



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**COMPETENCIA EN CRÍAS DE CONEJO DOMÉSTICO
POR SITIOS TÉRMICAMENTE VENTAJOSOS
DENTRO DEL NIDO Y SU RELACIÓN CON EL
METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOS PARDOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Biol. Humberto Pérez Roldán

Codirectores:

Dr. Amando Bautista Ortega

Dr. Francisco Castelán

Miembros del Comité Tutorial

Dra. Robyn Hudson

Dra. Margarita Martínez Gomez

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2011



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



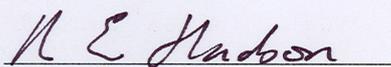
Maestría en Ciencias Biológicas

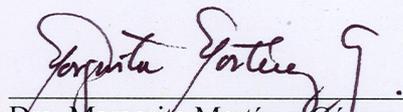
COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Humberto Pérez Roldán** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Competencia por sitios térmicamente ventajosos dentro del nido y su relación con la actividad del tejido adiposo pardo”**.

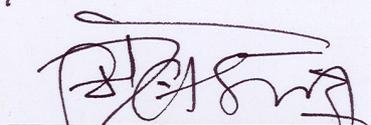
Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

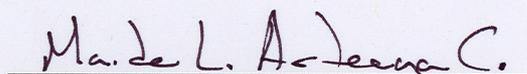
ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 30 DE 2010


Dra. Robyn Hudson


Dra. Margarita Martínez Gómez


Dra. María del Carmen Cortés Sánchez


Dr. Francisco Castelan


Dra. María de Lourdes Arteaga Castañeda


Dr. Amando Bautista Ortega



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Esta Tesis se realizó bajo la codirección del Dr. Amando Bautista Ortega y Dr. Francisco Castelán y la asesoría del Dra. Robyn Hudson, la Dra. Margarita Martínez Gómez y el Dra. Ma. Del Carmen Cortés Sánchez. Carolina Rojas y Laura García contribuyeron con asistencia técnica.

El trabajo experimental se realizó en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para su desarrollo y realización se contó con el financiamiento de CONACYT (RH-486924 y HPR 218186), PAPIIT (RH- IN229907-3) y ECOES (Beca de movilidad Santander-Serfin a HPR). La Maestría en Ciencias Biológicas forma parte del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Agradecimientos a título personal

Al Dr. Amando Bautista Ortega por su confianza, su motivación y su ánimo. Su generosidad y pródica instrucción a mis mejoras académicas.

Al Dr. Francisco Castelán por su enorme paciencia y largo trabajo empleado en este trabajo. Por sus sabios consejos, sinceridad y su amistad.

A la Dra. Margarita Martínez Gómez por sus consejos y por su entusiasmo para la realización de este trabajo. Principalmente a su valiosa amistad.

A la Dra. Robyn Hudson por su enseñanza, aportaciones y por su entusiasmo para la realización de este trabajo y todos los comentarios positivos que mejoraron esta tesis.

A la Dra. Ma. Del Carmen Cortés Sánchez por sus aportaciones y comentarios que mejoraron este trabajo.

A mis compañeros de los laboratorios de Psicología del Desarrollo y de Electrofisiología del CTBC por el apoyo y consejos para la realización de este trabajo pero principalmente por su amistad.

A mi familia por su apoyo incondicional, paciencia y comprensión a cada momento.
Gracias por su amor.

A la M en C. Fabiola Luna Vázquez, mi pareja, por toda su paciencia, apoyo y sabios consejos en la realización de este trabajo.

Dedicatoria

A mis padres y amigos

Mi padre Silvano, mi madre Graciela

Mis hermanos Perla, Belem y Silvano

A mi familia política: Sra. Alicia, Memo y Carmelita, Coco, Diegito y Chuchito

*Y principal mente al amor de mi vida a **Fabiola Luna Vázquez** por demostrarme cada día su amor por estar en todo momento malo o bueno de mi vida. ¡Gracias por caminar a mi lado amor!*

RESUMEN

Mantener una temperatura corporal adecuada es uno de los retos en mamíferos altriciales, debido al estado de inmadurez en el que nacen. Un ejemplo es el conejo doméstico. Las crías de esta especie presentan un reto adicional, el limitado cuidado maternal. La madre solo visita a sus crías una sola vez al día por pocos minutos para alimentarlas y no les provee cobijo. Por ello las crías necesitan de sus hermanos para mantener su temperatura corporal ya que al agruparse entre ellas obtienen un mayor aislamiento disminuyendo la pérdida de calor. Sin embargo, los beneficios térmicos del agrupamiento no son compartidos equitativamente. Se ha reportado que las crías de compiten por los sitios térmicamente ventajosos dentro del agrupamiento y estos están asociados a diferencias intracamada donde las crías centrales tienen temperatura corporal, conversión de leche a biomasa y ganancia de peso mayor que las crías periféricas. En este trabajo nosotros exploramos otras variables fisiológicas importantes. En este trabajo quisimos probar la hipótesis de que las crías periféricas muestran una mayor activación del tejido adiposo pardo, medido por la expresión de la proteína desacopladora 1 (UCP-1), que aquellas crías intermedias y centrales. Para evaluar esto nosotros trabajamos con nueve camadas en un contexto de baja temperatura ambiental. Cada día durante los primeros días postnatales de las crías, filmamos regularmente desde arriba a las camadas e identificamos a las crías centrales, intermedias y periféricas. En el día 4 postnatal se sacrificaron y se les extrajo el tejido adiposo pardo para posteriormente mediante inmunodetección en fase sólida (Western Blot) determinar la expresión de UCP-1 en cada una de las crías. Los resultados muestran que las crías centrales mantienen temperaturas corporales más altas, convierten mejor la leche a biomasa y ganan peso más eficientemente que las crías periféricas. Por el contrario, las crías centrales mostraron una menor expresión de UCP-1 respecto de las crías periféricas que mostraron una expresión de UCP-1 significativamente mayor que las crías centrales.

INDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	4
2.1 EL CONEJO COMO MODELO DE ESTUDIO	5
2.2 TERMORREGULACIÓN CONDUCTUAL EN CRÍAS DE CONEJO	6
2.3 MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE LA TERMORREGULACIÓN EN CRÍAS DE CONEJO	8
2.4 TEJIDO ADIPOSO PARDO (TAP)	9
2.4.1 MORFOLOGÍA DEL TAP	9
2.4.3 VASCULARIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO PARDO	10
2.4.4 INERVACIÓN DEL TAP	11
2.5 PROTEOMA DEL TAP	12
2.6 PROTEÍNA DESACOPLADORA UCP-1, UNA FACTOR ESENCIAL EN LA TERMORREGULACIÓN ADAPTATIVA.	13
2.7 MECANISMO FISIOLÓGICO DE LA TERMORREGULACIÓN EN EL TEJIDO ADIPOSO PARDO	15
2.8 ESTUDIOS RELACIONADOS A LA ACTIVACIÓN DEL TAP EN CRÍAS DE CONEJO	17
3 HIPÓTESIS	18
4 OBJETIVOS	20
5 METODOLOGIA	22
5.1 ANIMALES	23
5.2 PROCEDIMIENTO	23
5.3 ÍNDICE DE CONVERSIÓN DE LECHE A BIOMASA.....	25
5.4 SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DEL TAP	27
5.5 NÚMERO DE VECINOS.....	27
5.6 HOMOGENIZACIÓN DEL TAP Y PREPARACIÓN DE EXTRACTOS RICOS EN MITOCONDRIAS	28
5.7 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	28
5.8 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.....	29
5.9 INMUNODETECCIÓN EN FASE SÓLIDA (<i>WESTERN BLOT</i>).....	29
6 RESULTADOS	30

6.1 POSICIÓN DENTRO DE LA CAMADA.....	31
6.2 TEMPERATURA CORPORAL.....	32
6.2.1 PERDIDA DE TEMPERATURA CORPORAL POR DÍA.....	33
6.3 PESO AL NACIMIENTO.....	36
6.4 ÍNDICE DE CONVERSIÓN DE LECHE A BIOMASA.....	37
6.5 PESO ABSOLUTO.....	38
6.6 IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DESACOPLADOTA 1 (UCP-1) MEDIANTE INMUNODETECCIÓN EN FASE SÓLIDA (<i>WESTERN BLOT</i>).....	39
6.7 EXPRESIÓN DE UCP-1 EN TAP.....	39
7 DISCUSIÓN.....	41
8 CONCLUSIONES.....	46
9 PERSPECTIVAS.....	48
10 REFERENCIAS.....	50
11 ANEXOS.....	58

1 INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la homeostasis térmica es uno de los retos que enfrentan al nacimiento las crías de mamíferos altriciales. Un ejemplo de ello ocurre con las crías del conejo doméstico las cuales, a pesar de nacer desnudas, con sus capacidades vasomotoras limitadas y con un área de superficie expuesta a la pérdida del calor relativamente superior al volumen de su biomasa, tienen que mantener su temperatura corporal por sí mismas desde el momento del nacimiento ya que no son cobijadas por la madre. A diferencia de la mayoría de las madres de mamíferos altriciales, la coneja no cobija a sus crías y su papel en el mantenimiento de la temperatura corporal de su prole se restringe a la construcción de un nido aislante dentro de una madriguera de crianza. La coneja deja a sus crías una vez que la última cría fue expulsada en el parto y solo regresará a alimentarlas una vez al día, por un breve periodo de 3 a 4 min (Hudson R. y Distel H. 1982, González-Mariscal *et al.* 1996). Las crías del conejo, por lo tanto, tienen que enfrentar el reto de mantener su temperatura corporal prácticamente sin la participación de la madre. Para ello se valen de la presencia de sus hermanos en el nido con los cuáles, al agruparse, cada una de las crías participantes reduce significativamente su área expuesta a la pérdida de calor y obtienen beneficios en términos de crecimiento y mayores probabilidades de supervivencia (Bautista *et al.* 2003, Bautista *et al.* 2008, Rödel *et al.* 2008).

Sin embargo, los beneficios derivados de agruparse con los hermanos no son distribuidos equitativamente entre las crías del conejo. En estudios previos de nuestro laboratorio hemos reportado que, durante la crítica primera semana de vida postnatal, las crías más pesadas al nacimiento, tienen mayores probabilidades de ocupar los sitios térmicamente ventajosos dentro del agrupamiento, lo cual a su vez está relacionado con una mayor temperatura corporal, una mayor ingestión de leche, una mayor eficiencia para convertir la leche a biomasa y mayores probabilidades de supervivencia. Por otro lado, las crías más ligeras típicamente ocupan las posiciones menos aisladas dentro del agrupamiento, trabajan más para lograr aislamiento dentro de él y en general tienen valores significativamente menores en todas las variables mencionadas para sus hermanas pesadas (Bautista *et al.* 2008, Rödel *et al.* 2008). Estas diferencias intracamada en fisiología y conducta podrían a su vez estar

relacionadas con diferencias en el metabolismo del tejido adiposo pardo (TAP). Este órgano es fundamental para la termorregulación fisiológica de muchos mamíferos neonatos incluyendo al conejo. A esta edad el TAP es el único órgano termogénico con el que cuentan los neonatos y produce cantidades relativamente grandes de calor cuando las crías experimentan temperaturas ambientales debajo del límite inferior de su zona termoneutral (Rial y Gonzáles-Barroso 2007). En nuestro modelo se esperaría que las crías periféricas, las más ligeras de la camada, al estar más expuestas al aire frío por tener menos hermanos en contacto, mostraran mayor activación del TAP que sus hermanas centrales mejor aisladas. Este fue el objetivo de este proyecto. Específicamente quisimos probar la hipótesis de que las crías periféricas muestran una mayor activación del TAP, medida por la cantidad de proteína desacopladora 1 (UCP-1), en comparación con las crías intermedias y centrales.

2 ANTECEDENTES

2 ANTECEDENTES

2.1 El conejo como modelo de estudio

A pesar de que los hermanos forman una parte notable del ambiente en el que nacen, crecen y se desarrollan las crías de muchos mamíferos (Hudson 2005, Hudson y Trillmich 2006), existen pocos trabajos cuantitativos sobre las relaciones entre hermanos en esta taxon. Aún más escasa o probablemente nula (Hudson y Trillmich 2006) es la investigación de los mecanismos fisiológicos que subyacen a tales interacciones.

En los mamíferos es difícil estudiar las relaciones de competencia entre hermanos en la vida temprana, ya que la mayoría de ellos son nocturnos, paren a sus crías en madrigueras bien ocultas (Mock y Parker 1997), adicionalmente la madre muestra un intenso cuidado de las crías. Sin embargo, la forma doméstica del conejo europeo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*), es un modelo adecuado para tal propósito, particularmente por su limitada conducta maternal. En el laboratorio, las conejas muestran una conducta similar limitada de amamantamiento con la misma robustez que sus congéneres silvestres. Esto nos ha permitido, por un lado, observar y manipular a los gazapos sin alterar el sistema natural madre-cría en un grado prácticamente imposible para otras especies de mamíferos. Por otro lado, se puede separar la influencia de la madre de la influencia de los hermanos sobre el desarrollo de los individuos (Hudson y Distel 1986, Hudson 1998, Caldelas *et al.* 2005).

Tal limitado cuidado maternal enfrenta a las crías a diversos problemas, particularmente por su estado de inmadurez al nacer. Los gazapos nacen con los párpados y canales auditivos cerrados, con una pobre coordinación motora y en gran medida son ectotérmicos (Dawkins y Hull 1964, Hudson y Distel 1982). Aunque los gazapos al nacer no están totalmente desnudos, su pelo es muy fino y por lo tanto les provee un pobre aislamiento térmico (Hull 1965, Bautista *et al.*, 2003). Sin embargo, su peso aumenta rápidamente en los primeros diez días de vida, al mismo tiempo aumenta su aislamiento térmico por crecimiento de pelo y su volumen de masa en relación a su área de superficie corporal es menor (Hull 1965).

Dado el poco tiempo que la madre está en contacto con sus crías, junto con la incapacidad de éstas para mantener su temperatura corporal frente a temperaturas

ambientales bajas en sus primeros días de vida, es imperativo para su sobrevivencia tener la capacidad de moverse hacia las zonas cálidas del nido (Kleitman y Satinoff, 1981). Así, la mayor parte del tiempo en el nido las crías permanecen juntas y quietas bajo una cubierta aislante provista por pasto seco y pelo de la madre (Hudson y Distel, 1982). Jeddi (1971) encontró que en temperaturas ambientales cálidas, (37°, 40° y 42°C) las crías agrupadas tienden a dispersarse y estiran su cuerpo para facilitar la pérdida de calor, mientras que al ser expuestas a temperaturas ambientales frías (30°, 25°, 20°C) buscan agruparse.

Las crías del conejo, al nacimiento, tienen capacidades motoras superiores a las de crías de rata, ratón y hámster y pueden mostrar, aún pocos minutos después de nacidos, sensibilidad a cambios en los ambientes térmicos (Hull y Hull 1982, Pacheco-Cobos *et al.* 2003). Es probable que usando esta capacidad para detectar las diferencias en la temperatura, las crías mantengan su temperatura corporal al situarse en diferentes lugares dentro del agrupamiento, incrementando así su eficiencia termorregulatoria y sus probabilidades de sobrevivencia (Bautista *et al.* 2003). Esta propuesta encuentra apoyo en el hecho de que los gazapos criados en aislamiento a bajas temperaturas, muestran tasas más bajas de sobrevivencia y crecimiento que gazapos criados con un hermano; y pares de hermanos muestran tasas de crecimiento más bajas que varios hermanos criados juntos. Tales efectos son particularmente evidentes durante la primera semana postnatal (Bautista *et al.* 2003, Gilbert 2007). Al nacer dentro de una camada las crías del conejo se enfrentan a diversos retos (Hudson *et al.* 2002) uno de los más importantes es obtener una posición adecuada dentro del agrupamiento para mantener la temperatura corporal (Bautista *et al.* 2005b, Bautista *et al.* 2008).

