

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**



**EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DESACOPLANTES, PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO Y  
CITOCROMO P450, LIGADAS AL ESTRÉS POR CALOR SEVERO EN CERDOS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**VERÓNICA MONTESINOS CRUZ**

**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. ADRIANA MORALES TREJO**

**CODIRECTOR**

**DR. MIGUEL CERVANTES RAMIREZ**

Mexicali, Baja California

20 de Febrero de 2015





## Dedicatoria

### ESTE TRABAJO ESTÁ DEDICADO A MI MADRE

**Cirina Cruz Pedro:**

*Tú que siempre me has apoyado a hacer lo que en mente me he creado,  
Que siempre entiendes mis más extraños pensamientos e ilusiones,  
Que siempre has estado dispuesta a escucharme,  
Que sabes ser mi parte racional,  
Que crees en mí y en mis objetivos,  
Que siempre me has dado un buen consejo,  
Que me has visto crecer cada pasó de mi vida,  
Y que por su puesto,  
Que siempre has sabido ser mi mejor amiga*

Muchas gracias mamita por caminar a mi lado en la senda que elegí; sin tu apoyo no lo podría haber logrado. Gracias por apoyarme a vivir esta aventura sin siquiera saber en dónde llegaría ni cuando regresaría.

A mi hermana Ney que siempre, pero siempre me ha recordado la responsabilidad de vivir la vida de la forma más alegre y responsable posible. Siempre puso mis pies en la Tierra.

A mis hermanos, Frank y Max que me han dado el excelente ejemplo de saber vivir la vida.

A Lupita y Ray, dos miembros extraordinarios de mi familia. Siempre me hacen recordar lo bello que es la vida con el amor de por medio.

A mi querido Jesús Manuel, el más escéptico ser que he conocido, es toda una aventura caminar a tu lado y lo agradezco al universo. Muchas gracias por estar conmigo.

-Verónica Motesinos Cruz-

20 de Febrero de 2014



## Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme estudiar un posgrado en su casa.

Al Instituto de Ciencias Agrícolas, que me dio la gran oportunidad de estudiar entre su hermosa familia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo para realizar este trabajo.

A mi directora de tesis; la Dra. Adriana Morales Trejo, que sabiendo que no sabía nada, creyó en mí y me apoyo en todo para poder conseguir en lo posible los conocimientos necesarios para mi formación, muchas gracias.

Al Doctor Miguel Cervantes, por su paciencia y claro ejemplo de una vida plena y alegre.

A mis sinodales:

Al Doctor Benedicto Alfonso Araiza, quien me apoyo mucho en los años que estuve bajo su techo; por tratar de comprender los sucesos a los cuales me enfrente y por darme esa pauta para tomar las cosas de la manera más simple posible. Muchas gracias por su apoyo.

Al Dr. Ernesto Avelar Lozano, que con su paciencia y humildad me apoyo con sus consejos y comentarios de tesis, muchas gracias, la pase muy bien. Usted se salió de todo margen, aprendí mucho y me voy con un bonito recuerdo.

Al M. C. Salvador Espinoza Santana, muchas gracias por paciencia y comentarios.



Al Doctor Juan García (Juanito), que aunque sé que no sabe que su decisión de acéptame en su periodo de coordinador del programa de Maestría, cambio mi vida por completo. Muchas gracias Doctor, se lo agradezco de corazón.

Al Director Roberto Soto que me apoyo en cuanto pudo.

Al Dr. Enrique Gilberto Álvarez Almora por su bonita amistad y consejos tan firmes. Le agradezco mucho sus pláticas. Si usted no hubiese aparecido; hubiese sido como si el universo no me guiñara el ojo.

A la Dra. Lourdes Cervantes Díaz quien me recordó que hay veces que se tiene que caminar mucho para conocer a una sola persona.

Al M. C Juan Manuel Gómez Vega por su excéntrica amistad, siempre me la pase muy bien con usted; muchas gracias por todo su apoyo.

Y nuevamente agradezco a todas aquellas personas que se cruzaron en mi vida, admiro su valor por hacer hasta lo imposible por formar parte de mis recuerdos. Muchas gracias.

En sí, agradezco a toda la comunidad del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California por ser tan amenos con una foránea. Muchas gracias por hacerme parte de su historia.

-Vero Mc-

20 de Febrero de 2014



## I. RESUMEN

El estrés por calor (EC) ocurre cuando la temperatura y humedad ambiental elevadas incomodan al organismo para realizar sus actividades normales, lo que dificulta la disipación de calor, y en consecuencia genera cambios en su conducta y fisiología para mantener la homeostasis. Se especula que a nivel celular el EC activa diversos mecanismos de defensa, entre ellos, los encargados de eliminación de radicales libres; sin embargo, existen pocos trabajos al respecto. Se realizó un estudio para evaluar el efecto del estrés por calor en cerdos en crecimiento sobre la expresión de ARNm de la proteína desacoplante 3 (UCP3), proteína de choque térmico (HSP70) y citocromo P450, en tejido hepático y muscular. Este estudio se llevó a cabo durante los meses de verano en el Valle de Mexicali, y empleó 18 cerdos de cruce Landrace x Yorkshirex Duroc, de 3 meses de edad y peso vivo de 30-35 kg; asignados a tres tratamientos: 1) alojados en condiciones de confort con alimentación *ad libitum*; 2) alojados en confort pero con alimentación restringida; y 3) alojados en una sala sin control de temperatura o condiciones de estrés por calor con alimentación restringida. Los animales fueron sacrificados después de 21 días para coleccionar muestras de hígado, músculo largo dorsal (LD) y músculo semitendinoso (ST). Se analizó la expresión de los ARN mensajeros para las proteínas UCP3, HSP70 y P450. La expresión de UCP3 en los músculos LD y ST no fue diferente entre los cerdos en condiciones de estrés por calor en comparación con los cerdos en confort ( $P>0.10$ ). HSP70 se expresó en hígado y en ambos músculos, mientras que P450 solamente se expresó en hígado, ninguna de estas proteínas presentó diferencia en su expresión por efecto del estrés por calor ( $P>0.10$ ). En conclusión, después de 21 días de exposición al estrés por calor severo no se modifica la expresión de los ARNm de UCP3, HSP70 y P450 en hígado, músculo largo dorsal y músculo semitendinoso de cerdos en crecimiento, en comparación con cerdos mantenidos en condiciones de confort térmico.



## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| I. RESUMEN.....  | 2  |
| II. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....                             | 4  |
| III. INTRODUCCIÓN.....   | 5  |
| IV. MARCO TEÓRICO.....   | 7  |
| 4.1 Fisiografía de la zona de estudio.....                       | 7  |
| 4.1.1 Temperatura.....   | 8  |
| 4.1.2 Precipitación.....   | 9  |
| 4.2 Estrés térmico.....  | 10 |
| 4.3 Estrés por calor.....  | 12 |
| 4.3.1 Efectos del estrés por calor en la producción animal.....  | 12 |
| 4.3.2 Efectos en la fisiología de los animales.....              | 13 |
| 4.4 Daños celulares por efecto del estrés por calor.....         | 15 |
| 4.5 Mecanismos de protección celular.....                        | 15 |
| 4.5.1 Proteínas desacoplantes.....                               | 15 |
| 4.5.1.1 <i>Proteína desacoplante 2 (UCP2)</i> .....              | 18 |
| 4.5.1.2 <i>Proteína desacoplante 3 (UCP3)</i> .....              | 21 |
| 4.5.2 Proteínas de choque térmico.....                           | 25 |
| 4.5.2.1 <i>Proteína de choque térmico 70 (HSP70)</i> .....       | 28 |
| 4.5.2.2 <i>Proteína de choque térmico 90 (HSP90)</i> .....       | 31 |
| 4.5.3 Citocromo P450.....  | 33 |
| 4.5.3.1 <i>CYP3A</i> .....                                       | 34 |
| 4.6 Planteamiento del problema.....                              | 38 |
| V. HIPÓTESIS.....  | 40 |
| VI. OBJETIVO.....  | 41 |
| 6.1 Objetivos particulares.....                                  | 41 |
| VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                   | 42 |
| 7.1 Trabajo de campo.....  | 42 |
| 7.2 Extracción de ARNm.....                                      | 44 |
| 7.3 Retrotranscripción (RT).....                                 | 44 |
| 7.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)..... | 45 |
| 7.5 Análisis estadístico.....                                    | 45 |
| VIII. RESULTADOS.....  | 47 |
| 8.1 Expresión de proteínas en hígado.....                        | 47 |
| 8.2 Expresión de proteínas en tejido muscular.....               | 48 |
| IX. DISCUSIÓN.....   | 50 |
| X. CONCLUSIÓN.....   | 55 |
| XI. LITERATURA CITADA.....                                       | 56 |



