2010. Sympathetic and sensory innervations of brown adipose tissue. *Int J Obes.* 34:536-542.
5. Bartness TJ, George N. 1984. Effects of interscapular brown adipose tissue denervation on body weight and energy metabolism in ovariectomized and estradiol-treated rats. *Behav Neurosci.* 98: 674-685.
6. Bautista A, Castelán F, Pérez-Roldán H, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2013. Competition in newborn rabbits for thermally advantageous positions in the litter huddle is associated with individual differences in brown fat metabolism. *Physiol. Behav.* 118: 189-194.
7. Bautista A, Drummond H, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2003. Thermal benefit of littermate presence in the newborn rabbit. *Dev Psychobiol.* 43: 208-215.
8. Bautista A, García-Torres E, Martínez- Gómez M y Hudson R. 2008. Do newborn domestic rabbits *Oryctolagus cuniculus* compete for thermally advantageous positions in the litter huddle? *Behav Ecol Sociobiol.* 62: 331-339.
9. Bautista A, Rödel HG, Monclús R, Juárez-Romero M, Cruz-Sánchez E, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2015. Intrauterine position as a predictor of postnatal growth and survival in the rabbit. *Physiol. Behav.* 138: 101-106.
10. Bautista A, Mendoza-Degante M, Coureaud G, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2005. Scramble competition in newborn domestic rabbits for an unusually restricted milk supply. *Anim Behav.* 70: 1011-1021.
11. Cannon B y Nedergaard J. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 84: 277-359.
12. Dawkins JR y Hull D. 1964. Brown adipose tissue and the response of new-born rabbits to cold. *J Physiol.* 172: 216-238.
13. Drummond H. 2006. Dominance in vertebrate broods and litters. *QRB.* 81, 3-32
14. Drummond H, Vázquez E, Sánchez-Colón S, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2000. Competition for milk in the domestic rabbit: survivors benefit from littermate deaths. *Ethology.* 106: 511-526.

15. Freeman KB, Meyrick K, Patel HV y Ridley RG. 1985. Size analysis of uncoupling protein and its precursor from brown adipose tissue of different species. *Can J Biochem Cell Biol.* 63: 988-991.
16. González-Mariscal G y Rosenblatt JS. 1996. Maternal behavior in rabbits. *ELSEVIER.* 25: 333-360.
17. García-Torres E. 2015. Diferencias fisiológicas intracamada asociadas a la termorregulación conductual en gazapos. Tesis de Doctorado en Neurortología. Universidad Veracruzana.
18. García-Torres E, Hudson R, Castelán F, Martínez-Gómez M y Bautista A. 2015. Differential metabolism of brown adipose tissue in newborn rabbits in relation to position in the litter huddle. *J Therm Biol.* 51: 33-41.
19. Hill RW, Wyse GA y Anderson M. 2012. Thermal Relations. *Animal Physiology.* Third Edition. pp. 128-275.
20. Hudson R, Bautista A, Reyes-Meza V, Montor JM y Rödel HG. 2011. The effect of siblings on early development: a potential contributor to personality differences in mammals. *Dev Psychobiol.* 53(6): 564-74.
21. Hudson R, Cruz Y, Carrillo P y Martínez-Gómez M. 1998. Conducta maternal en el conejo europeo: un recordatorio de la diversidad en mamíferos. *Compilador. Biología de la Reproducción. UAM.* 419-440.
22. Hudson R y Distel H. 1982. The pattern of behavior of rabbit pups in the nest. *Behav* 79: 255-271.
23. Hudson R y Trillmich F. 2008. Sibling competition and cooperation in mammals: challenges, developments and prospects. *Behav Ecol Sociobiol.* 6: 299-307.
24. Hull D y Segal MM. 1965a. The contribution of brown adipose tissue to heat production in the new-born rabbit. *Physiol.* 181: 449-457.
25. Hull D y Segal MM. 1965b. Sympathetic nervous control of brown adipose tissue and heat production in the new-born rabbit. *Physiol.* 181: 468-477.
26. Kajimura S y Saito M. 2014. A new era in Brown adipose tissue biology: Molecular control of Brown fat development and energy homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.* 76: 13.1-13.25.

27. Kraus C, Trillmich F y Künkele J. 2005. Reproduction and growth in a precocial small mammal, *Cavia magna*. *J Mammal.* 86: 763-772.
28. Mendl M. 1988. The effect of litter size variation on mother-offspring relationships and behavioral and physical development in several mammalian species (principal rodents). *J of Zoolog.* 215: 15-34.
29. Mock DW y Parker G. 1997. *The evolution of sibling rivalry.* Oxford University.
30. Morrison SF y Nakamura K. 2011. Central neural pathways for thermoregulation. *J. Neurosci.* 16: 74-104.
31. Morrison SF, Ramamurty S y Young JB. 2000. Reduced rearing temperature augments responses in sympathetic outflow to brown adipose tissue. *J. Neurosci.* 24: 9264-9271.
32. Pérez-Roldán H. 2011. Competencia en crías de conejo doméstico por sitios térmicamente ventajosos dentro del nido y su relación con el metabolismo del tejido adiposo pardo. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
33. Pérez-Roldán H, Hudson R, Castelán F, Martínez-Gómez M y Bautista A. 2010. In newborn rabbits position in the litter huddle is associated with differential metabolism of brown adipose tissue. *Develop Psychob.* 52: 691-722.
34. Reyes-Meza V, Hudson R, Martínez-Gómez M, Nicolás L, Rödel HG y Bautista A. 2011. Possible contribution of position in the litter huddle to long-term differences in behavioral style in the domestic rabbit. *Physiol. Behav.* 104: 778-785.
35. Ricquier D y Bouillaud F. 1986. The brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein. Trayhum P, Nicholls DG, (eds.) *Brown adipose tissue.* pp 86-104.
36. Ricquier D y Kader JC. 1976. Noradrenaline controls the concentration of the uncoupling protein in brown adipose tissue. *J of Biochemistry.* 73: 577-583.
37. Rödel HG, Bautista A, García-Torres E, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2008. Why do heavy littermates grow better than lighter ones? A study in wild and domestic European rabbits. *Physiol. Behav.* 95: 441-448.
38. Rödel HG, Bora A, Kaetzke P, Khaschei M, Hutzelmeyer H y Von HD. 2004. Overwinter survival in subadult European rabbits: weather effects, density-dependence, and the impact of individual characteristics. *Ecology.* 140: 566-76.

39. Rosenwalt M y Wolfrum C. 2014. The origin and definition of versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte*. 3: 14-9.
40. Ryan BC y Vandenberg JG. 2002. Intrauterine position effects. *Neurosci Biobehav Rev*. 26: 665–678.
41. Saely CH, Geiger K y Drexel H. 2010. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*. 58: 15-23.
42. Schönbaum E y Lomax P. 1990. Temperature regulation and drugs: an introduction. *International Review of Neurobiology*. 1-16
43. Sheldon EF. 1924. The so-called hibernating gland in mammals: a form of adipose tissue. *Anatomical Record*. 28: 331-347.
44. Silva JE. 2001. The multiple contributions of thyroid hormone to heat production. *Clin Invest*. 108: 35-37
45. Tam CS, Lecoultre V y Ravussin E. 2012. Brown Adipose Tissue, Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Circulation*. 125: 2782-2791.
46. Trayhurn P. 1993. Brown Adipose tissue: from thermal physiology to bioenergetics. *J of Biosciences*. 18: 161-173.
47. Young JB y Shimano Y. 1998. Effects of rearing temperature on body weight and abdominal fat in male and female rats. *American Physiological Society*. 274: 398-405.