2.2 Termorregulación conductual en crías de conejo

Muchos mamíferos se agrupan para mantenerse calientes, de esta forma reducen la superficie expuesta disminuyendo el estrés por frío como los requerimientos metabólicos para la producción de calor (Schmidt-Nielsen 1997). Se ha observado que desde el nacimiento las crías muestran una habilidad bien desarrollada para orientarse sobre gradientes térmicos en donde rápidamente localizan su zona termoneutral (Jeddi 1971, Satinoff *et al.* 1976, Pacheco-Cobos 2003). Es probable que usando esta capacidad para

detectar las diferencias en la temperatura, las crías mantengan su temperatura corporal al situarse en diferentes lugares dentro del agrupamiento, incrementando así su eficiencia termorregulatoria y sus probabilidades de sobrevivencia (Bautista *et al.* 2003). Esta propuesta encuentra apoyo en el hecho de que los gazapos criados en aislamiento a bajas temperaturas, muestran tasas más bajas de sobrevivencia y crecimiento que gazapos criados con un hermano; y pares de hermanos muestran tasas de crecimiento más bajas que varios hermanos criados juntos. Tales efectos son particularmente evidentes durante la primera semana postnatal (Bautista *et al.* 2003, Gilbert 2007).

Las crías del conejo se desarrollan en un nido aislado dentro de la madriguera de crianza, el cual las protege de las bajas temperaturas ambientales (González-Mariscal y Rosenblat 1996); así, la mayor parte del tiempo las crías permanecen agrupadas bajo una cubierta aislante provista por pasto seco y pelo de la madre (Hudson y Distel 1982). En trabajos de nuestro laboratorio se ha reportado que existe competencia entre las crías por sitios térmicamente ventajosos dentro del agrupamiento. En camadas expuestas a bajas temperaturas ambientales se demostró que tener acceso y mantener una posición crítica en el agrupamiento es un proceso competido de empujar, en el cual las crías más grandes son más exitosas que sus hermanos pequeños. Esto se logra mediante diferentes desplazamientos denominados “rooting” y “trepar”, el primero consiste en que la cría empuja su cabeza hacia delante entre sus hermanas mientras vigorosamente se impulsa con las cuatro patas, el segundo se refiere a la acción de colocar las patas delanteras sobre sus hermanas al mismo tiempo que se impulsa con sus patas traseras para pasar por encima de las crías. Esta última es una estrategia empleada con mayor frecuencia por las crías ligeras de cada camada. También se encontró que durante los primeros días de vida postnatal las crías se pueden categorizar en periféricas, intermedias y centrales de acuerdo al grado de aislamiento que lograron dentro del agrupamiento. Dichas categorías están asociadas con variables fisiológicas como la temperatura corporal, conversión de leche a biomasa y crecimiento, siendo las crías centrales quienes obtienen los valores más altos de tales variables en comparación a la crías periféricas (Bautista *et al.* 2008; Rödel *et al.* 2009). Es probable que las desventajas en el crecimiento de las crías periféricas, que enfrentan un mayor reto termorregulatorio por estar más expuestos a una pérdida de calor, sean explicadas en parte en términos de un mayor gasto energético como resultado de la termogénesis sin temblor del TAP.

2.3 Mecanismos fisiológicos de la termorregulación en crías de conejo

En los conejos recién nacidos, la termorregulación fisiológica se lleva a cabo principalmente en el tejido adiposo pardo (TAP) donde se produce calor (Figura 1) en respuesta a la exposición del frío (Hull y Segall 1965a). La termogénesis en la grasa parda es activada por el sistema nervioso simpático mediante la liberación de noradrenalina, la cual se une a receptores en las células del tejido adiposo pardo (Hull y Segall 1965b). La liberación de noradrenalina de las terminales celulares de los ganglios simpáticos inerva receptores β_3 adrenérgicos en los adipositos pardos, aumentando la actividad de la lipasa, que determina el monto de ácidos grasos libres disponibles en el citoplasma para la oxidación mitocondrial, el efecto de este incremento de ácidos grasos libres en la mitocondria ocasionará que aumente la transcripción de proteína desacopladora-1 (Morrison 2004). La proteína desacopladora-1 o termogenina se encuentra en la membrana mitocondrial interna y actúa como un canal de protones para disipar el gradiente de protones y en consecuencia liberar la energía en forma de calor. Este calor recién producido se distribuye rápidamente a otras partes del cuerpo mediante la circulación sanguínea gracias a la gran vascularización de este tejido (Eckert *et al.* 1997).

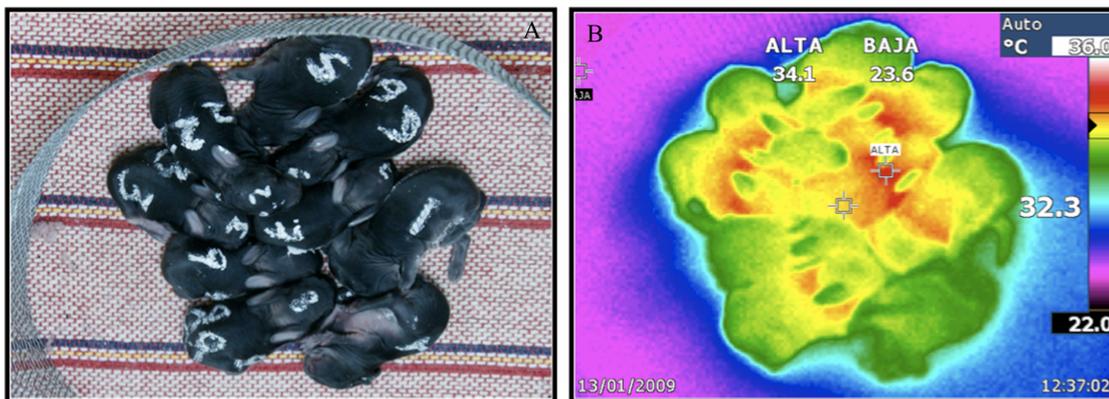


Figura 1. A) Agrupamiento de crías de 4 días de edad dentro de una caja-nido expuestas a 22 °C. B) Imagen termográfica de las mismas crías en donde se muestra el gradiente térmico dentro del agrupamiento (la temperatura más alta, de color rojo, se localiza en el sitio en donde está localizado el TAP, 34.1°C).

2.4 Tejido adiposo pardo (TAP)

2.4.1 Morfología del TAP

El tejido adiposo pardo representa del tres al cinco por ciento del peso corporal del conejo recién nacido y está situado principalmente alrededor del cuello y entre las escápulas (Hull y Segall 1965a). También hay pequeños depósitos en las axilas, pecho y alrededor de los riñones. El TAP alrededor del cuello está dividido en cuatro lóbulos (anterior, superior, lateral y posterior cervical) y el interescapular consta de dos almohadillas (Hull y Segall 1965a, Figura 2).

El peso del TAP en el conejo recién nacido varía de 50-60 g, representando un 5.5% de su peso corporal (Hull y Segall 1965a). La mayoría de la grasa parda aparece durante la última semana de gestación (Dawkins y Hull 1964). Posteriormente, una semana del nacimiento, el TAP es gradualmente remplazado por tejido adiposo blanco en un periodo de tres meses aproximadamente (Dawkins y Hull 1964). Hull y Segal (1965a) han reportado que el TAP disminuye significativamente durante los primeros 3 días de vida, así como su contenido de grasa.

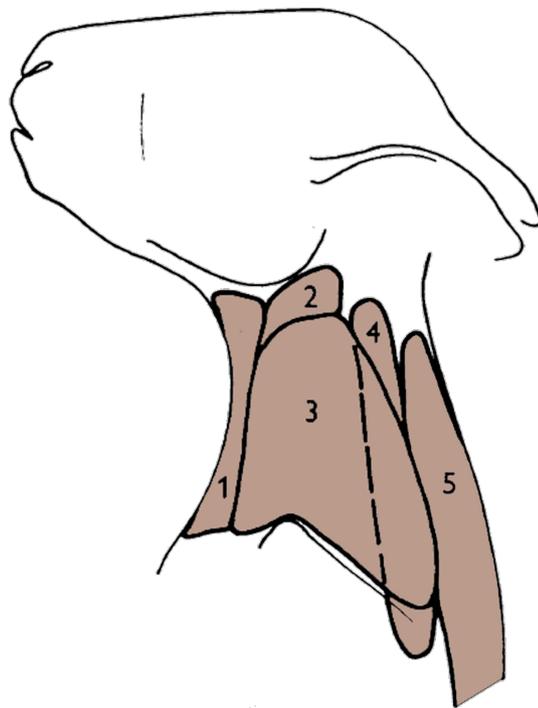


Figura 2. Principales zonas en que se localiza el tejido adiposo pardo en conejos neonatos: 1- lóbulo cervical anterior; 2- lóbulo cervical superior; 3- lóbulo cervical lateral; 4- lóbulo cervical posterior; 5- almohadilla interescapular. (Modificado de Hull y Segal, 1965a).

2.4.2 Células adiposas pardas. Varios estudios han descrito que el tejido adiposo pardo esta conformado de células denominadas adipocitos pardos (células multiculares). Los adipocitos pardos contienen una gran cantidad de grasa en forma de vacuolas y un núcleo excéntrico que no está aplanado como en los adipocitos blancos. La coloración parda se debe a que los adipocitos pardos cuentan con abundantes mitocondrias. Una característica de dichas mitocondrias es que cuenta con un elevado contenido en proteína desacopladora uno (UCP-1), fundamental en la termorregulación en crías altriciales (Klingspor 2010, Morrison 2004, Mozo *et al.* 2005, Ross *et al.* 2005, Rial *et al.* 2007), en comparación con los adipocitos blanco que son células que solo contienen una vacuola, un bajo número de mitocondrias y no contienen UCP-1 (Figura 3).

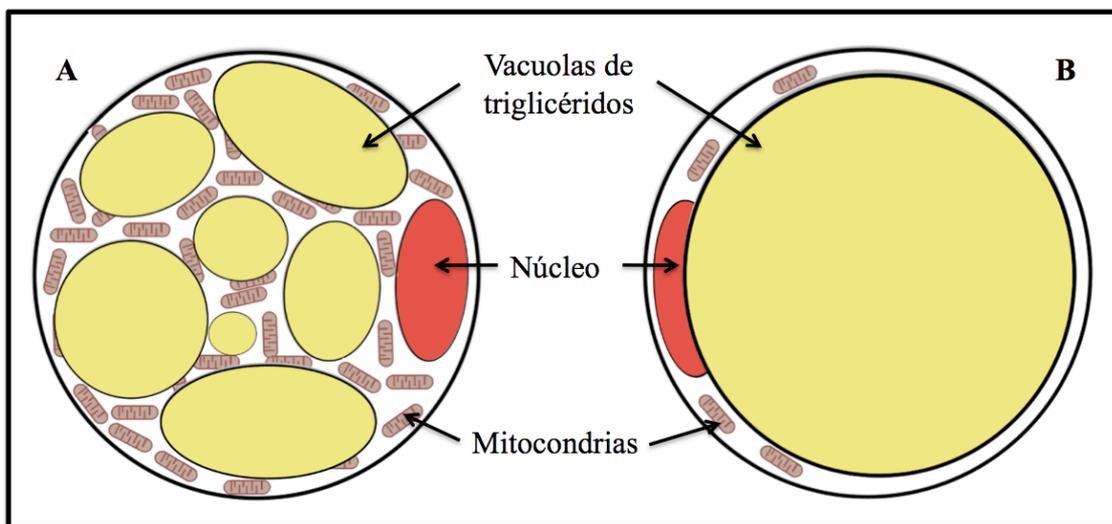


Figura 3. Células adiposas: A) adipocito pardo localizado en el tejido adiposo pardo, presenta varias vacuolas de triglicéridos, así como, un número elevado de mitocondrias. B) Adipocito blanco localizado en el tejido adiposo blanco, solo presenta una vacuola de triglicérido y un número bajo de mitocondrias.

2.4.3 Vascularización del tejido adiposo pardo

El suministro de sangre del tejido adiposo pardo (TAP) es a través de diferentes ramificaciones arteriales. Las ramificaciones de la arteria carótida común suministran el extremo cefálico del lóbulo anterior, el conjunto del lóbulo superior, el extremo cefálico del lóbulo posterior y el ápice del lóbulo lateral triangular. La masa del lóbulo lateral es suministrada por una arteria grande que se presenta de la arteria subclavia. Las ramificaciones de esta arteria también pasan a través del lóbulo lateral al lóbulo posterior

(Hull y Segal 1965a). El extremo caudal del lóbulo posterior es suministrado por una ramificación de la arteria axilar. El TAP axilar es suministrado por esta ramificación pronto después de que salga del buque principal. El extremo cefálico de la almohadilla interescapular es suministrado por una ramificación de la arteria carótida común la cuál pasa alrededor de la base del cráneo y corre caudalmente para entrar por su superficie. El extremo caudal de la almohadilla es suministrado por una ramificación de la arteria axilar que pasa alrededor de la pared de pecho y a través del borde más bajo del omóplato antes de entrar en la almohadilla en su superficie. (Figura 4. Hull y Segal 1965a).

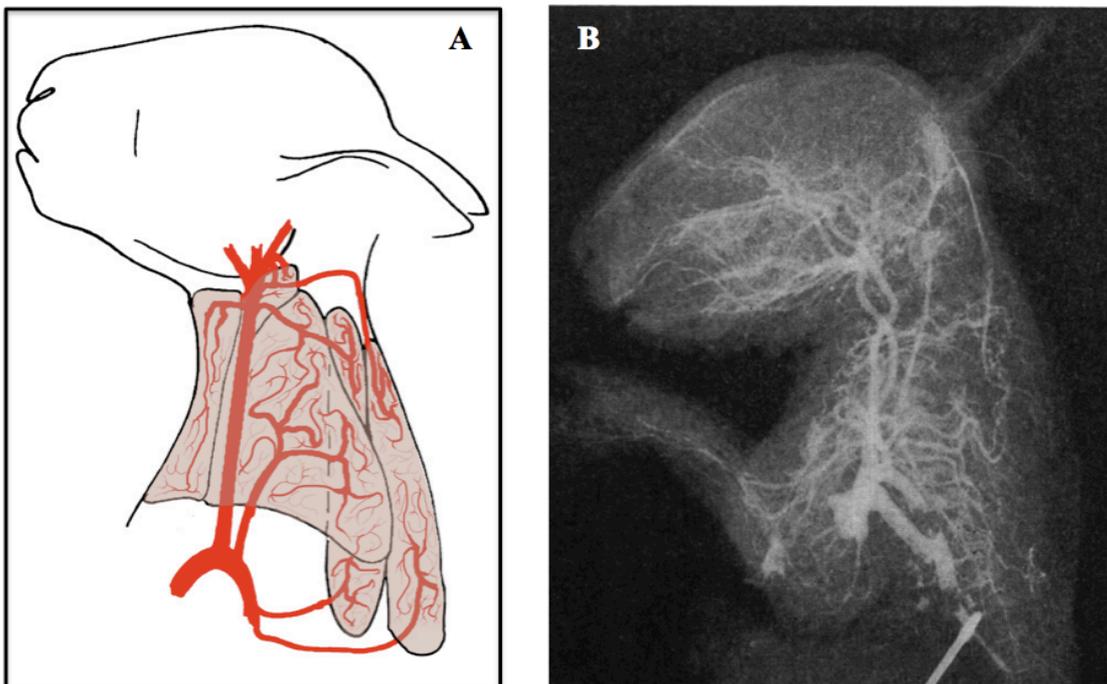


Figura 4. Irrigación del TAP: A) Esquema que muestra la irrigación del TAP, B) Fotografía de rayos-X de un conejo recién nacido después de la inyección de la aorta torácica con una solución de contraste donde se observa las arterias que inervan el TAP. (Modificado de Hull y Segal 1965a).