## II. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Temperaturas máximas promedio de Baja California .....   | 8  |
| <b>Cuadro 2.</b> Temperaturas mínimas promedio de Baja California .....   | 9  |
| <b>Cuadro 3.</b> Precipitación promedio de Baja California .....  | 10 |
| <b>Cuadro 4.</b> Composición de dieta ofrecida a los cerdos en el experimento.....  | 43 |
| <b>Cuadro 5.</b> Oligonucleótidos específicos a cada ARN mensajero analizado, temperatura de alineación y concentraciones de MgCl <sub>2</sub> utilizadas. ....   | 46 |
| <b>Cuadro 6.</b> Condiciones de amplificación para las muestras de qPCR. ....   | 46 |
| <br>  |    |
| <b>Figura 1.</b> Clasificación de los climas de México de acuerdo con el INEGI.....   | 7  |
| <b>Figura 2.</b> Visión general de las temperaturas relevantes en el medio externo e interno de los seres humanos.....  | 12 |
| <b>Figura 3.</b> Modelo esquemático de la función de UCP: la activación de HNE disminuye la producción de ERO. ....   | 17 |
| <b>Figura 4.</b> Modelo esquemático de la función de UCP2 en células β-pancreáticas.....  | 20 |
| <b>Figura 5.</b> Síntesis y regulación de UCP2.....   | 21 |
| <b>Figura 6.</b> Modelo esquemático de las funciones de la UCP3.....  | 23 |
| <b>Figura 7.</b> Regulación de la proteína desacoplante 3.....  | 25 |
| <b>Figura 8.</b> Señalización de temperatura celular. ....  | 27 |
| <b>Figura 9.</b> Resumen de algunas de las principales señales fisiológicas que activan la forma inducible de la síntesis de proteína de choque térmico de 72-kDa (Hsp70) y mecanismo propuesto para el aumento de expresión de Hsp70 en una célula. .... | 29 |
| <b>Figura 10.</b> Plegamiento contra degradación.....   | 31 |
| <b>Figura 11.</b> Degradación de las proteínas clientes.....  | 33 |
| <b>Figura 12.</b> Esquema de oxidación de un xenobiótico. ....  | 37 |
| <b>Figura 13.</b> Localización del citocromo p450 .....   | 38 |
| <b>Figura 14.</b> Expresión relativa de la proteína de choque térmico 70 (HSP70).....   | 47 |
| <b>Figura 15.</b> Expresión relativa de citocromo P450 (P450).....  | 48 |
| <b>Figura 16.</b> Expresión relativa de la proteína desacoplante 3 (UCP3). ....   | 49 |





### III.INTRODUCCIÓN

En el planeta, existen diferentes tipos de climas a los cuales los seres vivos se han adaptado, sin embargo, existen zonas en las cuales las temperaturas extremas son típicas en todo año. En la actualidad se sabe que la combinación de factores ambientales como la temperatura, humedad, corrientes de aire y radiación solar se combinan provocando que los límites de las condiciones termoneutrales de los organismos se incrementen produciendo una condición conocida como estrés por calor. Esta condición se presenta cuando la temperatura ambiental incomoda al organismo para llevar a cabo sus actividades normales, lo que provoca una carga de calor superior a la capacidad de disipación del mismo y en consecuencia genera una serie de respuestas conductuales y fisiológicas como respuesta a la reducción del estrés, manteniendo de esta manera la homeostasis en el organismo (Bernabucci *et al.*, 2010).

A nivel fisiológico, en mamíferos como el cerdo, se han reportado prioridades en el flujo sanguíneo como un método para disipar más rápidamente el calor recibido o generado por el organismo, de forma que, se han observado redistribuciones sanguíneas que provocan vasoconstricciones en el tracto gastrointestinal y en órganos internos; así como una vasodilatación periférica (Lambert, 2008; Yan *et al.*, 2006). Como respuesta a este evento, el flujo de sangre y nutrientes disminuye y compromete la integridad celular.

A nivel celular, se ha reportado que el estrés por calor disminuye la síntesis de ADN, la transcripción, procesamiento de ARN, traducción, incrementa la producción de radicales libres (Sonna *et al.*, 2002), entre otros. De lo anterior se desprende el hecho de la importancia de conocer más acerca de la actividad que juegan las proteínas desacoplantes (UCP3), proteínas de choque térmico 70 (HSP70) y el citocromo P450 (P450), en cuanto a su participación en la disminución de radicales libres, en su intervención como chaperona celular y en la desintoxicación de la membrana mitocondrial, respectivamente.



Actualmente, son pocos los estudios realizados sobre la expresión de secuencias de ARNm en modelos experimentales como el cerdo; y en zonas que registran altas temperaturas en gran parte del año, como lo es el Valle de Mexicali; un sitio actualmente considerado como un excelente laboratorio natural donde se pueden realizar este tipo de trabajos (Morales *et al.*, 2014); por ello, se pretende estudiar los efectos que el calor severo desempeña en la eficiencia de amplificación del ARNm en las UCP3, HSP70 y P450 en tejido hepático y muscular de cerdo.

Se cree que las condiciones climáticas de calor intenso que ocurren en verano en el Valle de Mexicali provocan en los cerdos estrés por calor severo; y que esta condición modifica la expresión del ARNm de proteínas desacoplantes, de choque térmico y citocromo p450, en tejido hepático y muscular comparado con animales en confort térmico. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si el estrés por calor severo en cerdos en crecimiento modifica la expresión de la UCP3, HSP70 y P450, en hígado, músculo largo dorsal y músculo semitendinoso, en comparación con cerdos mantenidos en condiciones de confort térmico.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Fisiografía de la zona de estudio

De acuerdo con el Servicio Meteorológico Nacional (<http://smn.cna.gob.mx/>, 2014) México presenta diferentes climas, que de acuerdo con su temperatura se clasifican en cálido y templado; y por su humedad como húmedo, subhúmedo y muy seco. El clima en las diferentes regiones de México depende de factores como la altitud sobre el nivel del mar, la latitud geográfica y condiciones atmosféricas, entre otros.

El clima seco se ubica en mayor parte del territorio entre el centro y norte del país, región que comprende el 28.3% del territorio nacional; se caracteriza por la circulación de los vientos, escasa nubosidad y precipitaciones de 300 a 600 mm anuales, con temperaturas promedio que van de 22 a 26°C en algunas regiones, y en otras de 18 a 22°C, según el Sistema Meteorológico Nacional 2014.



**Figura 1.** Clasificación de los climas de México de acuerdo con el INEGI (<http://smn.cna.gob.mx> Citada el 10 de Julio de 2014).

El municipio de Mexicali se ubica en el extremo noreste del país, y posee un territorio de 13,935 km<sup>2</sup> de la superficie del estado de Baja California. Económicamente se dedica a la agricultura (una de las zonas más importantes en la producción de algodón y trigo), a la ganadería y a la industria (INEGI, 2014). En esta región de clima muy seco se registran temperaturas de hasta 49°C en el verano



de 1993 (SMN, 2014); por esta razón la ciudad de Mexicali se considera una de las más calurosas del país.

#### 4.1.1 Temperatura

Las temperaturas registradas en Mexicali y su Valle varían dependiendo de los meses del año; se han registrado seis meses en donde se presentan las temperaturas más altas y los seis meses restantes las temperaturas más bajas, en esta última temporada se registran las lluvias escasas que no sobrepasan los 100 a 300 mm anuales.

Los Cuadros 1 y 2 presentan el promedio mensual de la temperatura máxima y mínima, registradas en el período 2004-2014 en Baja California. Se observa que en los meses de junio a septiembre los promedios mensuales rebasan los 30°C; mientras que de octubre a marzo se registran las temperaturas más bajas.

**Cuadro 1.** Temperaturas máximas promedio de Baja California (Servicio Meteorológico Nacional <http://smn.cna.gob.mx>, 2014).

| AÑO  | ENE  | FEB  | MAR  | ABR  | MAY  | JUN  | JUL  | AGO  | SEP  | OCT  | NOV  | DIC  | ANUAL |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 2004 | 19.9 | 19.5 | 27.2 | 26.1 | 29.9 | 31.3 | 35.2 | 34.6 | 34.2 | 26.5 | 20.9 | 19.5 | 27.1  |
| 2005 | 20.4 | 18.9 | 22.3 | 24.9 | 29.0 | 30.4 | 35.1 | 34.1 | 32.5 | 27.8 | 25.1 | 21.2 | 26.8  |
| 2006 | 21.1 | 22.0 | 19.9 | 23.7 | 28.6 | 33.5 | 35.2 | 33.9 | 32.7 | 27.4 | 25.1 | 21.9 | 27.1  |
| 2007 | 18.3 | 20.8 | 24.9 | 24.2 | 27.2 | 31.8 | 33.3 | 34.9 | 31.7 | 28.8 | 25.3 | 19.2 | 26.7  |
| 2008 | 17.4 | 20.2 | 23.1 | 26.2 | 26.9 | 32.2 | 32.4 | 33.4 | 33.4 | 30.6 | 25.6 | 19.4 | 26.7  |
| 2009 | 21.6 | 20.3 | 22.7 | 24.5 | 30.1 | 29.5 | 33.2 | 34.7 | 34.5 | 26.7 | 24.7 | 19.4 | 26.8  |
| 2010 | 20.5 | 19.9 | 21.4 | 22.8 | 26.2 | 30.8 | 33.8 | 35.0 | 33.7 | 28.5 | 23.3 | 22.5 | 26.5  |
| 2011 | 20.6 | 17.2 | 23.6 | 25.1 | 26.9 | 31.3 | 32.1 | 33.6 | 32.1 | 28.1 | 20.9 | 17.4 | 25.0  |
| 2012 | 21.8 | 19.8 | 21.8 | 24.8 | 30.6 | 31.3 | 31.1 | 34.4 | 33.1 | 30.0 | 24.3 | 20.4 | 27.0  |
| 2013 | 19.0 | 20.1 | 26.6 | 27.1 | 31.0 | 33.7 | 33.1 | 34.0 | 33.0 | 29.4 | 24.8 | 20.3 | 27.7  |
| 2014 | 23.7 | 24.0 | 25.9 | 27.9 | 31.2 |      |      |      |      |      |      |      |       |



**Cuadro 2.** Temperaturas mínimas promedio de Baja California (Servicio Meteorológico Nacional <http://smn.cna.gob.mx>,2014).