2.4.4 Inervación del TAP

En crías de conejo recién nacido se ha reportado que los nervios simpáticos están distribuidos en el TAP cervical a lo largo de las arterias y algunas ramificaciones del ganglio radiado que van junto a la arteria subclaviana. Mientras que el tejido adiposo pardo interescapular está inervado en la parte superior por los nervios espinales torácicos (Hull y Segal 1965b).

La denervación simpática sobre el vaciado de grasa del TAP en el conejo recién nacido se observaron que la escisión del ganglio estrellado retarda el vaciado de grasa que normalmente ocurre en el tejido cuando el animal es expuesto al frío. A temperatura ambiente 35-37°C el análisis del TAP cervical mostró un color entre amarillo y rojo. Las secciones histológicas mostraron que las células estaban moderadamente repletas con vacuolas de grasa. Cuando el nervio cervical fue cortado en un lado del tejido (lado denervado), el lóbulo anterior, lóbulo superior, la mitad cefálica del lóbulo posterior y el extremo cefálico del lóbulo lateral presentaban un color amarillo. En el lado innervado el TAP cervical presentó un color rojo-café y las células parecían parcial o completamente vacías de grasa. Además, se removió el ganglio estrellado derecho y se observó que el TAP cervical entero estaba amarillo y las células estaban repletas de grasa, mientras que el lado innervado el TAP cervical era de color rojo-café y las células estaban parcial o completamente vacías de grasa (Hull y Segal 1965b). Al denervar las almohadillas del TAP interescapular se encontró retención de grasa en la almohadilla denervada. Cuando el ganglio estrellado fue removido en un lado de la mitad cefálica de la almohadilla interescapular, ésta se mostró más amarilla que la del lado innervado y hubo retención de grasa.

En algunos conejos la sección del nervio simpático cervical no tuvo efecto sobre el vaciado de grasa del tejido interescapular. Estos resultados demuestran que el vaciado de grasa del TAP cervical en el conejo recién nacido es retardado por denervación simpática. Esto concluye de que el sistema nervioso simpático tiene un papel importante en la regulación de la termogénesis sin temblor en mamíferos recién nacidos (Hull y Segal 1965b).

2.5 Proteoma del TAP

La determinación del proteoma mitocondrial es una tarea desafiadora, que es más difícil por el hecho de que las mitocondrias tienen proteomas versátiles adaptados específicamente a los requisitos celulares y del tejido diversos. El término “proteoma” podemos definirlo como el conjunto de proteínas presentes en una célula, tejido, órgano, en un estado de diferenciación y desarrollo y en condiciones ambientales determinadas (Forner *et al.* 2009). En nuestro laboratorio, en una primera parte de nuestro estudio se hizo un ensayo de electroforesis con gel de poliacrilamida SDS, donde se corrieron tres

muestras de tejido adiposo pardo de crías (crías centrales, intermedias y periféricas esto es según el lugar que ocuparon dentro de la camada) de una misma camada. En dicho gel se observaron aparentes diferencias en el proteoma de cada una de las muestras, asociadas con su posición dentro de la camada (Figura 5).

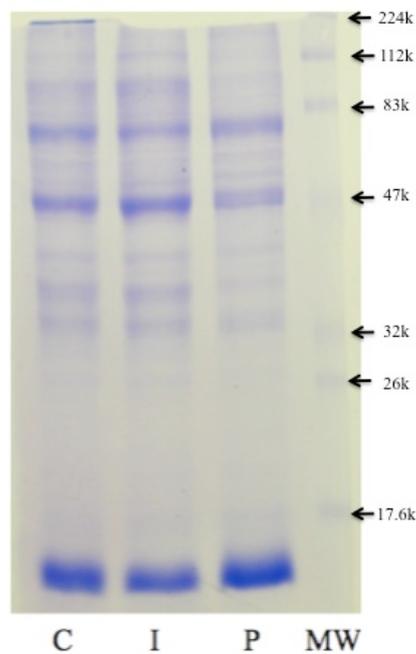


Figura 5. Proteoma del TAP de 50 μ g de proteína total extraída de crías de 4 días de edad. Cría central (C), una intermedia (I), una periférica (P) y marcados de peso molecular (MW).

2.6 Proteína desacopladora UCP-1, una factor esencial en la termorregulación adaptativa.

Las proteínas desacopladoras mitocondriales (UCPs) pertenecen a la súper familia de transportadores de aniones localizados en la membrana mitocondrial interna. En esta súper familia también se incluyen otros transportadores como la adenina nucleótido translocasa (ANT), el transportador de fosfato inorgánico, el de citrato y el de 2-oxoglutarato/malato. El tejido adiposo pardo es un órgano termogénico y la proteína desacopladora 1 (UCP-1) la clave de su gran capacidad para producir calor. La proteína responsable de la actividad desacoplante fue identificada en 1976 por Ricquier y Kader. Su peso molecular varía entre 32 y 33 kDa entre las diferentes especies (Freeman *et al.* 1985). Se describió que la UCP-1 se marcaba con [32P]-azido-ATP desde la cara citosólica y cuya unión podía desplazarse con el guanósín difosfato (GDP) pero era insensible a atractilato (Heaton *et al.* 1978). En

1976 Ricquier y colaboradores habían descrito que una banda proteica de 32 kDa aumentaba de modo muy notable en mitocondrias de tejido adiposo pardo de ratas que habían sido expuestas al frío (Ricquier y Kader 1976). Durante dos décadas se consideró a la UCP-1 como una proteína singular sólo presente en un tejido altamente especializado (en el TAP) que es exclusivo de mamíferos. En 2000, Ricquier y su grupo identificaron una proteína que mostraba un 59% de identidad con la UCP-1 y que se denominó UCP-2 (Seldin *et al.* 1997). En contraste con la UCP-1, la UCP-2 muestra un patrón de expresión que la hace prácticamente ubicua (tejido adiposo blanco y cerebro, músculo, macrófagos, células β -pancreáticas, estómago, intestino). Con pocos meses de diferencia se describió una nueva proteína homóloga, la UCP-3, que presentaba un 54-57% de identidad con UCP-1 y 73% con la UCP-2 (Boss *et al.* 1997). Esta proteína se expresa casi exclusivamente en músculo esquelético. Otras dos proteínas, UCP-4 y BMCP1, fueron descritas poco después aunque evolutivamente se encuentran mucho más distantes.

La proteína desacopladora 1 (UCP-1) o termogenina se expresa exclusivamente en tejido adiposo pardo donde juega un papel esencial en la termogénesis sin temblor (Ribeiro *et al.* 2001, Cannon y Nedergaard 2004, Mozo *et al.* 2005, Ross *et al.* 2005, Zaninovich 2005, Berg *et al.* 2006, Rial y González-Barroso 2007). La UCP-1 desacopla la respiración de la fosforilación oxidativa disipando el gradiente de protones generado por el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria, esta conlleva una aceleración del flujo electrónico con la consiguiente generación de calor (Nicholls y Locke 1984, Argyropoulos y Harper 2002, Mozo *et al.* 2005, Ross *et al.* 2005, Rial y González-Barroso 2007). Esta actividad está regulada por la presencia de ácidos grasos, ya que en estudios *in vivo*, el ATP citosólico se une a la UCP-1 desde la cara matricial de la proteína y su función fisiológica es, por tanto, mantener la proteína inhibida en condiciones no termogénicas (Nicholls y Rial 1999, Klingenberg *et al.* 2001). Existen dos modelos que tratan de explicar el mecanismo mediante el cual los ácidos grasos activan el desacoplamiento mediado por UCP-1. En primer lugar, un modelo considera que los ácidos grasos actúan como grupos prostéticos de la proteína. El canal proteico permitiría el paso de H⁺ gracias a la presencia de aminoácidos tamponadores que aceptarían y donarían los H⁺ secuencialmente, conduciéndolos a través de la membrana. Los ácidos grasos actuarían como donadores de protones a dichos aminoácidos tamponadores (Klingenberg y Huang 1999). En el segundo modelo lugar, la UCP-1 transportaría a los propios ácidos grasos al

exterior de la matriz. Los ácidos grasos pueden difundir a través de la membrana en su forma protonada mediante un proceso de *flip-flop*. Una vez en la matriz, y dado el elevado pH intramitocondrial, el H⁺ es liberado, disipando el gradiente electroquímico. La forma aniónica del ácido graso no puede atravesar la membrana libremente, pero lo hace a través de UCP-1. Una vez fuera de la matriz, podría unirse de nuevo a un protón volviendo a iniciar el ciclo (Garlid *et al.* 1998). Existen datos a favor y en contra de ambos modelos, por lo que el mecanismo exacto de transporte a través de UCP-1, es todavía hoy motivo de debate (Echtay *et al.* 2000, Klingenberg y Huang 1999, Rial *et al.* 2004, Skulachev 1991). En numerosos modelos se ha observado la capacidad de UCP-1 de translocar ácidos grasos a través de la membrana (Garlid *et al.* 1998, Jezek y Garlid 1990). UCP-1 podría también tener un comportamiento dual según la concentración de H⁺, teniendo una actividad de transporte protónico basal, y comportándose como transportador de ácidos grasos, únicamente cuando éstos se encuentren en elevadas concentraciones (Ricquier y Bouillaud 2000).

2.7 Mecanismo fisiológico de la termorregulación en el tejido adiposo pardo

La regulación fisiológica de la termogénesis en el tejido adiposo pardo está bien establecida a nivel celular (Fig. 6). El núcleo ventromedial del hipotálamo envía la señal de inicio de la termogénesis a través del sistema nervioso simpático (Klingespor 2010, Cannon y Nedergaard 2004, Rial *et al.* 2007). La noradrenalina, liberada por las numerosas fibras simpáticas que inervan el tejido adiposo pardo, se une a los receptores adrenérgicos β_3 de los adipocitos activando la adenilato ciclasa y causando un aumento de los niveles citoplásmicos de cAMP (Klingespor 2003, Cannon y Nedergaard 2004, Mozo *et al.* 2005, Rial *et al.* 2007). Este aumento de cAMP desencadena una cascada lipolítica al activarse una lipasa sensible a hormonas que moviliza las reservas de triglicéridos y por otro lado el aumento la transcripción de los genes UCP-1 es estimulada en 15 minutos con la exposición al frío o con la administración de noradrenalina (Bouillaud *et al.* 1984, Ricquier *et al.* 1984, 1986, Silva 1995). Los ácidos grasos liberados van a jugar un doble papel. Por un lado van a ser el sustrato que será oxidado en las mitocondrias y la energía disponible tras estos procesos de óxido-reducción es utilizada para bombear protones fuera de la matriz generándose, formando, un gradiente de potencial electroquímico de protones (

Klingspor 2010, Cannon y Nedergaard 2004, Mozo *et al.* 2005, Rial *et al.* 2007). Por otra parte los ácidos grasos actúan sobre la UCP-1 activando el transporte de protones que permite que los protones vuelvan a la matriz sin que haya síntesis de ATP (Klingspor 2010, Morrison 2004, Mozo *et al.* 2005, Rial *et al.* 2007). Se acelera la respiración y por tanto, se disipa la energía del gradiente de protones en forma de calor. (Nicholl y Locke 1984 y Rial y Gonzáles-Barroso 2001, Klingspor 2010, Cannon y Nedergaard 2004, Morrison 2004, Rial y Gonzáles-Barroso 2007).

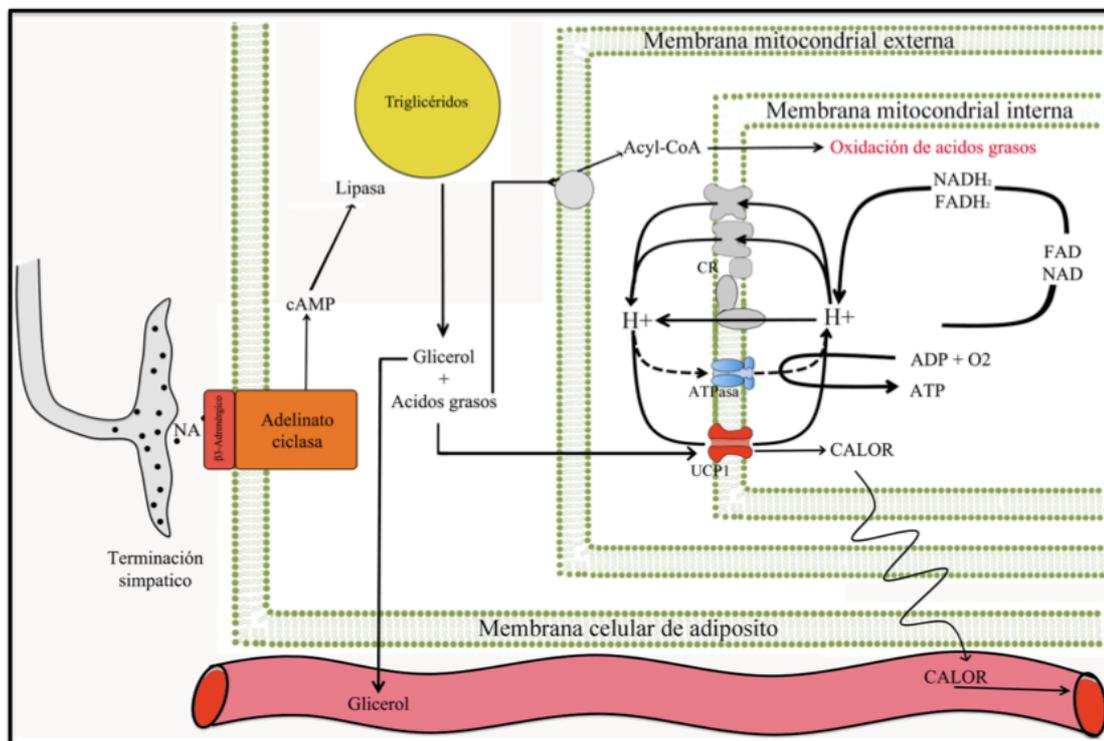


Figura 6. Regulación de la termogénesis en el tejido adiposo pardo. La noradrenalina (NA) liberada por las terminales nerviosas simpáticas se une a un receptor β_3 -adrenérgico y desencadena una cascada lipolítica en las que se movilizan las reservas de triglicéridos. Los ácidos grasos liberados son oxidados en la mitocondria. Los ácidos grasos activan la UCP-1 aumentando su conductancia a los protones. Este desacoplamiento de la fosforilación oxidativa hace que se acelere la respiración y que la energía del gradiente de protones se libere en forma de calor (Modificado de Power [1989] y Himms-Hagen [1990]).

2.8 Estudios relacionados a la activación del TAP en crías de conejo

Se ha reportado que al ligar la arteria carótida común, el TAP cervical entero presenta un color rojo-café y las células están parcial o completamente vacías de grasa (Hull y Segal 1965b). No se conocen las características histológicas detalladas del TAP en crías del conejo cuando se liga la arteria carótida común y las crías son expuestas a temperaturas frías. Tampoco se ha descrito histológicamente el TAP cuando se corta la irrigación de este tejido sometiendo a las crías a temperaturas por debajo su zona termoneutral.

En otros estudios, se ha reportado en crías de conejos que fueron estimuladas con frío o la infusión de noradrenalina (estímulos que generan la producción de calor local en el TAP) mostraron un incremento en el consumo de oxígeno y una producción de calor local en el TAP. Además, se observa un pequeño aumento en los ácidos grasos libres y glicerol en plasma (Dawkins y Hull 1964). Pero cuando el TAP interescapular y el cervical son removidos, la respuesta al frío y a la infusión de noradrenalina disminuye drásticamente (Hull y Segal 1965a). Por lo que concluyeron que el TAP en el conejo recién nacido es necesario para incrementar el consumo de oxígeno que ocurre durante la exposición al frío, porque es el principal sitio de producción de calor (Hull y Segal 1965b)

Sin embargo, no existen estudios que describan la actividad de la UCP1 en el TAP en crías de conejo. En el presente estudio queremos determinar en crías del conejo doméstico si el resultado de la competencia por sitios térmicamente ventajosos dentro del agrupamiento (proceso que define las categorías de crías periféricas, intermedias y centrales) está asociado con posibles diferencias en la activación en el TAP (medido a través de la expresión de UCP-1). Es posible que las crías que ocupan las posiciones periféricas dentro del agrupamiento experimenten temperaturas ambientales más bajas que las crías centrales. Lo cual, podría influir en diferencias en la actividad del TAP. Por ello, este trabajo contribuiría con evidencia importante sobre el papel de los hermanos en moldear las diferencias individuales en la activación del TAP.

3 HIPÓTESIS

3 HIPOTESIS

La posición (central, intermedia y periférica) de las crías del conejo dentro del agrupamiento en el nido está asociada con diferencias en la actividad de su tejido adiposo pardo (medido a través de la expresión de la UCP-1).

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si hay diferencias en la cantidad de proteína desacopladora-1 en el tejido adiposo pardo de crías centrales, intermedias y periféricas y si estas diferencias están asociadas con la temperatura corporal, índice de conversión de leche a biomasa y peso corporal.

Objetivo específico

1. Determinar por camada crías centrales, intermedias y periféricas, así como, temperatura corporal, índice de conversión de leche a biomasa y peso corporal.
2. Cuantificar la cantidad de proteína desacopladora-1 en crías centrales, intermedias y periféricas de conejos de conejo de cuatro días de edad.

5 METODOLOGIA

5 METODOLOGÍA

5.1 Animales

Se utilizaron nueve camadas (se estandarizaron a 8 crías por camada) que se obtuvieron de diferentes conejas adultas multíparas (*Oryctulagus cuniculus*) de la raza chinchilla del bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Las conejas fueron mantenidas en jaulas de acero inoxidable de 90 x 60 x 40 cm, bajo un ciclo luz: oscuridad 16:8 correspondiente a las condiciones de la estación reproductiva para esta especie en Europa. Se les proporcionó agua y alimento (Purina) *ad libitum*. Para el apareamiento, las hembras fueron introducidas en una arena de malla metálica de 1m de diámetro con un macho semental de la misma raza. Tres días antes del parto se introdujo a la jaula de la madre una caja de madera de 40 x 35 x 15 con un corte en forma de semicírculo en uno de los costados para facilitar la entrada y salida de la coneja en el momento del amamantamiento, dicha caja se lleno de paja para permitir que la coneja construyera su nido.

5.2 Procedimiento

Día 0: Se refiere al día del parto. Después del nacimiento se retira la caja nido de la jaula de la madre y a cada cría se le asigna un número al azar que se escribe en su vientre con marcador indeleble para su identificación individual, se registra su peso con una balanza analítica y se regresa a la jaula de su madre.

Día 1: A las 9 am se retira la caja nido de la jaula de la madre. Se retira el pelo y paja y se cubre el piso de la caja con una franela para facilitar la observación conductual (agrupamiento de las crías). Dentro de esta caja se introduce un aro de malla metálica de 28 cm de diámetro para mantener a las crías en el centro y evitar que ganen aislamiento colocándose contra las esquinas (Figura 7).

Antes de cualquier manipulación de las crías se registra su temperatura con un termómetro de mercurio de lectura rápida (Schultheis, Millar y Weber T-6000) siguiendo un esquema aleatorio elaborado previamente (Bautista *et al*, 2008), este registro se hace en cuello e ingle debido a que estos puntos son un parámetro adecuado para conocer la temperatura corporal más alta y baja del cuerpo de las crías (Blumberg y Sokoloff 2003, 2008).



Figura 7. Caja nido experimental con piso forrado y el cilindro que contuvo a la camada.

Posteriormente, cada cría se pesó en una balanza analítica y se le pintó su número sobre el vientre, espalda, cabeza con un corrector líquido blanco (Pelikan). La caja se instaló dentro de un cuarto frío de 3 x 3 x 4m donde la temperatura permanece constante a 25°. Esta temperatura (por debajo de su zona termoneutral) induce el agrupamiento sin comprometer la sobrevivencia de las crías (Bautista *et al.* 2005, 2007, 2009, Rödel *et al.* 2008). Para evitar que las crías se estresen cada vez que el ventilador se enciende, la caja permanece dentro de un cubo de acrílico transparente de 45 x 45 x 70cm (altura). En el techo del cubo se encuentra, fija a un soporte, una cámara de circuito cerrado (SMC Networks) que envía las imágenes a una computadora ubicada fuera del cuarto frío (Figura 8).

Una vez que la camada estuvo dentro del cubo de acrílico se filmaron 5 sesiones de 15 minutos cada una, durante el día a las 9:45, 11:45, 13:45, 15:45 y 17:45 hrs. y 5 sesiones por la noche a las 21:45, 23:45, 1:45, 3:45 y 5:45 hrs. Se registró la temperatura corporal en el cuello e ingle de cada cría a las 10:00, 14:30, 16:30 y 18:00 hrs. La temperatura del cuarto frío se modificó disminuyendo un grado cada día para ajustarse al crecimiento y desarrollo de las crías, este cambio se realiza diariamente a las 19:30 hrs.

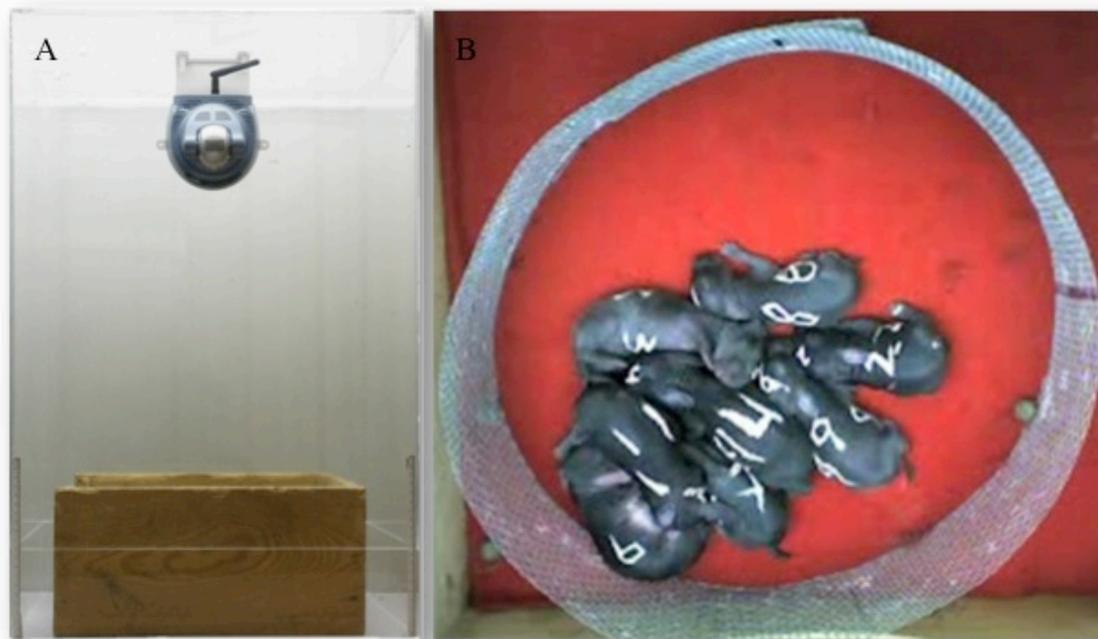


Figura 8. A) Cubo de acrílico transparente con una videocámara conectada a una computadora para el registro de los videos y caja nido. B) Imagen de la camada tomada por la cámara de video (SMC).

Día 2 al 4: A las 10:00 se registró la temperatura corporal de cada cría y se filmó con el mismo horario del día 1. A las 11:30 se indujo la micción presionando suavemente la vejiga entre los dedos pulgar e índice, debido a que los gazapos normalmente orinan en el momento de la succión. Esto permitió tener una medida exacta de la cantidad de leche que ingieren, posteriormente se pesaron y se regresaron a la caja experimental. A las 12:00 se retiró el aro metálico sin perturbar a la camada y se colocó y a la madre al lado de la caja para que ingresara e iniciara el amamantamiento. Cuando la coneja salió de la caja fue llevada nuevamente al bioterio. Se introdujo el aro metálico y cada cría fue pesada nuevamente (Figura 9).

5.3 Índice de conversión de leche a biomasa

La ingestión diaria de leche se calcula sustrayendo el peso de cada cría antes del amamantamiento de su peso post-amamantamiento. La eficiencia de las crías para convertir la leche a biomasa fue estimada usando un índice de eficiencia de conversión de leche (IC) para la leche ingerida durante t días: $C_t = \text{aumento en peso (pre-amamantamiento) durante } t + 1 \text{ días} / \text{peso de la leche ingerida durante } t \text{ días}$ (Drummond et al. 2000, Bautista et al. 2003, 2008).

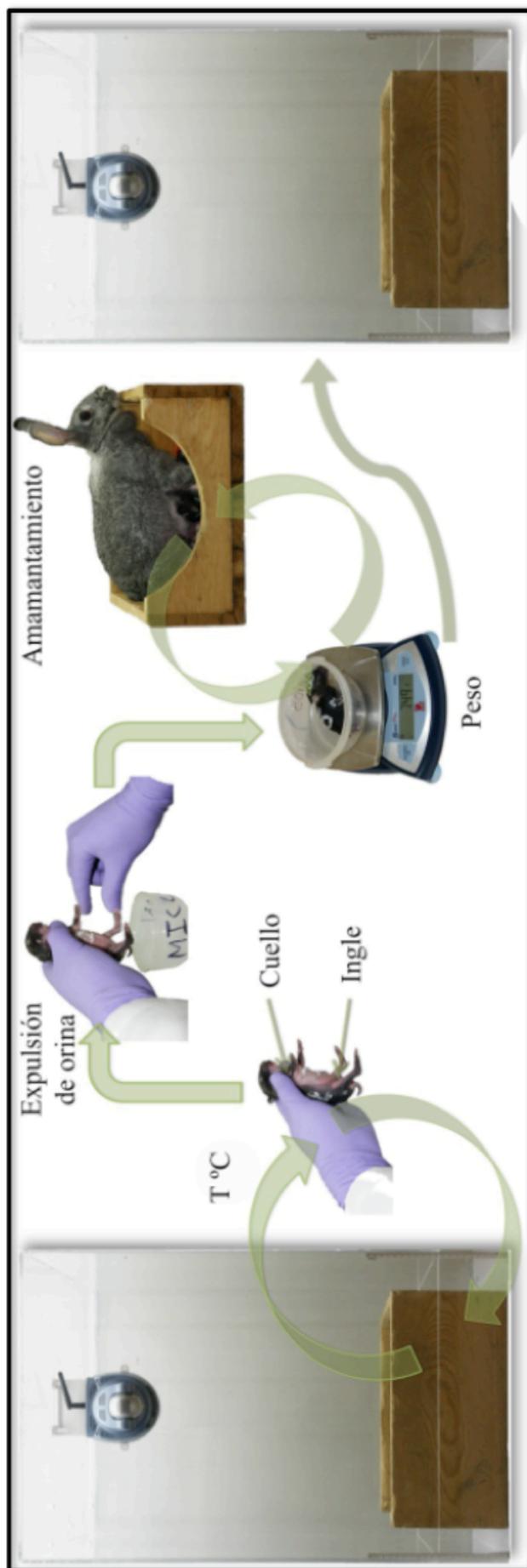


Figura 9. Procedimiento de toma de datos de las crías del día 2 al 4: toma de temperatura corporal ($T^{\circ}C$) en el cuello e ingule, expulsión de orina, peso antes y después del amamantamiento y se regresan las crías a la caja nido.

5.4 Sacrificio y extracción del TAP

Este procedimiento se realizó dentro de un cuarto frío a 22°C a las 16 horas del día cuatro de edad postnatal de las crías. Se tomó a una cría (de acuerdo a un orden aleatorio establecido previamente) e inmediatamente fue decapitada con una guillotina. Se retiró la piel del cuello y entre las escápulas. Se extrajo el TAP que se encuentra debajo de las escápulas y alrededor del cuello. El TAP fue almacenado en dos tubos eppendorf los cuales fueron congelados inmediatamente a -80°C aproximadamente en una solución de acetona con hilo seco. El tiempo aproximado requerido para este procedimiento (desde el sacrificio hasta que se congela el BAT) fue de seis minutos. El TAP fue almacenado en un congelador (REVCO) a -29°C para su uso posterior.

5.5 Número de vecinos

Se establecieron las crías focales al determinar que cría ocupó más tiempo en la posición central, periférica e intermedia. Se examinaron 4 cuadros de cada video, en el momento 0, es decir al iniciar la filmación, a los 5, 10 y 15 minutos de grabación y fue estudiada cada foto para determinar la posición de cada cría. Esto fue logrado contando el número de gazapos que estuvieron en contacto con alguna parte del cuerpo de cada cría (excepto orejas, patas y cola). Este número de vecinos fue una medida de la posición relativa de cada cría dentro del agrupamiento y se correlaciona con la ingestión de leche, crecimiento, supervivencia, temperatura corporal y eficiencia para convertir leche a masa corporal (Bautista *et al.* 2008, 2010, Rödel *et al.* 2008)

5.6 Homogenización del TAP y preparación de extractos ricos en mitocondrias

El TAP fue homogenizado manualmente con un homogenizador de tipo Potter-elvehjem. Se homogenizaron de 2.5g a 3.5g de TAP en 1 ml de buffer de TES (Tris 200 mM pH 7.5, EDTA 50 mM, 10% sucrosa, 1X PIC, 1 mM PMSF y 1 mM DTT) durante 3-5 minutos hasta que la muestra estuviera completamente homogenizada. Posteriormente el homogenizado se vertió en un tubo tipo eppendorf, el cual fue colocado en un agitador de tipo Mini LabRoller Rotator (Labnet) durante 1 hora y después se centrifugó a 800 x g por 20 minutos. Luego se extrajo el sobrenadante y se centrifugó a 10,000 x g por 15 minutos. Con este procedimiento se obtuvo un precipitado enriquecido en mitocondrias que se resuspendió en 70 μ L de buffer de TES. Todo el procedimiento fue realizado a 4°C.

5.7 Determinación de concentración de proteína

La concentración proteica fue determinada utilizando el método de Bradford. El método se basa en la formación de un complejo entre las proteínas y el colorante Azul Brillante G, lo que provoca un cambio en la absorbancia del colorante (Bradford MM 1976). Se prepararon cinco diluciones de un estándar de proteína utilizando albúmina sérica bovina (BSA), a una concentración de 0-10 μ g/ μ L y 1 dilución de 2:8 para las muestras. Se ocupó una placa de microtitulación donde se colocó por pozo 20 μ L de volumen correspondientes a las diluciones del estándar y a las muestras, más 180 μ L del reactivo de Bradford Reagen (Sigma), todo por duplicado. Una vez agregado el reactivo de Bradford, se colocó la placa en un shaker (Stat Fax-2200) alrededor de 30 segundos para mezclar el contenido de los pozos. Inmediatamente después de la agitación las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Stat Fax) a 630nm. Finalmente y utilizando un software de computadora (GraphPad prism 4) se trazó la curva patrón de valores obtenidos de la proteína estándar BSA, donde después los datos obtenidos de las muestras fueron sustituidos para calcular la concentración de proteína total contenida en los extractos del TAP.