| AÑO  | ENE  | FEB  | MAR  | ABR  | MAY  | JUN  | JUL  | AGO  | SEP  | OCT  | NOV  | DIC | ANUAL |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-------|
| 2004 | 5.2  | 5.8  | 10.4 | 10.9 | 14.1 | 15.4 | 19.4 | 18.7 | 17.2 | 12.6 | 7.3  | 6.4 | 12.0  |
| 2005 | 7.1  | 8.1  | 8.8  | 9.6  | 13.5 | 15.6 | 20.0 | 20.0 | 16.9 | 13.6 | 10.8 | 6.9 | 12.6  |
| 2006 | 6.6  | 7.7  | 7.1  | 9.9  | 14.0 | 18.7 | 19.4 | 20.1 | 18.2 | 13.3 | 10.4 | 6.7 | 12.7  |
| 2007 | 4.9  | 7.0  | 9.5  | 10.2 | 13.3 | 15.8 | 20.7 | 21.3 | 17.4 | 13.8 | 11.5 | 7.1 | 12.7  |
| 2008 | 5.8  | 6.5  | 7.9  | 10.1 | 12.0 | 15.5 | 18.6 | 20.1 | 18.4 | 14.1 | 11.3 | 7.7 | 12.3  |
| 2009 | 8.0  | 6.6  | 7.4  | 9.4  | 15.3 | 15.9 | 19.1 | 19.8 | 19.7 | 12.1 | 9.0  | 7.0 | 12.4  |
| 2010 | 7.4  | 7.7  | 8.2  | 9.1  | 11.3 | 16.1 | 20.6 | 21.5 | 18.4 | 15.8 | 10.1 | 8.3 | 12.9  |
| 2011 | 7.6  | 5.0  | 9.1  | 11.1 | 12.3 | 16.1 | 18.8 | 19.0 | 18.6 | 13.8 | 8.6  | 3.5 | 12.0  |
| 2012 | 9.4  | 6.5  | 6.8  | 10.3 | 13.6 | 16.6 | 17.6 | 21.5 | 19.3 | 14.6 | 10.1 | 7.6 | 12.8  |
| 2013 | 6.9  | 6.1  | 10.3 | 11.3 | 15.9 | 17.4 | 20.0 | 19.8 | 20.5 | 15.0 | 11.5 | 8.0 | 13.6  |
| 2014 | 10.2 | 10.1 | 12.5 | 13.9 | 17.0 |      |      |      |      |      |      |     |       |

De acuerdo con los cuadros anteriores, las temperaturas máximas y mínimas están estrictamente divididas en dos periodos anuales (verano e invierno), tomando en cuenta que los datos mostrados son promedios mensuales que se equilibran con los rangos menor y mayor registrados en todo el estado de Baja California (el cual presenta tres tipos de clima). Sin embargo, las temperaturas ambientales que se presentan durante el verano en el Valle de Mexicali pueden exceder los 45°C (SMN 2014).

#### 4.1.2 Precipitación

La precipitación en el estado de Baja California es extremadamente baja con respecto a otras partes de la República Mexicana. El Cuadro 3 muestra el promedio mensual de precipitación de los años de 2004 a 2014. Al ser ésta una región con



clima muy seco, la precipitación no excede los 300mm anuales, misma que se presenta principalmente en los meses de invierno.

**Cuadro 3.** Precipitación promedio de Baja California, valores presentados en milímetros (mm; Servicio Meteorológico Nacional <http://smn.cna.gob.mx>, 2014).

| AÑO  | ENE  | FEB  | MAR  | ABR  | MAY  | JUN | JUL  | AGO  | SEP  | OCT   | NOV  | DIC   | ANUAL |
|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|-------|------|-------|-------|
| 2004 | 10.2 | 82.3 | 12.9 | 5.4  | 0.0  | 0.0 | 0.0  | 1.4  | 0.0  | 147.9 | 16.7 | 80.7  | 357.5 |
| 2005 | 49.6 | 90.3 | 21.8 | 4.7  | 1.1  | 0.2 | 1.6  | 5.8  | 1.0  | 7.6   | 0.36 | 0.6   | 184.6 |
| 2006 | 2.8  | 16.4 | 48.0 | 20.5 | 11.4 | 0.0 | 1.5  | 0.0  | 1.3  | 0.7   | 1.7  | 6.2   | 110.5 |
| 2007 | 12.8 | 28.6 | 3.4  | 5.6  | 0.6  | 0.0 | 0.0  | 0.0  | 1.5  | 0.2   | 31.2 | 21.6  | 105.5 |
| 2008 | 64.1 | 35.3 | 0.8  | 0.0  | 0.7  | 0.0 | 1.9  | 12.6 | 0.1  | 0.2   | 33.6 | 111.9 | 261.2 |
| 2009 | 3.0  | 56.1 | 0.4  | 6.0  | 0.7  | 1.1 | 0.0  | 1.0  | 0.4  | 0.7   | 12.4 | 33.6  | 115.4 |
| 2010 | 79.6 | 57.0 | 23.0 | 30.3 | 0.0  | 0.0 | 0.4  | 2.9  | 3.9  | 29.7  | 8.9  | 61.7  | 297.4 |
| 2011 | 5.0  | 75.2 | 29.9 | 10.5 | 7.1  | 0.0 | 9.7  | 2.7  | 3.5  | 4.2   | 39.2 | 19.8  | 206.8 |
| 2012 | 4.0  | 27.5 | 37.6 | 17.6 | 0.0  | 0.1 | 4.3  | 7.8  | 11.1 | 1.9   | 5.6  | 32.8  | 150.3 |
| 2013 | 29.8 | 12.2 | 6.3  | 0.4  | 3.4  | 3.8 | 30.6 | 31.6 | 33.5 | 13.4  | 17.4 | 12.3  | 193.8 |
| 2014 | 3.6  | 14.3 | 9.6  | 3.3  | 1.8  | 0.7 |      |      |      |       |      |       |       |

Durante el verano el clima en el Valle de Mexicali es tibio en las madrugadas y caluroso al medio día; la mayor temperatura se registra alrededor de las 3:00 pm (SMN, 2014). En invierno, durante la noche la temperatura en las laderas de las montañas aumenta a medida que pasa la noche, lo cual guarda una relación inversa al comportamiento habitual de verano (Munguía, 2003).

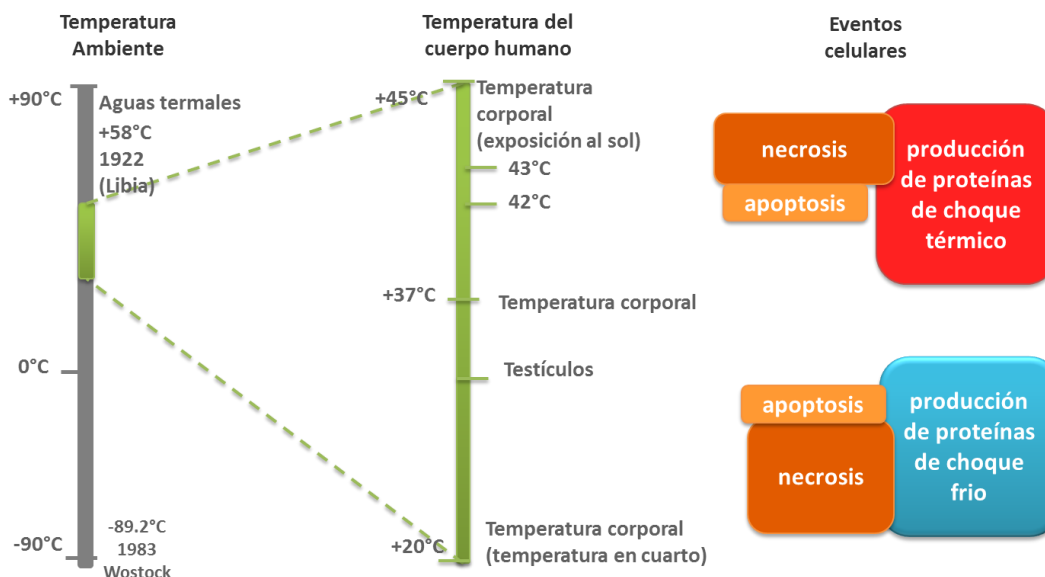
#### 4.2 Estrés térmico

A lo largo y ancho del planeta, existen diferentes tipos de climas a los cuales los seres vivos se han adaptado; desde los ambientes extremos a los cuales hemos sobrevivido, refiriéndonos a los  $-89.2^{\circ}\text{C}$  que fueron registrados en Wostock,



Antártida en julio 21 de 1983, hasta los 58 °C registrados en septiembre 13 de 1922 en Al Azizyah, Libia. Para lograr adaptarse a esta variedad de ambientes, los organismos han desarrollado mecanismos para la sobrevivencia que les permiten mantener su metabolismo correctamente en diferentes rangos de temperatura (Katschinski, 2004).

Por otra parte, ante cambios drásticos de temperatura, ya sea temperaturas extremadamente bajas o altas, se desencadenan en los organismos situaciones conocidas como hipotermia (cuando la temperatura ambiental es menor a 30°C) o hipertermia (cuando la temperatura ambiental es mayor a 40°C), respectivamente; estas situaciones, sobre todo en mamíferos pueden tener consecuencias muy serias, dependiendo del tiempo de exposición y adaptabilidad de organismos. En mamíferos, estos cambios son detectados por receptores especializados conocidos como neuronas somato sensoriales; estos receptores pertenecen a una familia potencial de receptores con canales de iones que se encargan de convertir la temperatura en potenciales eléctricos, mismos que las células perciben y reaccionan aumentando o disminuyendo la producción de cierto tipo de proteínas (Katschinski, 2004). En la Figura 2, se muestran los rangos de temperatura en los que pueden ocurrir ciertos daños a diversas partes del cuerpo humano.





**Figura 2.** Visión general de las temperaturas relevantes en el medio externo e interno de los seres humanos. El termómetro de la izquierda demuestra la temperatura ambiente en la biosfera de los humanos (medio externo) y el termómetro de la derecha muestra la temperatura del cuerpo humano (medio interno). En el lado derecho de la imagen se presenta los eventos celulares que se han demostrado ocurren a temperaturas in vitro (Tomado y modificado de Katschinski, 2004).

Para estudiar los mecanismos de adaptación de los organismos a diferentes ambientes se han llevado a cabo un sinnúmero de estudios tanto a nivel de poblaciones o individuos como a nivel celular y molecular. Por ejemplo, a nivel molecular, Sonna *et al.* (2002), demostraron que los cambios drásticos de temperatura (43°C) en células mononucleadas de sangre periférica sobre y sub expresan 227 y 168 genes respectivamente de 12 600 diferentes ya investigados. Resultados de trabajos similares han ido permitiendo el mejor entendimiento de la fisiología y adaptación de los organismos a condiciones ambientales adversas.

### 4.3 Estrés por calor

Algunos autores han detallado que cuando las variables ambientales, como la temperatura ambiente, la humedad, las corrientes de aire y la radiación solar se combinan e incrementan, alcanzan valores que superan los límites de las condiciones termoneutrales para el organismo, éstos entran en una condición conocida como *estrés por calor*. El estrés por calor ocurre cuando la temperatura ambiental incomoda al organismo para llevar a cabo sus actividades normales, lo que resulta en una carga de calor superior a la capacidad de disipación del mismo (ya sea por una producción interna y/o ambiental), y en consecuencia genera una serie de respuestas fisiológicas y conductuales para reducir el estrés (Bernabucci *et al.*, 2010) y tratar de mantener la homeostasis en el organismo.

#### 4.3.1 Efectos del estrés por calor en la producción animal

En animales de producción, como el cerdo, el estrés por calor tiene un impacto negativo que se refleja principalmente en la reducción del consumo de





alimento el cual afecta su crecimiento. Lo anterior, se ha relacionado directamente con la alteración en la jerarquía de la síntesis de proteína en tejidos (Baumgard y Rhoads, 2013). Algunos otros factores afectados son, por ejemplo, la reducción de parámetros reproductivos y disminución en el rendimiento de la canal. También se ha reportado la afectación de la salud de los animales, lo que provoca un incremento en los costos de producción en comparación con animales en condiciones de confort. En regiones como el Valle de Mexicali las mayores pérdidas en la producción pecuaria por efecto del estrés por calor se registran durante los meses de verano (Baumgard y Rhoads, 2012).

Las cerdas lactantes y sus lechones requieren distintas condiciones termoneutrales, lo que hace aún más difícil el manejo de esta etapa de producción. En los últimos años, se han reportado en cerdos criados bajo estrés por calor una disminución en su masa muscular y un aumento en tejido adiposo (Heath, 1983; Heath, 1989; Bridges *et al.*, 1998; Collin *et al.*, 2001), sin embargo, este fenómeno no es único de esta especie, ya que se ha reportado también en roedores y aves de corral en crecimiento (Baziz *et al.*, 1996; Geraert *et al.*, 1996; Yunianto *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2007).

#### 4.3.2 Efectos en la fisiología de los animales

El estrés por calor altera la fisiología, metabolismo, bioquímica, y respuesta celular en modelos animales (Banerjee *et al.*, 2009). Los primeros cambios observados en los animales expuestos al estrés por calor incluyen modificaciones en sus constantes fisiológicas. En mamíferos expuestos a estrés por calor, se ha observado una redistribución en la circulación sanguínea; en esas condiciones se produce vasoconstricción en el tracto gastrointestinal y órganos internos, así como vasodilatación en vasos periféricos, lo que cambia la prioridad del flujo sanguíneo, alternativa que permite disipar más rápidamente parte del calor recibido o generado por el organismo (Lambert, 2008); en consecuencia a este mecanismo, el flujo de sangre y nutrientes pudiera disminuir en epitelio intestinal, comprometiendo la integridad de la barrera intestinal (Yan *et al.*, 2006). Por otra parte, Hall *et al.*, 1999,



reportaron que la reducción del flujo sanguíneo en el tracto gastrointestinal puede causar hipoxia tisular que agota las reservas de ATP y puede causar acidosis intracelular modificando la actividad de la bomba de protones. Este agotamiento de ATP y la acidosis generada, pone en peligro las uniones estrechas del epitelio intestinal lo que puede dar lugar a la translocación a través de la membrana a patógenos y endotoxinas bacterianas; provocando endotoxemias, septicemias y finalmente la muerte (Lambert, 2009).

En los últimos años, se han generado estudios que demuestran que en cerdos la constante exposición a estrés por calor incrementa su tasa de respiración y su temperatura corporal, disminuye la ganancia de peso y reduce significativamente el consumo de alimento *ad libitum* (Pearce *et al.*, 2013). Además, en respuesta al estrés por calor, los cerdos que no poseen glándulas sudoríparas funcionales incrementan su tasa de respiración, pérdida de agua por el jadeo y en consecuencia, mayor consumo de agua dependiendo casi totalmente de ese jadeo para la disipación de calor (Fuquay, 1981). Además se ha observado un aumento de la frecuencia cardíaca de los cerdos en estrés por calor (Yousef, 1985; Horowitz, 2002). Como respuesta a esta pérdida de agua para disipar el calor, se genera una disminución en la concentración de minerales, en particular dentro de los compartimientos vasculares y extracelulares, los cuales interfieren en el organismo para mantener de forma adecuada el equilibrio osmótico y la presión arterial (Silanikove, 1994).

Por otra parte, si la exposición al estrés por calor es prolongada, acontece un proceso de adaptación o sobrevivencia para mantener la homeostasis del animal (Horowitz, 2002). Según los estudios de Johnson (1980) y Yousef (1987), esta adaptación se caracteriza por la disminución en la secreción de hormona de crecimiento (GH), alteración en los niveles de catecolaminas y glucocorticoides y reducción en los niveles circulantes de tiroxina y triiodotironina; en consecuencia se observa una disminución en la tasa metabólica del organismo.



#### 4.4 Daños celulares por efecto del estrés por calor

Los animales que padecen de estrés por calor presentan modificaciones en su fisiología que son reflejo de cambios específicos de algunos mecanismos a nivel celular. En general, se ha reportado que la respuesta al estrés por calor disminuye la síntesis de ADN, la transcripción, procesamiento de ARN y la traducción. El estrés por calor además, inhibe las etapas del ciclo celular, provoca desnaturalización de proteínas, incremento en la degradación de proteínas a través de la vía proteosomal y/o lisosomal, modifica los componentes del citoesqueleto, altera el metabolismo ligado a una reducción neta del ATP celular, y cambia la permeabilidad de la membrana ligada a un incremento en  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Sonna *et al.*, 2002).

#### 4.5 Mecanismos de protección celular

##### 4.5.1 Proteínas desacoplantes

Las proteínas desacoplantes, conocidas mejor como UCP (uncoupling protein, en inglés), son miembros de una familia acarreadora de aniones, localizadas en la membrana mitocondrial interna. En esta familia también se encuentran la translocasa nucleótido adenina (ANT), un antitransportador ATP/ADP y otros múltiples metabolitos e iones transportadores (Mookerjee *et al.*, 2010).

Estas proteínas poseen una estructura tripartita que consiste en tres dominios repetidos con cerca de 100 residuos, cada uno con dos regiones  $\alpha$ -hélice transmembranal hidrófobos que abarcan la capa de fosfolípidos, en donde el extremo N y C terminal se insertan dentro del espacio mitocondrial interno (Hagen y Lowell., 2000). Cada repetición contiene un bucle hidrofílico largo orientado hacia el lado de la matriz de la membrana unidos a dos hélices; la mayoría de las UCP tienen un peso molecular aproximado de 30kD; hasta la actualidad se cree que la forma funcional de las UCP es en forma de homodímero (Echtay, 2007).

Se ha propuesto que las UCP disipan el gradiente de protones al permitir la re-entrada de estos a la matriz mitocondrial durante la generación oxidativa de ATP,

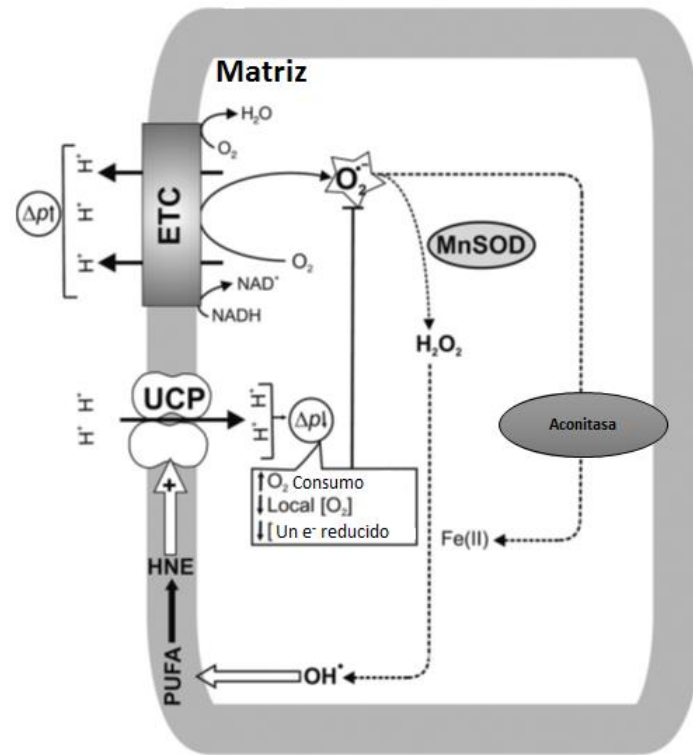


resultando en el desacoplamiento de la cadena respiratoria y de la producción de calor (Aquila *et al.*, 1985). El desacoplamiento por estas proteínas funcionan como un mecanismo conservado evolutivamente que atenúa la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), lo que explicaría la homología de estas proteínas en animales homeotermos (Mookerjee *et al.*, 2010); sin embargo, existe una controversia acerca de la actividad real del desacoplamiento de estas, ya que se ha observado que en algunos sistemas podría existir una modificación en la estructura de la membrana en lugar de sobreexpresión de la proteína (Harper *et al.*, 2002).