5.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10% a partir de acrilamida: bis-acrilamida 40% (Sigma-Alcrich). Para realizar la separación de las muestras se cargaron cantidades equivalentes de proteína total por cada carril del gel (70 µg). Antes de aplicar cada muestra, se prepararon alícuotas con muestra y se añadió una solución tampón de carga (Sample Buffer 4X) a cada una de ellas. A continuación se realizó una incubación de 5 minutos a 100°C en un termobloque para desnaturalizar las proteínas. Finalmente, las muestras fueron cargadas en el gel y separadas mediante una corriente de 90v/gel, empleando para ello el sistema de electroforesis Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad).

5.9 Inmunodetección en fase sólida (*Western blot*)

Se inicio con una electroforesis en gel de SDS-PAGE. Tras la separación de las proteínas mediante SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Figura 10), utilizando un sistema de electrotransferencia (TransBlot Cell, Bio-Rad). Al finalizar la transferencia, la membrana fue incubada en solución bloqueadora al 7% (leche en polvo desnatada [*Svelty*] al 7% en TPBS [Phosphate buffered saline con Tween 20] 0.2%) para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la superficie de la membrana. Inmediatamente después de este bloqueo se continuó incubando la membrana con el anticuerpo primario (anti-UCP1 [M-17], Santa Cruz Biotechnology sc-6529) diluido 1:200 en solución de leche al 1% (leche en polvo desnatada [*Svelty*] al 1% en TPBS 0,2%) durante 16 h y a 4°C. Al día siguiente se procedió a eliminar y lavar el anticuerpo primario con TBST (Tris Buffered Saline con Tween 20, pH 7.4) 0.2% la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (mouse anti- goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology sc- 2354) en solución de leche al 1% diluido adecuadamente (1:5000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la visualización de estos experimentos se realizo mediante el sistema ECL (Enhanced Chemiluminiscent System, Amersham) mediante quimioluminiscencia. Se analizaron los resultados por densitometría y fueron normalizados contra una proteína de 42 KDa obtenida de la replica del gel de SDS-PAGE por cada experimento. Se utilizó del programa informático Imagej 1.42. para dicho análisis densitometrico.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Posición dentro de la camada

El número de hermanos difiere significativamente (prueba de medidas repetidas de Friedman, $Fr= 137.5, n=9, P < 0.0001$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs I $P < 0.001$, C vs P $P < 0.001$ y I vs P $P < 0.001$) entre las crías de acuerdo a la posición que ocuparon durante los días postnatales 1 al 4 (Figura 10). Las crías centrales tuvieron un número hermanos adyacentes mayor en comparación con las crías intermedias y periféricas. Así mismo las crías intermedias tuvieron un número hermanos adyacentes mayor en comparación con las crías periféricas (Figura 11).

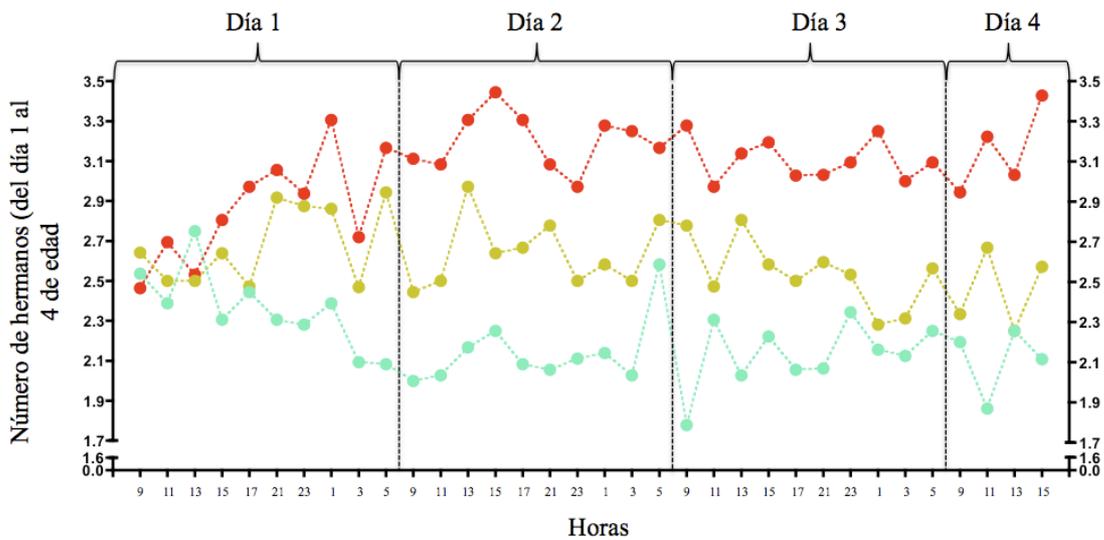


Figura 10. Distribución de los datos de número de hermanos a lo largo de los 4 días de prueba de nueve camadas, crías centrales (puntos rojos), intermedia (puntos amarillos) y periféricas (puntos azules). Cada punto es el promedio de nueve valores (nueve crías) corresponden para las horas indicadas para cada punto. El tamaño de la figura excede los márgenes del documento.

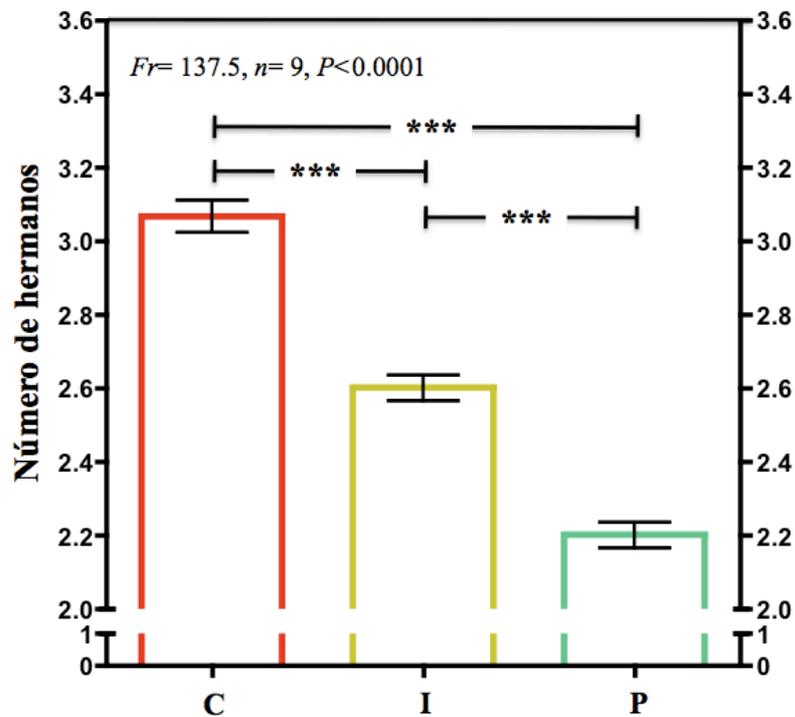


Figura 11. Número de hermanos adyacentes (promedio \pm EE), del día postnatal 1 y 4 entre las crías centrales (C), intermedias (I) y periféricas (P). Las diferencias significativas entre las tres categorías de las crías (Prueba de Friedman, $Fr= 137.5$, $n=9$, $P<0.0001$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs I $P<0.001$, C vs P $P<0.001$ y I vs P $P<0.001$) son dadas con diferentes asteriscos.

6.2 Temperatura corporal

La temperatura corporal (medida sobre la piel) difiere significativamente entre las crías de acuerdo a la posición que ocuparon durante los días postnatales 1 al 4 (Figura 14). Las crías centrales tuvieron una temperatura corporal más alta en comparación con las crías periféricas (prueba de medidas repetidas de Friedman, $Fr= 18.0$, $n=9$, $P<0.0001$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs P $p<0.001$, C vs I $p>0.05$, I vs P $p>0.001$) pero no con las crías intermedias. Estas tuvieron una temperatura mayor comparado con las crías periféricas. En promedio, la temperatura corporal de las crías centrales y periféricas difiere $1.61\text{ }^{\circ}\text{C}$ y entre las crías intermedias y periféricas difiere $1.04\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 13).

6.2.1 Perdida de temperatura corporal por día

La temperatura corporal perdida por las crías en el descenso de temperatura de 1 °C de un día para el otro durante los cuatro días de prueba (Figura 14.1) difiere significativamente (prueba de medidas repetidas de Friedman, $F_r= 9.96$, $n=9$, $P= 0.0069$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs P $p<0.05$, I vs P $p <0.05$, C vs I $p >0.05$) de acuerdo a la posición dentro la camada durante los días postnatales 1 al 4 (Figura.14.2).

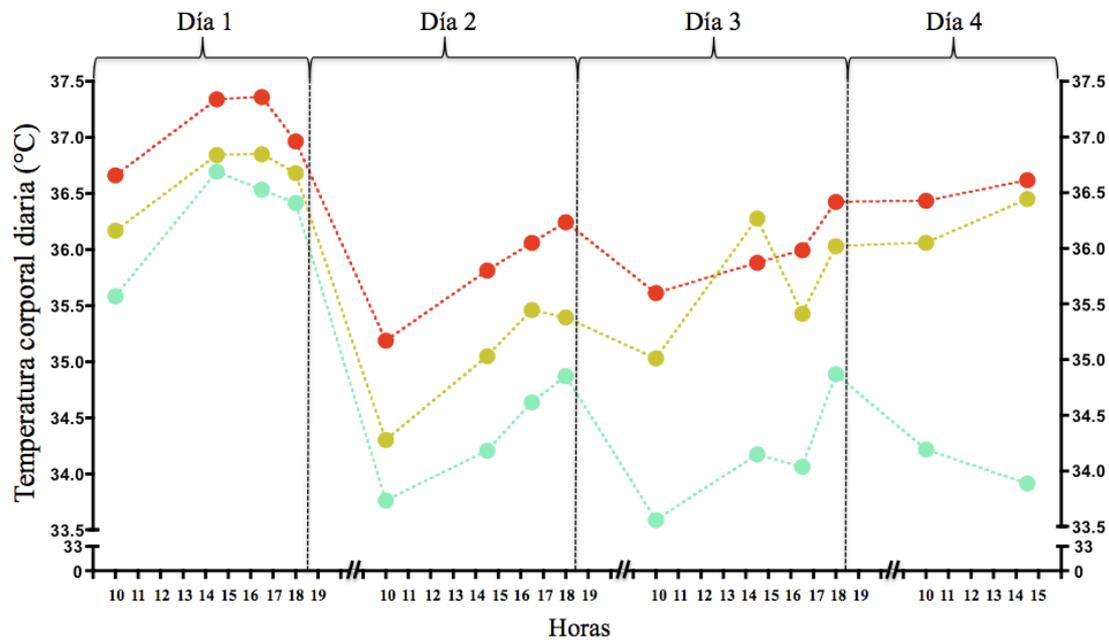


Figura 13 . Distribución de la temperatura corporal a lo largo de los 4 días. La grafica muestra la temperatura de nueve camadas, crías centrales (puntos rojos), intermedia (puntos amarillos) y periféricas (puntos azules) . Cada punto representa el promedio de nueve valores (nueve crías) corresponden para las horas indicadas para cada punto

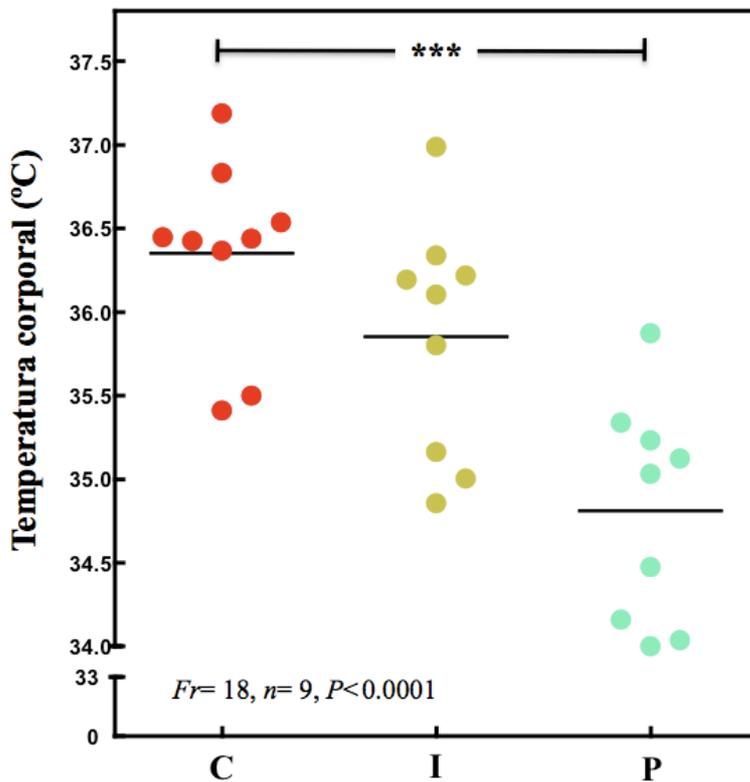


Figura 14. Temperatura corporal de 4 días de edad postnatales. Las letras indican la posición de las crías dentro del agrupamiento C) central, I) intermedia y P) periférica. Cada punto representa el dato de una cría y la barra al valor promedio de los 9 datos. Friedman, $F_r = 18.0$, $n = 9$, $P < 0.0001$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs P $p < 0.001$, C vs I $p > 0.05$, I vs P $p > 0.001$.

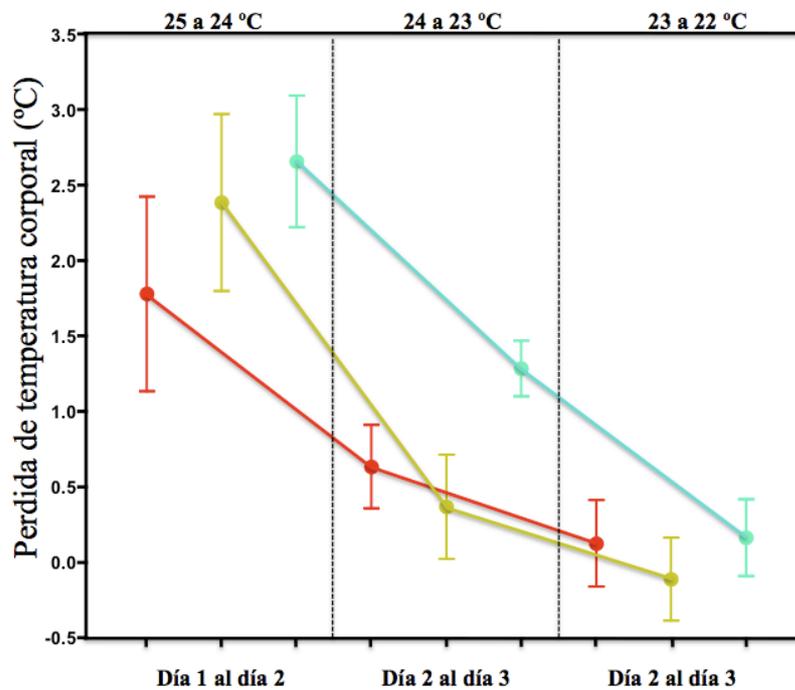


Figura 14.1. Distribución de la pérdida de temperatura corporal a lo largo de los 4 días de prueba de nueve camadas, crías centrales (puntos rojos), intermedia (puntos amarillos) y periféricas (puntos azules) (\pm EE). Cada punto representa el promedio de nueve valores (nueve crías).