Ricquier y Bouillaud (2000) sugieren que las UCP pueden participar en la producción de ATP en mitocondria y en el control de la relación NADH/NAD<sup>+</sup>. En consecuencia, la fuga de protones desde la membrana mitocondrial interna podría representar un mecanismo importante para la disipación de energía o la producción de calor en animales en reposo (Dridi *et al.*, 2004).

La oxidación mitocondrial de los combustibles genera un gradiente de potencial electroquímico a través del bombeo de protones hacia el exterior por la cadena de transporte de electrones, como se muestra en la Figura 3. En este mecanismo los protones regresan a la matriz mitocondrial a través de la F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATP sintasa que forma ATP con ADP y fosfato inorgánico. La fuga de protones o “desacoplamiento” ocurre cuando el flujo de protones que surge de este sistema, tiene un corto circuito interno, independientemente de ATP sintasa F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>, resultando en la producción de calor en lugar de la síntesis de ATP (Brand *et al.*, 1994; Rolfe *et al.*, 1999).

Actualmente se han descrito 5 proteínas desacoplantes, de las cuales UCP1 (también conocida como termogenina, principal regulador de la termogénesis en recién nacidos) ha sido la más estudiada. Esta se describió a partir de la adenina nucleótido translocasa, una estructura cristalizada de un miembro de la familia acarreadora mitocondrial; fue identificada por primera vez por Nichols *et al.*, (1978) y clonada por Bouillaud *et al.*, (1988) y Kozak *et al.*, (1988).



**Figura 3.** Modelo esquemático de la función de UCP: la activación de HNE disminuye la producción de ERO. Una alta fuerza de protón ( $\Delta p$ ) a través de la membrana interna mitocondrial conduce a un aumento en la reducción de un electrón en la membrana capaz de reducir el oxígeno a superóxido. El superóxido producido en la matriz por la cadena de transporte de electrones (CTE) (principalmente del complejo I y II) es convertido a  $H_2O_2$  por la enzima superóxido dismutasa –Mn (Mn-SOD). Algunos superóxidos escapan a esta conversión y atacan a la aconitasa, liberando Fe (II) del sitio activo. Fe (II) cataliza la producción de radicales hidroxil ( $^*OH$ ) del  $H_2O_2$ . Los radicales hidroxil (o  $HO_2^*$  producidos en la membrana) inician la reacción en cadena de radicales libres en la cadena de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la membrana fosfolipídica liberando hidroxinonal (HNE) y otros aldehídos reactivos. Estos aldehídos modifican covalentemente a las UCP, activando la conductancia de protones y disminuyendo la  $\Delta p$ . La reducción en  $\Delta p$  conduce a la disminución de concentración de reductores de un-electrón e incrementos en el consumo de  $O_2$  (reducción de la concentración local de  $O_2$ ). Ambos efectos sirven para disminuir la producción de ERO en la matriz. Así que HNE actúa como una molécula de señalización para activar UCP en un mecanismo de retroalimentación negativa que protege a la célula en contra de la producción perjudicial de un exceso de ERO. (Tomado y modificado de Echtay, 2007).



En 1997, se clonaron por primera vez dos genes estrechamente relacionados a UCP1, se trataba de UCP2 y UCP3. La secuencia de aminoácidos de estos dos genes fueron calculados aproximadamente en un 60% de similitud con UCP1. A partir de ese suceso se han identificado más secuencias a las cuales se les ha nombrado UCP4 y UCP5, ambas expresadas en mayor medida en el sistema nervioso central (Mao *et al.*, 1999; Sanchis *et al.*, 1998). Sin embargo, es la UCP2 quien se expresa en la mayoría de los tejidos (Fleury *et al.*, 1997; Gimeno *et al.*, 1997). En el caso de UCP2 y UCP3, se ha especulado que estas funcionan como transportadoras de ERO, sensores de sustrato o transportadores de ácidos grasos (Jaburek *et al.*, 2004; Schrauwen y Hesselink, 2004; Bouillaud, 2009).

#### 4.5.1.1 Proteína desacoplante 2 (UCP2)

El gen de UCP2 fue clonado en 1997 por Fleury *et al.*, (1997) y Gimeno *et al.*, (1997), quienes demostraron que tiene un 59% de homología con UCP1. UCP2 se localiza de forma ubicua en la membrana interna mitocondrial y presenta un peso de 31-34 kDa, al igual que UCP1 se cree que su función es como homodímero.

El ARNm de UCP2 se encuentra con mayor frecuencia en bazo, timo, células  $\beta$ -pancreáticas, corazón, hígado, pulmón, músculo esquelético, tejido adiposo blanco y café, estómago, testículos y macrófagos (Fleury *et al.*, 1997; Gimeno *et al.*, 1997; Arsenijevic *et al.*, 2000); en menor proporción en cerebro, riñón, hígado y músculo (Nedergaard y Cannon, 2003; Mattiasson y Sullivan, 2006).

Análisis de expresión de esta proteína también han reportado que la cantidad de ARNm de ésta en un tejido no es proporcional la cantidad de proteína UCP2 encontrada en algunos órganos (Pecqueur *et al.*, 2001).

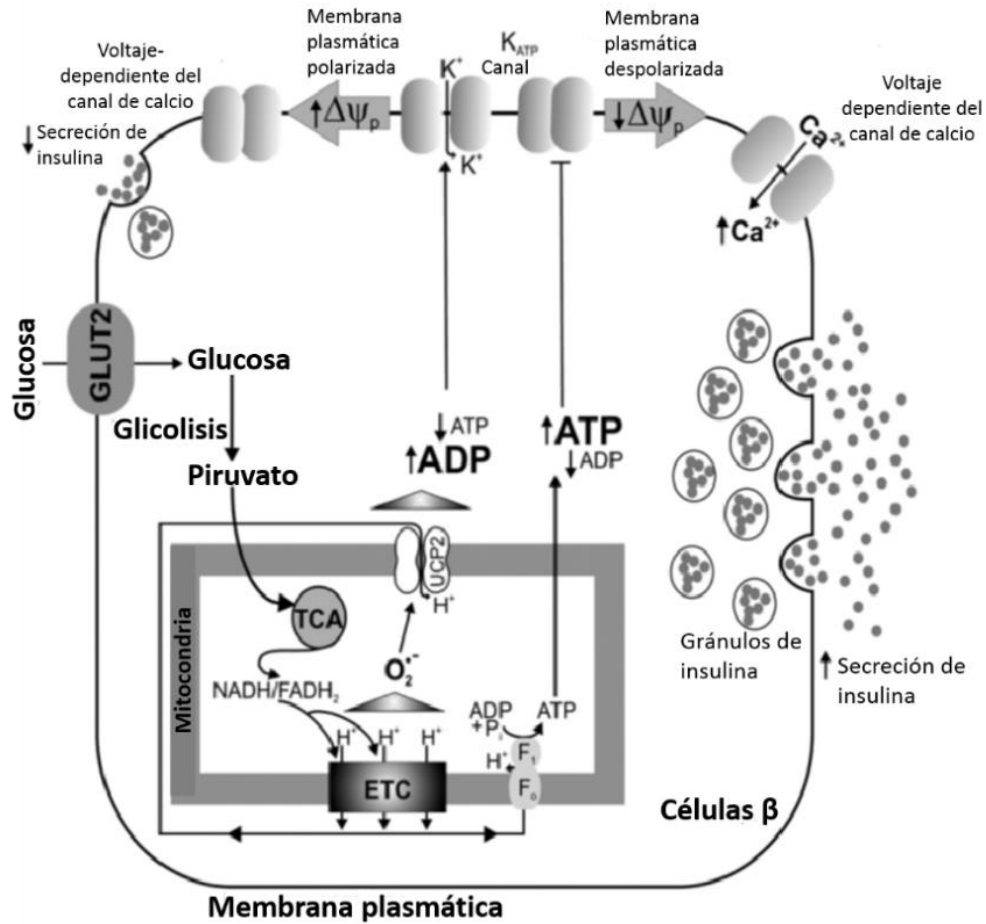
Se ha reportado que UCP2 es inducido por agentes estresantes como lipopolisacáridos (Pecqueur *et al.*, 2001;) TNF $\alpha$  (Lee *et al.*, 1999; Degasperri *et al.*, 2008), ácidos grasos (Medvedev *et al.*, 2002), daños al hígado ocasionados por altos niveles de ERO (Demori *et al.*, 2008), obesidad (Surwit *et al.*, 1998), cáncer (Baffy, 2010) y diabetes (Chu y Leung, 2007; Xie *et al.*, 2008; Lacraz *et al.*, 2009).



En del sistema inmune, neuronal y en células  $\beta$ -pancreáticas, UCP2 podría controlar de forma negativa la secreción de insulina en islotes de células  $\beta$ -pancreáticas (Bezaire, 2007; Figura 4). Además, se le ha involucrado en la patología de la diabetes tipo II (Zhang *et al.*, 2001), en la regulación negativa de la generación de ERO en macrófagos (Yonezawa *et al.*, 2009), en la relación con la obesidad adulta y la hiperinsulinemia (Fleury *et al.*, 1997) y de forma general con desórdenes metabólicos en adultos (Yonezawa *et al.*, 2009).

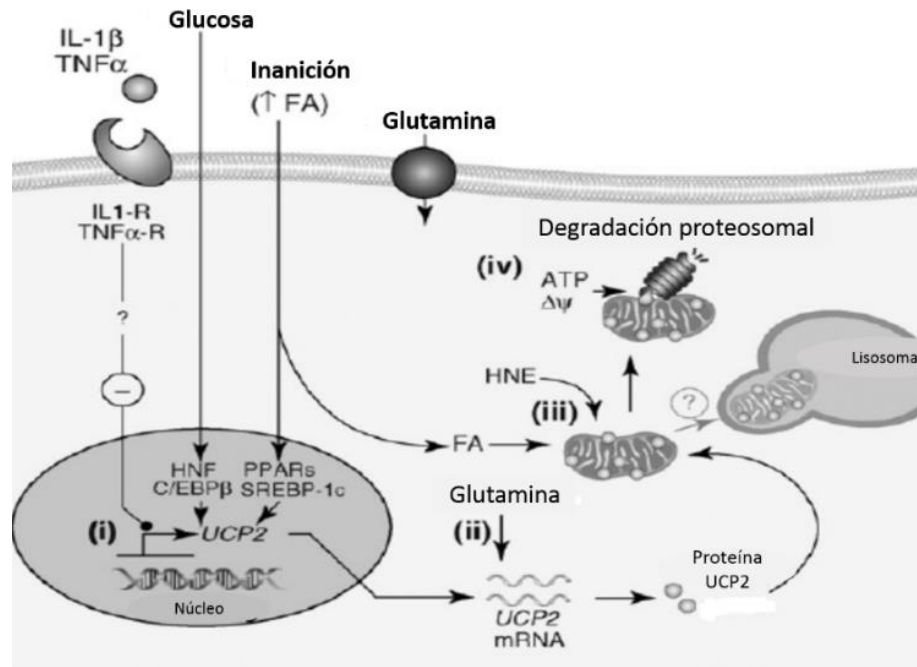
Entre otras funciones supuestas para UCP2 se encuentran la termogénesis (por la conservación de los residuos que involucran el transporte de protones y su relaciones con los nucleótidos), acarreadores de ácidos grasos, mediación de la secreción de insulina y protección en contra de ERO (Collin *et al.*, 2005). Se sabe que UCP2 modula la actividad del desacoplamiento de la cadena respiratoria, especialmente a nivel de un electrón  $O_2$ , por medio de un reductor como la coenzima Q (CoQ) que reduce la producción del anión superóxido y la generación de ERO (Negre-Salvayre *et al.*, 1997; Skulachev, 1997).

De acuerdo con Azzu y Brand (2009) la regulación de UCP2 ocurre en varios pasos, incluyendo la transcripción, traducción, modulación de la actividad de proteínas y su degradación (Figura 5). Sergey *et al.*, (1997), han sugerido que la producción de ERO mitocondrial está relacionada con el potencial de membrana, de forma que los mecanismos involucrados en la alteración del potencial redox de los acarreadores de la cadena respiratoria conducen a una mayor probabilidad de reducir los componentes donando electrones al oxígeno y generación del superóxido. De esta forma UCP2 media la atenuación de ERO a través de la fuga de protones a nivel mitocondrial, actividad que puede ser de protección o perjudicial, dependiendo del contexto.



**Figura 4.** Modelo esquemático de la función de UCP2 en células β-pancreáticas. La glucosa elevada en plasma conduce a un incremento en la concentración citoplasmática debido a la absorción vía transportadores de glucosa (GLUT2). Este incremento suministra piruvato al ciclo de los ácidos tricarboxílicos mitocondrial (TCA), que conduce a un incremento en la relación NADH/NAD<sup>+</sup>, una elevada fuerza motriz de protones mitocondriales y un incremento en la síntesis de ATP. El incremento en la relación ATP/ADP causa un cierre en los canales de K<sub>ATP</sub>, lo que conduce a la despolarización del potencial de membrana plasmática (Δψ) y una entrada de Ca<sup>2+</sup>, desencadenando la liberación de insulina. La actividad de UCP2 disipa la fuerza motriz de protones, disminuyendo la relación ATP/ADP y como una consecuencia disminuye la secreción de insulina. (Tomado y modificado de Green *et al.*, 2004).





**Figura 5.** Síntesis y regulación de UCP2. Está regulada por: (i) Niveles transcripcionales y (ii) translacionales. (iii) La actividad de la proteína puede ser regulada por activadores agudos como FA y HNE. (iv) La desactivación de la proteína puede ocurrir por la inhibición de un ligando y por la rápida rotación de la proteína UCP2, probablemente por el sistema de ubiquitinación proteosomal. Abreviaciones:  $\Delta\psi$ , potencial de membrana mitocondrial; C/EBP $\beta$ , CCAAT- proteína de unión al promotor  $\beta$ ; FA, ácidos grasos; HNF, factor nuclear hepático; IL-1 $\beta$ , interleucina -1 $\beta$ ; PPAR, receptor activado para el proliferador de peroxisomas; SREBP-1c, elemento regulador de esteroles proteína de unión 1-c (Tomado de Azzu y Brand, 2009).

#### 4.5.1.2 Proteína desacoplante 3 (UCP3)

La UCP3 fue identificada en 1997; tiene un 60% de homología con UCP1 y es única en su tipo, ya que se expresa en músculo esquelético; también se ha encontrado en corazón y en menor grado en tejido adiposo café, sin embargo, hasta la fecha su papel sigue siendo poco claro (Echtay, 2007).

Al principio se creía que el funcionamiento de UCP3 estaba ligado a la fuga de protones, sin embargo, poco después se determinó que esta no es la causa

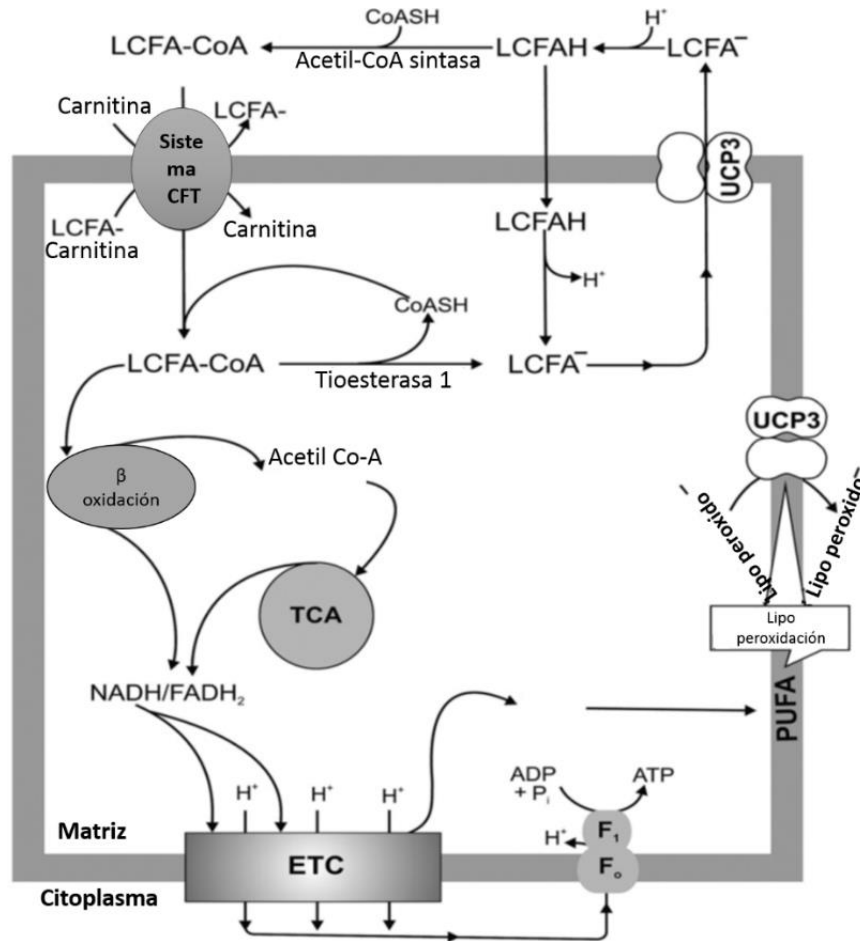


inicial, de hecho parece que el transportador nucleótido adenina representa la mayor la fuga de protones en la membrana mitocondrial (Brand *et al.*, 2005).

Según Schrauwen y Hesselink (2004) UCP3 funciona como transportador de aniones de ácidos grasos, actuando como protector de lipoperoxidación. De esta forma, cuando el suministro de ácidos grasos es alto y atraviesan la membrana mitocondrial, éstos no se metabolizan y se acumulan en la matriz mitocondrial debido a la falta de acetil CoA sintasa, lo que incrementa el riesgo de la lipoperoxidación (Figura 6). También, se ha hipotetizado que la UCP3 actúa en conjunto con la tioesterasa mitocondrial (MTE-1) para liberar a la CoA y exportar a los aniones de los ácidos grasos; la exportación de estos aniones provenientes de la matriz mitocondrial a través de UCP3 no solo permite las mayores tasas de oxidación de ácidos grasos, sino que también puede reducir el potencial de membrana y mitigar la producción de ERO (Katsumata *et al.*, 2004).

Himms-Hagen y Harper, (2001), propusieron un modelo en donde UCP3 actúa con la Tioesterasa I mitocondrial (MTEI) para exportar los ácidos grasos de la mitocondria cuando la oxidación de estos es predominante; lo que indicaría que otra de sus principales funciones es la manipulación de ácidos grasos para regular el gasto energético.

Algunos estudios demuestran la importancia de UCP3 en algunos procesos patológicos y fisiológicos. Entre estos estudios se encuentran aquellos conducidos en el contexto del balance de energía y obesidad, resistencia a la insulina, lipoperoxidación y estrés oxidativo (Clapham *et al.*, 2000). En el caso de la termogénesis, hasta la actualidad no se han definido cuales son los mecanismos exactos con los cuales se relaciona (Harper *et al.*, 2002; Liebig *et al.*, 2004).