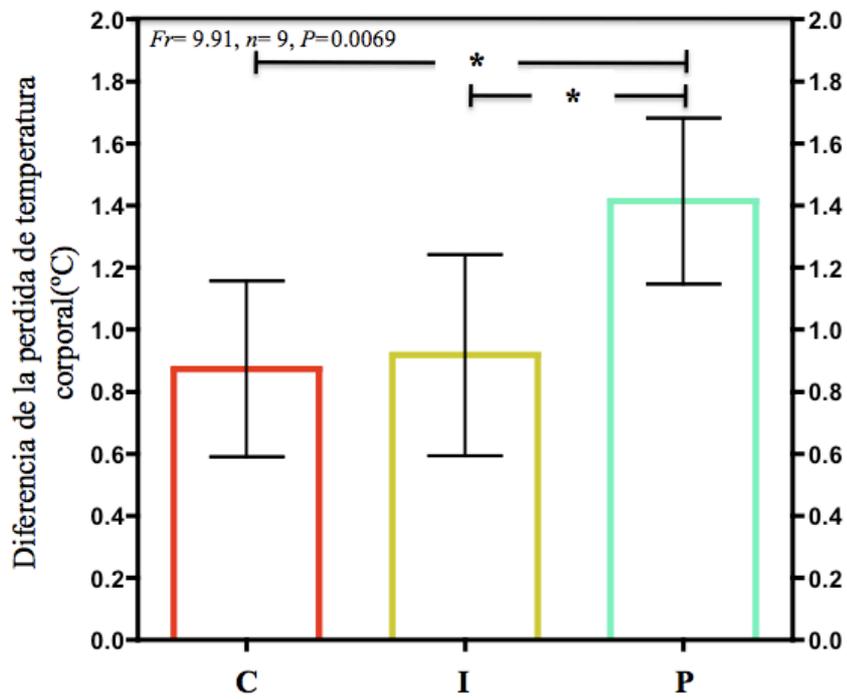


Figura 14.2. Comparación de la diferencia de la pérdida de temperatura corporal (promedio \pm EE), del día postnatal 1 y 4 entre las crías centrales (C), intermedias (I) y periféricas (P). Las diferencias significativas entre las tres categorías de las crías (Prueba de Friedman) son dadas con diferentes asteriscos. (Friedman, $Fr= 9.94$, $n=9$, $P= 0.0069$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs P $p < 0.05$, I vs P $p < 0.05$, C vs I $p > 0.05$).

6.3 Peso al nacimiento

El peso promedio de las crías al nacimiento fue; las crías periféricas tuvieron 46.10 g (\pm 2.60 g) en las crías intermedias fue de 58.01 g (\pm 1.89 g) y en las crías centrales 63.30 g (\pm 2.20). Encontramos claras diferencias al peso al nacimiento entre las crías pesadas, intermedias y ligeras (prueba de medidas repetidas de Friedman, $Fr= 14.89$, $n=9$, $P < 0.0001$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs P <0.001 , I vs P <0.05) figura 15.

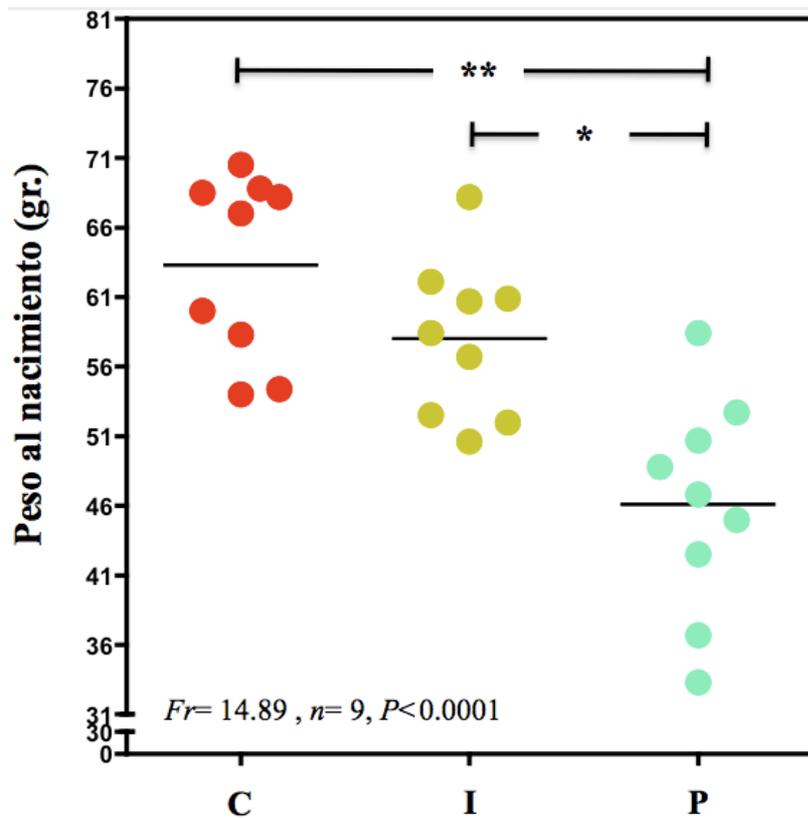


Figura 15. Encontramos claras diferencias en la peso al nacimiento entre las crías centrales (C), intermedias (I) y periféricas (P) (Prueba de Friedman de medidas repetidas, $Fr=14.89$, $n=9$, $P<0.0001$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs P <0.001 , I vs P <0.05).

6.4 Índice de conversión de leche a biomasa

El índice de conversión de leche a biomasa difiere significativamente entre las crías centrales, intermedias y periféricas de las nueve camadas analizadas (Prueba de Friedman, $F_r=14$, $n=9$, $P=0.0002$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs I $p > 0.05$, C vs P $p < 0.01$, I vs P $p < 0.05$). Las crías centrales mostraron un índice mayor comparado con sus compañeras de camada periféricas. Las crías intermedias de igual manera mostraron un índice mayor de conversión de leche a biomasa que las periféricas (Figura 16).

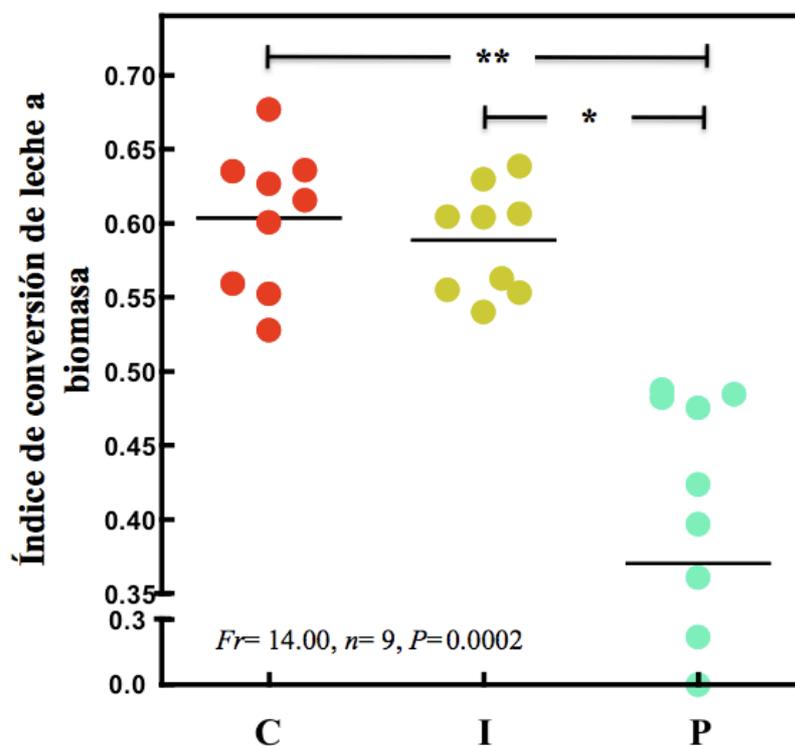


Figura 16. Índice de conversión de leche a biomasa de los 4 días postnatales. Las letras indican la posición de las crías dentro del agrupamiento C) central, I) intermedia y P) periférica. Cada punto representa el dato de una cría y la barra al valor promedio de lo 9 datos. Friedman, $F_r=14$, $n=9$, $P=0.0002$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs I $p > 0.05$, C vs P $p < 0.01$, I vs P $p < 0.05$.

6.5 Peso absoluto

Encontramos claras diferencias en el de peso entre el día postnatal 1 y 4 entre las crías centrales, intermedias y periféricas (Prueba de Friedman, $F_r=16.22$, $n=9$, $P<0.0001$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs P $p < 0.001$, C vs I $p > 0.05$, I vs P $p > 0.05$). Las crías centrales mostraron un incremento de peso absoluto mayor que las crías periféricas, así mismo, las crías intermedias presentaron mayor peso que las crías periféricas (Figura 17).

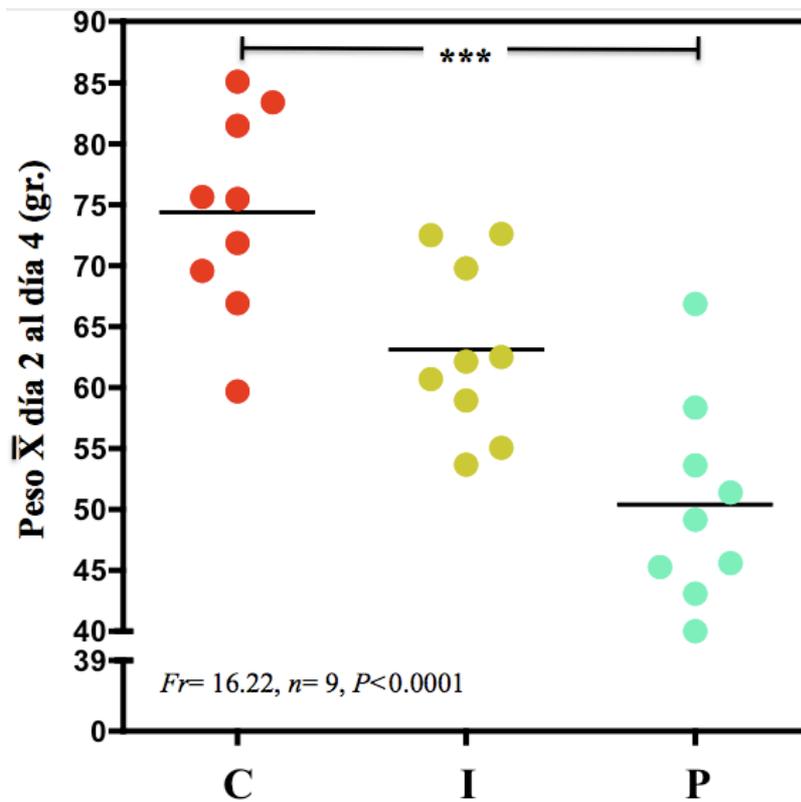


Figura 17. Peso los 4 días de edad de crías de conejo postnatales. Las letras indican la posición de las crías dentro del agrupamiento C) central, I) intermedia y P) periférica. Cada punto representa el dato de una cría y la barra al valor promedio de lo 9 datos. Friedman, $F_r=16.22$, $n=9$, $P<0.0001$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs P $p < 0.001$, C vs I $p > 0.05$, I vs P $p > 0.05$.

6.6 Identificación de la proteína desacoplada 1 (UCP-1) mediante inmunodetección en fase sólida (*Western blot*)

Un primer paso fue determinar el control para nuestros experimentos. El anticuerpo específico anti-UCP-1 que ocupamos esta diseñado contra tejido de ratón, por lo que su especificidad contra tejido de conejo fue evaluado. Se compararon tejido adiposo pardo proveniente de ratas de 1 día de edad y de conejos de 4 días de edad. En la figura 18 se muestra la expresión de la UCP-1 en ambos tejidos. En ambos casos se evidencia una banda de 32KDa, este peso molecular concuerda con el peso descrito para UCP-1. El peso molecular calculado de ambas es de 33.77 y 33.66 KDa, respectivamente.

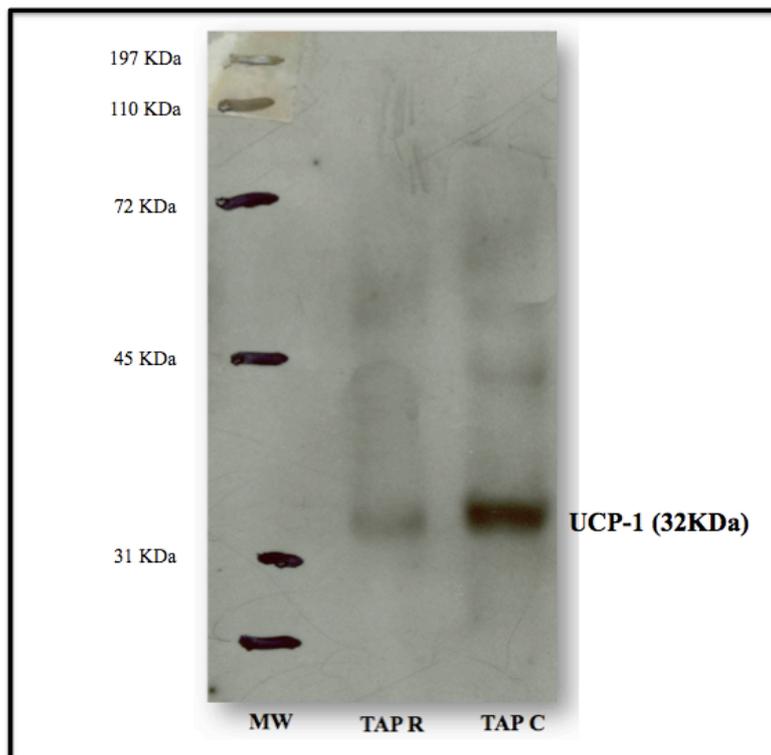


Figura 18. Inmunodetección en fase sólida de UCP-1 en tejido adiposo pardo de rata y conejo (MW= marcador de peso molecular, TAPR= tejido adiposo pardo de rata, TAPC= tejido adiposo pardo de conejo)

6.7 Expresión de UCP-1 en TAP

En la expresión de la proteína UCP-1 en el TAP en crías de conejo se encontraron diferencias entre las crías centrales, intermedias y periféricas, donde la expresión de UCP-1 difiere significativamente entre las crías centrales y periféricas. (Prueba de Friedman,

Fr=14.22, n=9, P<0.0001; Dunn's multiple comparison test: C vs. P <0.001). Las crías periféricas tuvieron una mayor expresión de proteína UCP-1 que las crías centrales, sin embargo no se encontraron diferencias entre crías periféricas y intermedias (Figura 19).