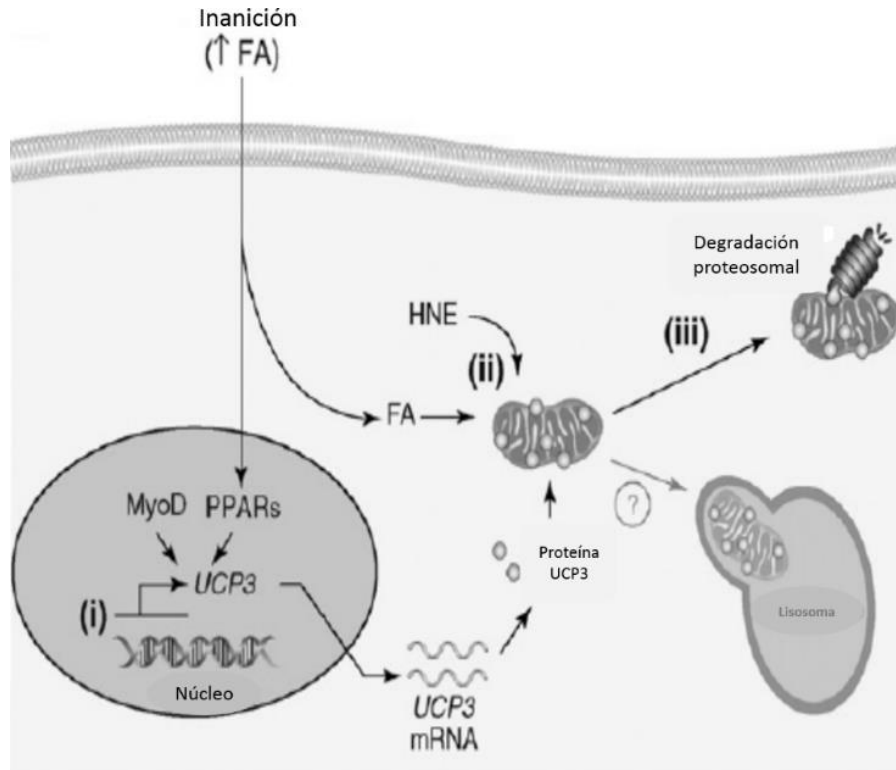
**Figura 6.** Modelo esquemático de las funciones de la UCP3. Los aniones de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) de la matriz mitocondrial pueden ser derivados ya sea desde la entrada de cadena larga de ácidos grasos no esterificados que entraron en la matriz mitocondrial por flip-flop a través de la membrana interna mitocondrial o por hidrólisis de ésteres de ácidos grasos por tioesterasa mitocondrial 1. Este último libera CoASH a la matriz mitocondrial, una coenzima limitante de la velocidad para la  $\beta$ -oxidación y el ciclo del ácido tricarboxílico. LCFA se exportan desde la matriz por UCP3 para la reactivación de acil-coenzima A sintetasa en el espacio intermembrana. UCP3 se activa para remover los excesos de LCFA que han entrado en la matriz mitocondrial independientemente del sistema de transporte de ácidos grasos-carnitina y así facilitan la oxidación de estos. El ciclo de los ácidos grasos protonados entra y la exportación de aniones de estos mismos causa una conductancia neta de protones como una reacción secundaria. También se ha propuesto que UCP3 exporta aniones peróxido de lípidos generados de la interacción de ERO en la matriz con ácidos grasos insaturados de la cara interna de la membrana mitocondrial. (Tomado y modificado de Echta, 2007).



Se ha reportado que UCP3 se activa por ERO o subproductos de la lipoperoxidación, a su vez esto genera un desacoplamiento ligero, despolarización de la membrana, y posteriormente mitigación de ERO. Brand y Esteves (2005), mencionan que una de las especies reactivas de oxígeno que se generan en mayor cantidad es el superóxido producido en el complejo I y II en la Cadena de Transporte de Electrones (CTE). Esto a consecuencia del alto contenido de oxígeno molecular o a un estado altamente reducido; sin embargo, el oxígeno molecular también puede generarse de otras fuentes como peróxido de hidrógeno (Giorgio *et al.*, 2005; Vesce *et al.*, 2005); aunque se ha demostrado que este es eliminado por otros complejos desacoplantes como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, entre otros.

Brand *et al.*, (2005) proponen que el mecanismo de UCP3 para mitigar la producción de ERO se lleva a cabo por medio de la activación de una fuga de protones a través de la generación del 4-hidroxinonenal (HNE), un subproducto de la peroxidación lipídica, esto sugiere que funciona como un bucle de retroalimentación negativa para reducir el vigor en la fuerza de protones de la transmembrana y mitigar la producción de ERO (Figura 7).

El HNE puede estimular la conductancia de protones a través de la inhibición de UCP3 y del transportador de nucleótidos de adenina, ANT (Echtay *et al.*, 2003); entonces, la activación de la UCP3 por el superóxido está mitigado por un antioxidante, el fenil-N- tert-butylnitrone, cuando se dirige a la matriz mitocondrial; esta matriz reacciona con los elementos centrales de carbón pero no con el superóxido en sí o con los productos de lipoperoxidación y no afecta el desacoplamiento inducido por el HNE (Murphy *et al.*, 2003). En base a lo anterior, el radical superóxido puede activar a UCP3 de forma indirecta atacando los grupos poliinsaturados de n-6-acilo (grupos de la membrana fosfolipídica) iniciando una cascada de señalizaciones para producir alquenos reactivos (Brand y Esteves, 2005). Entonces HNE se convierte en un producto altamente reactivo capaz de inducir el desacoplamiento por modificaciones covalentes de UCP y ANT (Echtay *et al.*, 2005).



**Figura 7.** Regulación de la proteína desacoplante 3. I) Síntesis de UCP3 es regulada por niveles transcripcionales debidos a inanición y factores transcripcionales musculares. II) La actividad proteínica se puede regular adicionalmente por ligandos funcionales, tales como FA (ácidos grasos) y HNE. Los mecanismos de desactivación de proteína pueden ocurrir por la inhibición del ligando. Abreviaciones: FA, ácidos grasos; HNF, factor nuclear hepático; PPAR, receptor activado para el proliferador de peroxisomas; MyoD, familia de proteínas del factor regulador miogenico (Tomado de Azzu y Brand, 2009).

#### 4.5.2 Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico, HSP (Heat Shock Protein, en inglés), fueron descritas por primera vez en 1962 por Ritossa, quien trabajo con modelos de cultivos de *Drosophila melanogaster*; y las describió como un conjunto de proteínas cuya expresión es inducida por diferentes tipos de estrés, entre ellos el choque térmico.

Actualmente se sabe que este tipo de proteínas se expresan en núcleo y citoplasma de células eucarióticas ante distintos estímulos (por ejemplo, condiciones oxidantes como el calor, isquemia, esfuerzo físico, estrés oxidativo,



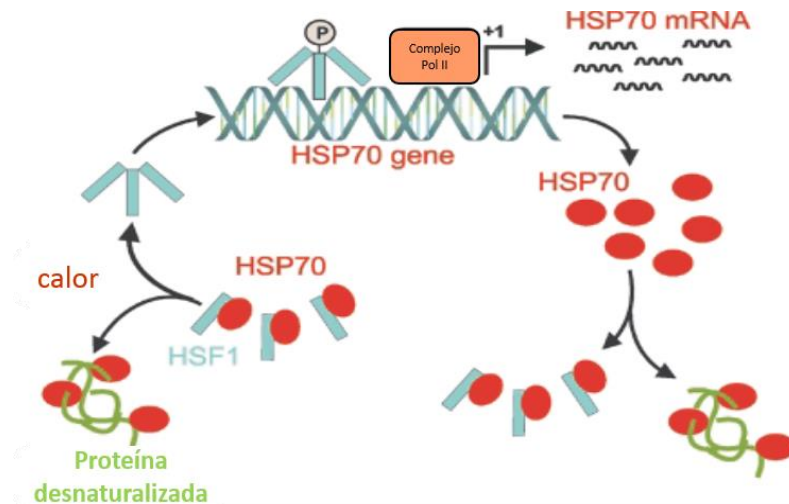
exposiciones a componentes tóxicos (Iwaki *et al.*, 1993), enfermedades inmunológicas, cáncer, enfermedades cardiovasculares, envejecimiento (Hall *et al.*, 2000; Moseley, 2000; Garrido *et al.*, 2001). Sin embargo, la mayor respuesta observada ha sido ante condiciones estresantes ocasionadas por cambios en temperatura mostrando una gran relación en animales poiquiloterminos (Katschinski, 2004).

Estas proteínas se encuentran de manera constitutiva en diversas especies y hasta la fecha se han descrito en células eucarióticas seis tipos, dependiendo de su peso molecular. Tradicionalmente son clasificadas en dos grupos, el primero de ellos es característico de HSP de alto peso molecular (HSP70, 90, y 60) ATP-dependientes; y en el segundo grupo se encuentran las pequeñas HSP que no dependen del ATP; en ambos casos su función parece estar controlada por su fosforilación (Lanneau *et al.*, 2010).

Según Moseley (2000), las HSP están involucradas en el mantenimiento de la integridad celular funcionando como chaperonas, las cuales ayudan al plegamiento y compartimentalización de proteínas recién sintetizadas; de forma que ante un estrés por cambios en temperatura, estas HSP se unen a otras proteínas desnaturalizadas para prevenir su disgregación y ayudar así, a regresar a su plegamiento original, manteniendo su funcionalidad nativa y su consecuente restauración de temperatura. La expresión de las HSP está regulada por factores de transcripción bien definidos, pero es HSF1 (heat shock transcription factor 1, en inglés) quien juega la típica función de inducibilidad al estrés, unión al DNA, oligomerización y localización nuclear en respuesta al estrés por calor (Pirkkala *et al.*, 2001). Específicamente, su activación es mediada por la interacción entre HSF1 y el elemento de choque térmico que se encuentra en el promotor de todos los genes de HSP (Figura 8).