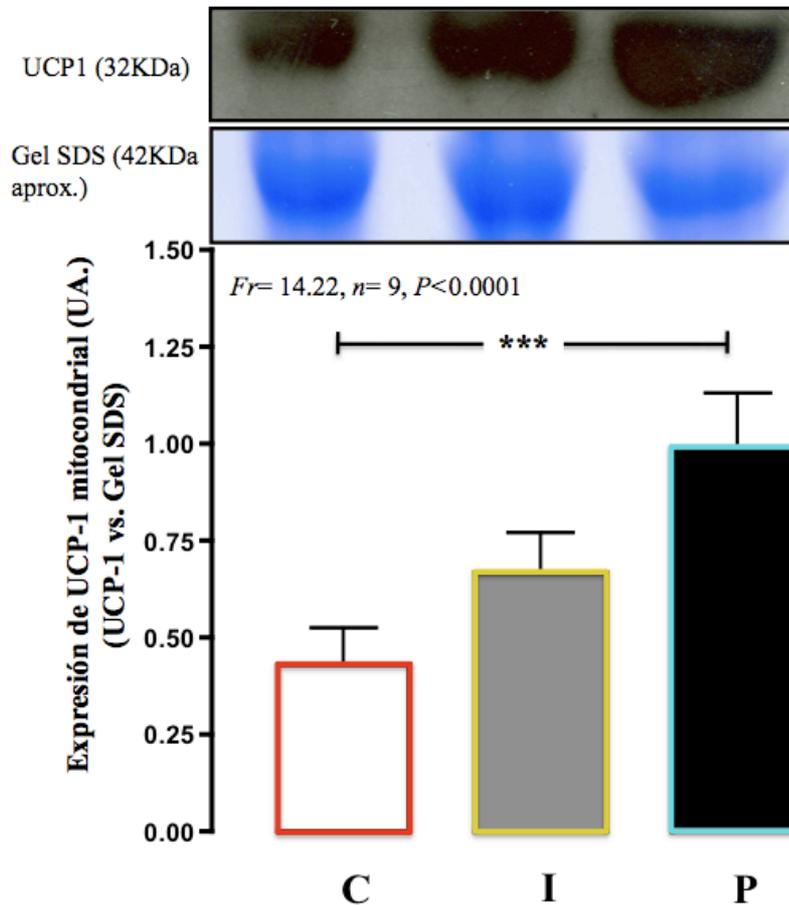


Figura 19. En esta gráfica se muestra los resultados obtenidos de la expresión de UCP-1 para las crías centrales "C", intermedias "I" y periféricas "P". Donde se observa en la parte superior un *Western blot* así como el gel de poliacrilamida SDS usado para normalizar los valores obtenidos en la densitometría para el *Western blot*. Los valores representan el promedio \pm E.E de 9 crías por categoría; *Dunn's multiple comparison test*: C vs. P <0.001.

7 DISCUSIÓN

7 DISCUSIÓN

Los hallazgos en este trabajo mostraron que en crías del conejo doméstico las crías periféricas tienen una mayor concentración de proteína desacopladora 1 (UCP-1). Tales diferencias, en relación a las crías centrales e intermedias, en concentración de UCP-1 probablemente son consecuencia de una mayor exposición de las crías periféricas al frío y por la posición que ocupó dentro del agrupamiento (centrales, intermedias y periféricas). Por otra parte, se corroboró que las crías del conejo doméstico compiten por sitios térmicamente ventajosos dentro del agrupamiento en el nido y que estos sitios confieren ventajas en términos de crecimiento, donde las crías centrales son las más exitosas al competir por ellos. Las crías centrales, en comparación con las intermedias y las periféricas, tuvieron un mayor número de hermanos en contacto, estuvo asociado con una mayor temperatura corporal, a una mejor conversión de leche a biomasa y ganancia de peso. Las centrales al ser más eficientes para mantener un número mayor de hermanos en contacto, tuvieron una temperatura corporal en promedio más alta durante los primeros cuatro días postnatales. Esto también explicaría su mejor eficiencia de conversión de leche a biomasa, sitios térmicamente ventajosos les proveerían un ahorro a las crías en términos de energía que entonces canalizarían a crecimiento (Bautista 2003).

Los resultados del presente trabajo apoyan la hipótesis de que las crías de conejo doméstico muestran diferencias intracamada en su habilidad por competir por sitios térmicamente ventajosos dentro del agrupamiento (crías centrales, intermedias y periféricas) y que estas diferencias están asociadas con la actividad metabólica del TAP en términos de una mayor expresión del UCP-1 en crías que ocupan una posición térmicamente desfavorable dentro del agrupamiento. En estudios previos (Bautista 2003, Bautista *et al.* 2008, Rodel *et al.* 2008) se ha reportado que en la mayoría de los parámetros analizados (temperatura, conversión de leche a biomasa, ganancia de peso y número de hermanos) mostraron diferencias significativas entre crías centrales y periféricas alrededor del día postnatal 5. En este estudio se analizaron los datos por día y se observó que las variables de número de hermanos y temperatura ya difieren significativamente en el día uno.

El que las crías periféricas hayan logrado valores más altos en la expresión de UCP-1 en comparación que las crías centrales, puede explicarse en función a la posición que ocuparon dentro del agrupamiento, donde las crías periféricas hayan experimentado temperaturas ambientales más bajas dentro del microclima del agrupamiento y por más tiempo que las crías centrales. Esto puede ser parcialmente cierto en condiciones naturales en donde las temperatura ambiental puede ir muy por debajo de la temperatura mínima bajo la cual fueron estudiadas estas camadas. Como bien se sabe, a traves de la exposición al frío y por señales aferentes, el hipotálamo envía señales de inicio de la termogénesis a través de sistema nervioso simpático(Park y Himms-Hagen 1988, Kurosawa 1991, Young *et al.* 1998, Morrison *et al.* 2000 Seebacher 2009). La noradrenalina que es liberada por fibras simpáticas en los adipocitos pardos desencadena un aserie de mecanismo que dan como resultado por un lado la producción de calor y por otra parte la estimulación de la síntesis de UCP-1, mediante la activación noradrenérgica a través de un complejo de elementos de respuesta (T3, ácidos grasos y acido retinoico) (Silva 1995, Ribeiro *et al.* 2001, Cannon y Nerdergaard 2004, Mozo *et al.* 2005, Rail y Gónzales-Barroso 2007, Carroll *et al.* 2008, Klingenspor 2010). Consecuentemente, las crías periféricas por permanecer más tiempo en esta posición y haber experimentado temperaturas ambientales más bajas, el mecanismo de producción de calor es estimulado por más tiempo. Por lo cual las crías periféricas obtuvieron una mayor cantidad de UCP-1 que sus hermanas centrales, lo que denota la importancia de los resultados obtenidos en este trabajo. Fue clara también una correlación entre la temperatura corporal y concentración de UCP-1, ya que las crías periféricas tuvieron en promedio los valores más bajos en su temperatura corporal. Así en las crías periféricas, una mayor exposición al frío dio como probable resultado una mayor estimulación al mecanismo de liberación de calor a través del desacople de la fosforilación oxidativa en los adipocitos pardos a través de la UCP-1 además de estimular la síntesis de la misma.

La UCP-1 es un buen modelo como indicador de la actividad del TAP en la termorregulación sin temblor en crías recién nacidas, ya que se a descrito que esta proteína es exclusiva de TAP y su principal función es liberación de calor (Ross *et al.* 2005, Zaninovivh 2005, Berg *et al.* 2006, Foner *et al.* 2009) a través del desacople de la

fosforilación oxidativa en los adipocitos pardos. El TAP muestra una variedad de cambios fisiológicos y estructurales durante a la exposición al frío, lo que contribuye al aumento de su capacidad de generar calor (Formente 1984, Himms-Hagen 1986, En: Gordon 1993). Estos cambios, ocurren a diversos grados, se consideran a niveles subcelulares, celulares, y del TAP. Otra medición fisiológica que apoyaría el incremento en la concentración de UCP-1 en crías de conejo a la exposición al frío sería la cuantificación en la concentración de noradrenalina, también los niveles de lipoproteína lipasa en el TAP y concentraciones de la acarreadora de GDP (guanosina difosfato) (Wickler *et al.* 1984, Milner y Trayhurn 1990).

Es muy probable que además de las diferencias observadas a nivel del metabolismo del TAP entre las crías, ocurran también cambios a otros niveles fisiológicos. Una posible diferencia puede ser a nivel de sistema nervioso simpático y su plasticidad para la modulación de la termogénesis sin temblor en estas crías. Es probable que la exposición por más tiempo al frío de las crías periféricas estimule más el desarrollo del sistema nervioso simpático que inerva al TAP y forme más fibras nerviosas. Esto daría como resultado una mejor respuesta en el mecanismo de liberación de calor del TAP regulada por la liberación de noradrenalina a los adipocitos pardos. En comparación con aquellas crías centrales que estuvieron menos expuestas al frío, por lo que se pensaría que estas crías tuvieran menos fibras nerviosas que inervan a los adipositos pardos como resultado por permanecer en una posición central dentro del agrupamiento. Se esperaría por lo tanto, que como adultos, las crías que experimentaron más tiempo en el frío (crías periféricas) respondan de manera más eficiente y de mayor tolerancia al frío en comparación con las crías que experimentaron posiciones centrales. En la literatura existe mucha evidencia que apoya esta hipótesis. Se sabe por ejemplo que animales criados en temperaturas ambientales bajas muestran una mejor capacidad termorregulatoria en subsecuentes exposiciones al frío que aquellas criadas a temperaturas más altas (Young y Shimano 1998) y la inversa, animales criados en altas temperaturas son más tolerantes a la exposición al calor que aquellos criados a temperaturas más bajas (Young y Shimano 1998). De igual manera se ha reportado en ratas criadas a bajas temperaturas aumenta la capacidad total y funcional del TAP así como la densidad de la inervación simpática del tejido (Bertin *et al.* 1990 y Mourox *et al.* 1990). En animales aclimatados al frío se a reportado que existen cambios en el funcionamiento y morfología a varios niveles. Por

ejemplo un crecimiento en la densidad de las terminales nerviosas noradrenérgicas en el TAP (Himms-Hagen 1986), el incremento en la densidad mitocondrial y niveles de UCP-1 (Himms-Hagen 1986, Ricquier *et al.* 1991, Klingenspor 2010).

El presente trabajo describe por primera vez para las crías de conejo diferencias en concentraciones de UCP-1 asociadas a las posiciones que ocuparon dentro del agrupamiento (crías centrales que tuvieron mayor número de hermanos en contacto, crías intermedias que tuvieron un valor medio de hermano en contacto entre cría central-periférica y cría periférica fue aquella que tubo el menor número de hermanos en contacto) en relación a su mantenimiento de su temperatura corporal y crecimiento medido por su peso. Esto denota la existencia de diferencias del fenotipo fisiológico entre los hermanos de una camada influenciada por la interacción entre los mismos bajo un contexto de baja temperatura.

8 CONCLUSIONES

8 CONCLUSIONES

Las crías centrales son las más eficientes para competir y mantener por más tiempo sitios térmicamente ventajosos dentro del agrupamiento por lo que pueden defender mejor su temperatura corporal y convertir más eficientemente la leche a biomasa

La competencia por sitios térmicamente ventajosos esta asociada a diferencias metabólicas del tejido adiposo pardo en términos de una mayor expresión de UCP1 en crías que ocupan una posición térmicamente desfavorable dentro del agrupamiento durante los primeros días postales.

9 PERSPECTIVAS

9 PERSPECTIVAS

De esta investigación surgen diversos aspectos de interés para futuras áreas de investigación:

1. Investigar también si estas diferencias están asociadas con diferencias neuroanatómicas tanto en TAP y los núcleos del sistema nervioso central involucrados con la regulación de la temperatura corporal.
2. Investigar en que medida estas diferencias están asociadas al metabolismo del TAP en la vida temprana y a largo plazo en crías de conejo tanto en su fisiología y conducta.
3. Investigar el posible papel de factores genéticos formando experimentalmente camadas artificiales en donde se invierta el tamaño relativo de los individuos, de tal manera que las crías centrales sean las más periféricas y viceversa, y evaluar su desarrollo (conductual y fisiológico).
4. Explorar las diferencias anatómicas y funcionales a nivel cerebral-hipotalámicas entre crías centrales y periféricas asociadas con sus estrategias fisiológicas en relación a la adaptación ambiental.

10 REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Argyropoulos G y Harper ME. 2002. Molecular biology of thermoregulation invited review: Uncoupling proteins and thermoregulation. *The american physiological society*. 92: 2187-2199.
2. Bartness TJ y Song C. 2005. Innervation of Brown Adipose Tissue and its Role in Thermogenesis. *Canadian Journal of diabetes*. 29 (4): 420-428.
3. Bautista A, Drummond H, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2003. Thermal benefit of sibling presence in the newborn rabbit. *Developmental Psychobiology*. 43: 208-215.
4. Bautista A, García E, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2005b. Position in the litter huddle and individual growth and survival in rabbit pups. *Developmental Psychobiology*. 47, 440.
5. Bautista A, Juárez M, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2005c. Hermano, querido hermano. La competencia por la leche. *Ciencias*. 77:48-54.
6. Bautista A, García-Torres E, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2008. Competition among newborn domestic rabbits *Oryctolagus cuniculus* for thermally advantageous positions in the litter huddle? *Behavior. Ecol. Sociobiol.*
7. Bautista A, García-Torres E, Prager G, Hudson R, Rödel H. 2010. Development of behavior in the litter huddle in rat pups: within -and between- litter differences. *Dev Psychobiol*, 52:35-43
8. Berg F, Gustafson U, Andersson L. 2006. The Uncoupling Protein 1 Gene (UCP1) Is Disrupted in the Pig Lineage: A Genetic Explanation for Poor Thermoregulation in Piglets. *Plos genetics*. Vol. 2, Issue 8.
9. Bertin R, Mouroux I, De Marco F and Portet F. 1990. Norepinephrine turnover in brown adipose tissue of young rats: effects of rearing temperature. *Am. J. Physiol.* 259 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 28): R90–R96.
10. Blumberg SM, Deaver K y Kirby FR. 1999. Leptin disinhibits nonshivering thermogenesis in infants alter maternal separation. *The american physiological society*.
11. Bouillaud F, Ricquier D, Mory G and Thibault J. 1984. Increased level of mRNA for the uncoupling protein in brown adipose tissue of rats during thermogenesis

- induced by cold exposure or norepinephrine infusion. *J. Biol. chem.* 259: 11583–11586.
12. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, y Giacobino JP. 1997. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expresión. *FEBS Lett.* 408, 39-42.
 13. Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry.* 72, 248-254.
 14. Caldelas I, Chimal-monroy J, Martínez-Gómez M y Hudson R. 2005. Non-photic circadian entrainment in mammals: A brief review and proposal for study during development. *Biol. Rhythm Res.* 36: 23-37.
 15. Cannon B y Nedergaard J. 2004. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological reviews.* 84: 277–359.
 16. Dawkins JR y Hull D. 1964. Brown adipose tissue and the response of new-born rabbits to cold. *J. Physiol.* 172: 216-238.
 17. 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.
 18. Echtay KS, Winkler E, Bienengraeber M y Klingenberg M. 2000. Site-directed mutagenesis identifies residues in uncoupling protein (UCP1) involved in three different functions. *Biochemistry.* 39(12):3311-7.
 19. Eckert R, Randall D y Augustine G. 1997. *Fisiología Animal: Mecanismos y Adaptaciones.* Interamericana McGraw-Hill, Madrid.
 20. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, y Warden CH. 1997. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genet.* 15, 269-272.
 21. Fonner F, Kumar C, Lubber CA, Fromme T, Klingenspor M y Mann M. 2009. Proteome Differences between Brown and White Fat Mitochondria Reveal Specialized Metabolic Functions. *Cell Metabolism* 10, 324–335.

22. Freeman KB, Meyrick K, Patel HV and Ridley RG. 1985. Size analysis of uncoupling proteína and its precursor from brown adipose tissue of different species. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 63:988–991.
23. Fukuki K, Ono Y, Nakahata Y, Okada Y, Hayashida K y Ishida Y. 2003. Visualization of Interscapular Brown Adipose Tissue Using ^{99m}Tc-Tetrofosmin in Pediatric Patients. *The Journal of nuclear medicine*, Vol. 44, No. 10.
24. Garlid KD, Jabürek M, Jezek P. 1998. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett.* 438(1-2):10-4.
25. Gilbert C, Blanc E, Giraud S, Trabalon M, Le Maho Y, Perret M y Ancel A. 2007. Rol of huddling on the energetic of growth in a new born altricial mammal. *Am.J.Physiol. Regul. Integr. Comp.*
26. González-Mariscal G y Rosenblatt. 1996. Maternal behavior in rabbits. A historical and multidisciplinary perspective. En Rosenblatt JS y Snowdon CT (eds). *Advances in the study of Behavior*, Vol. 25, Parental Care: Evolution, Mechanisms and adaptive significance. Academic Press. New York. Pp 333-360.
27. Hahn P y Novak M. 1975. Development of brown and white adipose tissue. *Journal of lípido research*. Vol. 16.
28. Heaton GM, Wagenvoord RJ, Kemp A, y Nicholls DG. 1978. Brown-adipose-tissue mitochondria: Photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.* 82, 515-521.
29. Himms-Hagen J. 1986. Brown adipose tissue and cold-acclimation. In P. Trayhurn and D. G. Nicholls (eds.), *Brown Adipose Tissue* (pp. 214-68). London: Edward Arnold.
30. Hudson R. 1998. Potential of the newborn rabbit for circadian rhythms research. *Biol. Rythm Res.* 29: 546-555.
31. Hudson R. 2000. Competition for milk in the domestic rabbit: survivors benefit from littermate deaths. *Ethology.* 106: 511-526.
32. Hudson R. 2005. The contribution of sibling relations to the emergence of individual behavioural phenotypes. Presentación plenaria por invitación. XXIX Int. Ethological Cong., Budapest, Hungría.
33. Hudson R y Distel H. 1982. The pattern of behavior of rabbit pups in the nest. *Behavior* 79, 255-271.

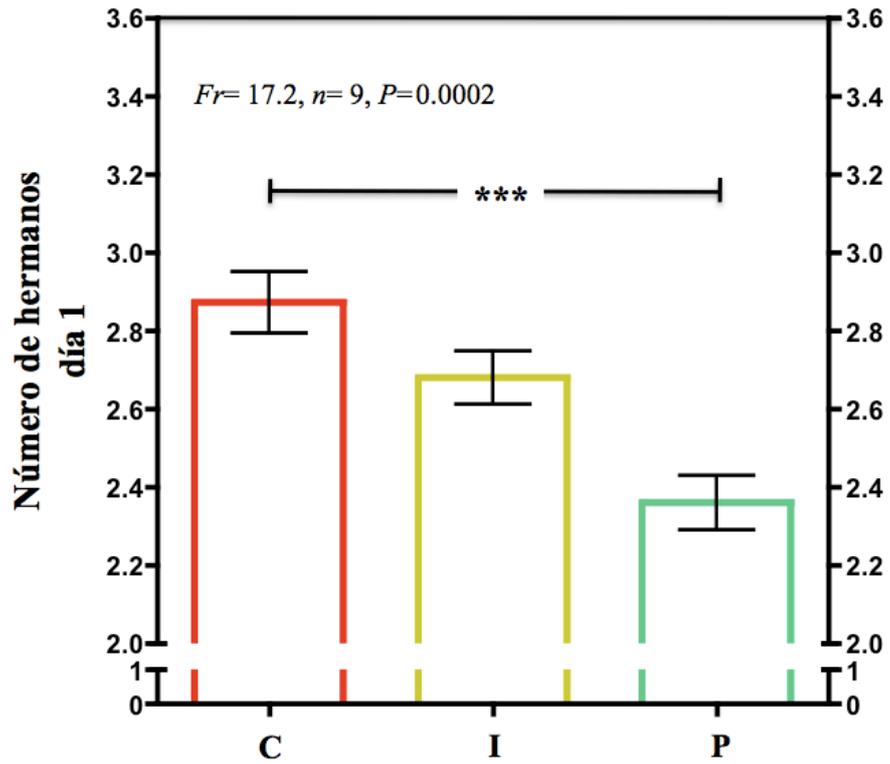
34. Hudson R y Distel H. 1986. The potential of the newborn rabbit for behavioral teratological research. *Neurabehav. Toxicol. Teratol.* 8: 209-212.
35. Hudson R, Mendoza A y Bautista A. 2002. El mundo social y sensorial del conejo neonato: retos y adaptaciones. En: Manzo J (Ed) *Neuroetología: La Década del Cerebro y la Conducta Animal*. Universidad Veracruzana, México.
36. Hudson R y Trillmich F. 2006. Sibling competition in mammals: Challenges, developments and prospects. *Behav. Ecol Sociobiol.*
37. Hull D. 1965. Oxygen consumption and body temperature of new-born rabbits and kittens exposed to cold. *J. Physiol.* 177: 192-202.
38. Hull J y Hull D. 1982. Behavioural thermoregulation in newborn rabbits. *J Comp. Physiol. Psych.* 96: 143-147.
39. Hull D y Segal MM. 1965a. The contribution of brown adipose tissue to heat production in the new-born rabbit. *J. Physiol.* 181: 449-457.
40. Hull D y Segall MM. 1965b. Sympathetic nervous control of brown adipose tissue and heat production in the new-born rabbit. *J. Physiol.* 181: 468-477.
41. Jeddi E. 1971. Thermoregulatory efficiency of neonatal rabbit search for fur comfort contact. *Int J Biometereol*, 15:337-341.
42. Jezek P y Garlid KD. 1990. New substrates and competitive inhibitors of the Cl⁻ translocating pathway of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. *J Biol Chem.* 265(31):19303-11.
43. Kleitman N y Satinoff E. 1981. Behavioral responses to pyrogen in cold stressed and starved newborn rabbits. *Am. J. Physiol.* 241: R161-R171.
44. Klingenberg M y Echtay KS. 2001. Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 128-143.
45. Klingenber M, Huans SG. 1999. Structure and funtion of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys.* 1415, 271-296.
46. Klingenspor M. 2010. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *The quarterly journal of experimental psychology.* 141-148.
47. Kurosawa M. 1991. Reflex changes in thermogenesis in the interscapular brown adipose tissue in response to thermal stimulation of the skin via sympathetic efferent nerves in anesthetized rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 33:15-24.

48. Metcalfe NB y Monaghan P. 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later?. *Trends Ecol Evol.* 16(5):254-260.
49. Milner RE and Trayhurn P. 1990. Rapid quantitation of uncoupling protein in brown adipose tissue mitochondria by dot immunobinding ("dot blot") procedure: application to the measurement of uncoupling protein in Richardson's ground squirrel, rats, and mice. *Biochem. Cell. BioL*, 68:973-9.
50. Mock DW y Parker G. 1997. *The Evolution of Sibling Rivalry*. Oxford University, Oxford.
51. Morrison FS. 2004. Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. *News Physiol. Sci.* 19: 67-74.
52. Mortola JP y Sant 'Anna MG. 2003. Thermal and respiratory control in young rats exposed to cold during postnatal development. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A: Molecular & Integrative Physiology.* 134: 449-459.
53. Mouroux I, Bertin R and Portet R. 1990. Thermogenic capacity of the brown adipose tissue of developing rats; effects of rearing temperature. *J. Dev. Physiol.* (Eynsham) 14: 337-342.
54. Mozo J, Emre Y, Bouillaud F, Ricquier D y Criscuolo F. 2005. Thermoregulation: What Role for UCPs in Mammals and Birds? *Bioscience Reports*, Vol. 25, Nos. 3/4.
55. Nicholls DG y Locke. 1984. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev.* 64(1):1-64.
56. Nicholls DG y Rial E. 1999. A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J Bioenerg Biomembr.* 31(5):399-406.
57. Lamli UK. 1970. Cleavaga of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
58. Pacheco-Cobos L, Rosetti M, Distel H y Hudson R. 2003. To stay or not to stay: The contribution of tactile and thermal cues to coming to rest in newborn rabbits. *J. Comp. Physiol. A*, 189:383-389.
59. Park IR and Himms-Hagen J. 1988. Neural influences on trophic changes in brown adipose tissue during cold acclimation. *Am. J. Physiol*, 255:R874-81.

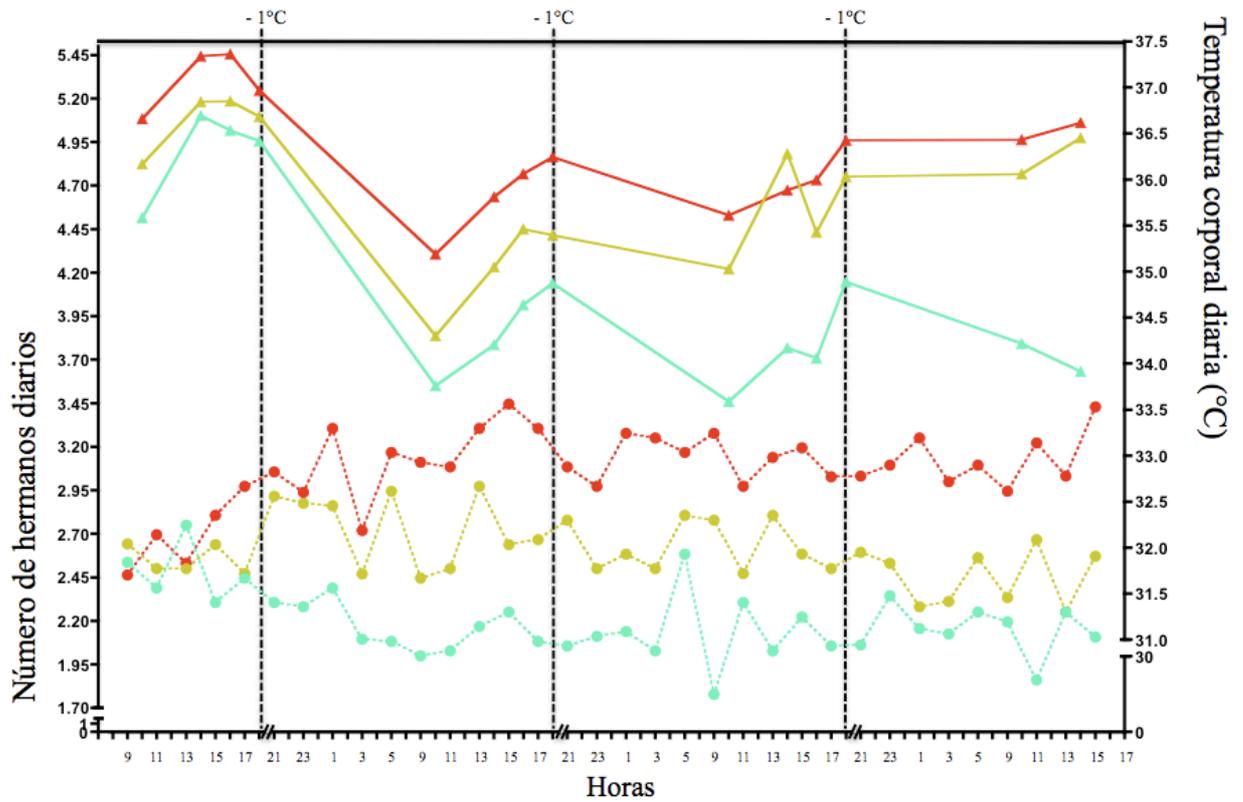
60. Ricquier D, Bouillaud F. 1986. The brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein. En: Trayhurn P, Nicholls DG, eds. Brown adipose tissue. London: Edward Arnold. 86-104.
61. Ricquier D, y Kader JC. 1976. Noradrenaline controls the concentration of the uncoupling protein in brown adipose tissue *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 577-583.
62. Rial E y González-Barroso MM. 2007. La proteína desacoplante UCP1 del tejido adiposo café: mecanismo, estructura, función y regulación. *Mensaje Bioquímico*, Vol. 31.
63. Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC y Brent GA. 2001. Thyroid hormone-sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 108, Num. 1.
64. Ricquier D y Bouillaud F. 2000. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *The Journal of Physiology* 529. 1, pp.3-10.
65. Ricquier D, Bouillaud F, Toumelin P, Mory G, Bazin R, Arch J and Penicaud L. 1986. Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. *J. Biol. Chem.* 261:3905-3910.
66. Ricquier D, Casteilla L and Bouillaud F. 1991. Molecular studies of the uncoupling protein. *FASEB J.*, 5:2237-42.
67. Ricquier D, Mory G, Bouillaud F, Thibault J and Weissenbach J. 1984. Rapid increase of mitochondrial uncoupling protein and its mRNA in stimulated brown adipose tissue. Use of a cDNA probe. *FEBS Lett.* 178:240-244.
68. Rödel GH, Bautista A, García-Torres E, Martínez-Gómez M, Hudson R. 2008. Why do heavy littermates grow better than lighter ones? A study in wild and domestic European rabbits. *Physiology and behaviour.* 441-448.
69. Ross H, Michael, Kaye I, Gordon, Pawlina y Wojciech. 2005. En: *Histología texto y atlas color con biología celular y molecular 4ª edición*. México. Paramericana.

70. Satinoff E, McEwen GN, Willeams BA. 1976. Behavioral fever in new born rabbits. *Science*, 193: 1139-1140.
71. Schmidt-Nielsen K. 1997. *Animal Physiology, Adaptation and Enviroment*. Harvart University Press, Cambribge, MA, pp 241-293.
72. Seebacher F. 2009. Responses to temperature variation: integration of thermoregulation and metabolismo in vertebrales. *The Journal of Experimental Biology* 212, 2885-2891.
73. Silva JE. 1995. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5:481-490.
74. Skulachev VP. 1991. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 294(3):158-62.
75. Sokoloff G, Kirby RF y Blumberg. 1998. Further evidence that BAT thermogenesis modulates cardiac rate in infant rats. *The american physiological society*. 274:R1712-R1717.
76. Wickler SJ, Horwitz BA, Flaim SF and LaNoue KF. 1984. Isoproterenolinduced blood flow in rats acclimated to room temperature and cold. *Am. J. Physiol*, 246:R747-52.
77. Young JB y Shimano Y. 1998. Effects of rearing temperature on body weight and abdominal fat in male and female rats. *the American Physiological Society*. 274:R398-R405.
78. Zancanaro C, Pelosi G, Accordini C, Balercia G, Sbado L y Cinti S. 1994. Immunohistochemical identification of the uncoupling protein in human hibernoma. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 80, 75-78.
79. Zaninovich AA. 2005. Rol de las proteínas desacoplantes UCP1, UCP2 y UCP3 en el gasto energetico, diabetes tipo 2 y obesidad. *Medicina*. 65: 165-169.

11 ANEXOS



Anexo 1. Número de hermanos adyacentes (promedio \pm EE), del día postnatal 1 entre las crías centrales (C), intermedias (I) y periféricas (P). Las diferencias significativas entre las tres categorías de las crías (Prueba de Friedman, $Fr= 17.2, n=9, P=0.0002$; *Dunn's multiple comparison test*: C vs I $P>0.05$, C vs P <0.001 y I vs P > 0.05) son dadas con diferentes asteriscos.



Anexo 2 . Distribución del número de hermanos y a la temperatura corporal a lo largo de los 4 días. La grafica muestra el número hermanos de nueve camadas (puntos rojos), intermedia (puntos amarillos) y periféricas (putos azules) y la temperatura de nueve camadas, crías centrales (triángulos rojos), intermedia (triángulos amarillos) y periféricas (triángulos azules) . Cada punto representa el promedio de nueve valores (nueve crías) corresponden para las horas indicadas para cada punto.