A temperaturas termoneutrales, el factor de transcripción se encuentra de forma inactiva en el citoplasma, esperando ser activado específicamente por HSP90 y HSP70 (Katschinski, 2004). Ambas proteínas son reclutadas para unirse a proteínas desnaturalizadas que se unirán a la HSF1. Este factor de transcripción activado se transloca al núcleo, como trímero se fosforila en sus residuos de serina

y se une al ADN activando genes dependientes de HSP. El proceso central para la detección de la temperatura entonces se ve implicado en la unión de HSP-HSF1 o por el estrés de proteínas desnaturalizadas.



**Figura 8.** Señalización de temperatura celular. Bajo temperaturas normotérmicas, el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF1) se une a la proteína de choque térmico 70 (HSP70). Después de la exposición al calor, HSP70 recluta a las proteínas desnaturalizadas, dejando a HSF1 en una conformación no reprimida. HSF se transloca al núcleo, se trimeriza, se fosforila y se une a sitios específicos de elementos de respuesta al choque térmico en la región promotora de genes inducibles por calor. El subsecuente incremento en la producción de HSP70 conduce a una regulación negativa de la actividad de HSF1 vía unión a HSF1. (Tomado y modificado de Katschinski, 2004).

De acuerdo con Lanneau *et al.* (2010), el mecanismo de ubiquitinación marca a las proteínas para su degradación en el proteosoma. Las proteínas ubiquitinadas (o poliubiquitinadas) son reconocidas por el complejo de proteosoma 26S que desdobra y digiere a las proteínas; este proceso requiere de la participación de varias enzimas conjugantes entre las cuales se encuentran las E1 para la activación, las E2 para la conjugación y las E3 para su unión; se cree que las chaperonas y el sistema ubiquitina-proteosoma trabajan de manera competitiva en la degradación selectiva de proteínas dañadas o anormales (Lanneau *et al.*, 2010).



La HSP90 y HSP70 actúan como una maquinaria multi-chaperona que regula la función, el tráfico y la recombinación de una gran variedad de señalizaciones de proteínas, entre ellas se encuentran las proteínas nacientes, proteínas desnaturalizadas, las implicadas en la transducción de señales, en la regulación transcripcional, entre otras (Pratt y Toft, 2003, Garrido y Solary, 2003).

#### 4.5.2.1 Proteína de choque térmico 70 (HSP70)

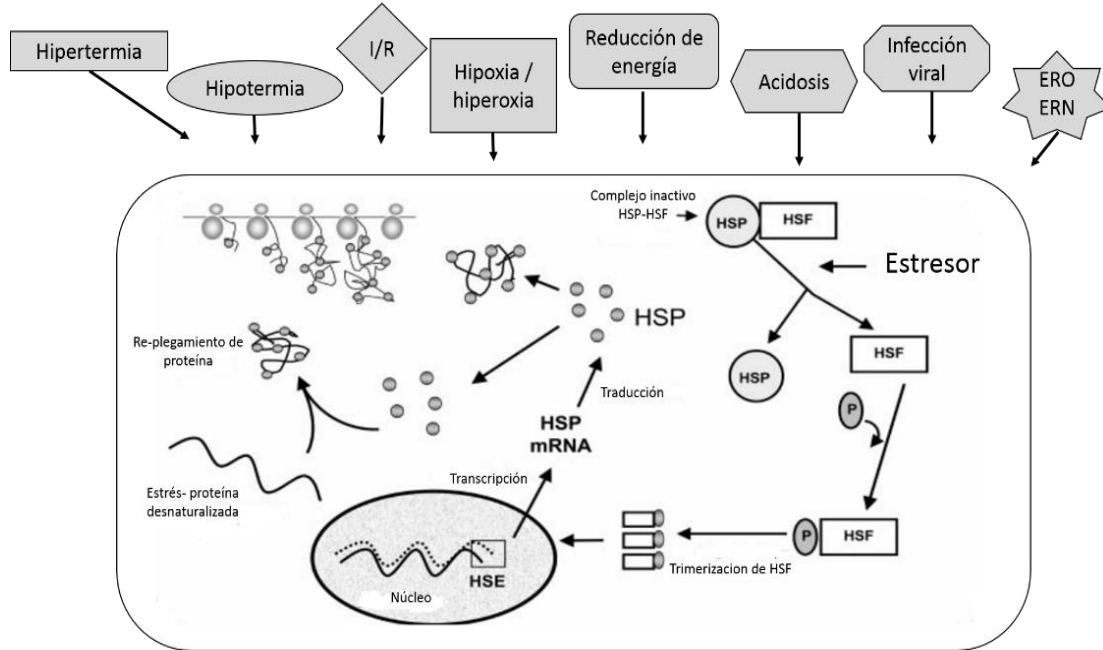
La proteína de choque térmico 70, según Boorstein *et al.*, (1994) es una chaperona altamente conservada y representa el 1-2% de la proteína celular. Su funciones regular el plegamiento de proteínas en condiciones normales y de estrés. Esta chaperona está formada de dos dominios, un dominio ATPasa con un NH<sub>2</sub>-terminal y el otro dominio peptídico unido a un COOH terminal; en este último dominio se unen siete residuos de péptidos, y otra conformación extendida entre dos subdominios, una hoja  $\beta$  y una  $\alpha$  hélice. Esta chaperona modula su actividad y especificidad por el sustrato a través de la utilización de co-chaperonas como Hip, Hop, HSP40 y Bag1 (Katschinski, 2004).

Dentro de la HSP70 existen por lo menos dos elementos reguladores ubicados en la región 5 que interactúa con el factor de transcripción de choque térmico (HSF1). Este último se une al promotor de HSP70 para inducir su transcripción en caso de estrés causado por agotamiento de energía, hipoxia, acidosis, isquemia-re perfusión, citocinas, especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno, infecciones virales y radiaciones ultravioleta, como se muestra en la Figura 9 (Jaattela y Wissing 1993; Marber *et al.*, 1995; Kregel, 2002).

En cuanto a termorregulación, depende de la severidad a la cual sea expuesto el organismo. Kregel (2002) menciona que la expresión ante la termotolerancia se presenta después de varias horas o días (3-5) de exposición, siendo el intestino delgado el más sensible al daño por estrés por calor.



### Señalizaciones fisiológicas que activan la expresión de HSP70



**Figura 9.** Resumen de algunas de las principales señales fisiológicas que activan la forma inducible de la síntesis de proteína de choque térmico de 72-kDa (Hsp70) y mecanismo propuesto para el aumento de expresión de Hsp70 en una célula. El factor de choque térmico (HSFs), presente en el citoplasma, está unido a proteínas de choque térmico (HSPs); de esta manera se mantiene en un estado inactivo. Una amplia gama de estímulos fisiológicos (“estresores”) activan a las HSFs, causando la separación de HSPs. Las HSFs son fosforiladas (P) por proteínas quinasas y forman trímeros en el citoplasma. Estos complejos trímeros de HSF entran en el núcleo y se unen a los elementos de choque de calor (HSE) en la región promotora del gen Hsp70. A continuación el ARNm de la HSP70 se transcribe y sale del núcleo al citoplasma, mientras que nueva Hsp70 es sintetizada. Algunos mecanismos propuestos de protección celular para las HSPs incluyen el funcionamiento como chaperona molecular para asistir en el ensamblaje y translocación de nuevas proteínas sintetizadas en la célula y en la reparación y replegamiento de proteínas dañadas (por ejemplo, estrés por desnaturalización). I/R, isquemia-reperfusión; ROS especies reactivas de oxígeno; RNS, especies reactivas de nitrógeno. (Tomado de Kregel, 2002).

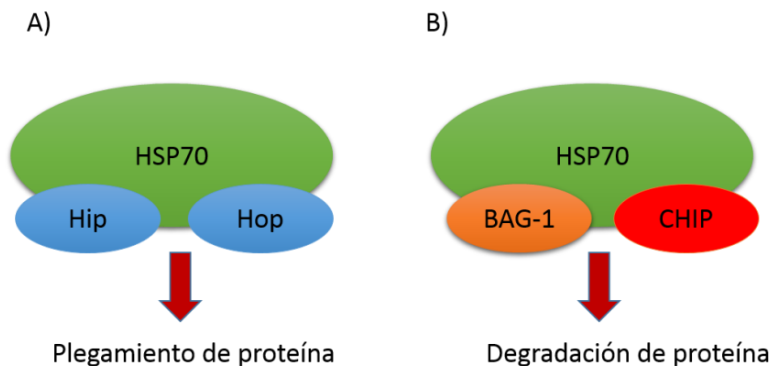
HSP70 atiende a los procesos de reparación celular, en respuesta a diversos tipos de estrés (Kregel, 2002). Entre sus funciones citoprotectoras, se encuentran asegurar el plegamiento correcto de proteínas, mantenimiento estructural,



prevención de la agregación de proteínas y la degradación de las proteínas inestables (Palleros *et al.*, 1991; Bakau y Horwich 1998).

El papel de la HSP70 en la degradación de proteínas parece ser indirecta, se ha sugerido que esto se logra por medio de CHIP (C-terminus of HSP70, en inglés) y BAG-1 (Figura 10); en donde CHIP es una ligasa ubiquitinada que cuando interactúa con HSP70 captura proteínas no plegadas y las ubiquitina asegurando la degradación de la proteína capturada (Connell, *et al.*, 2001 y Murata *et al.*, 2001). CHIP posee dos sitios dominantes funcionales, uno de ellos el TPR (Tetratricopeptide repeat, en inglés) en el dominio de su extremo amino que permite la interacción con otras proteínas que contienen TPR y el otro conocido como U-box en el dominio de su extremo amino que interactúa con la familia UBCH5, la cual está asociada a las enzimas de conjugación de ubiquitina E2 (Lanneau, *et al.*, 2010). Este dominio confiere la habilidad a CHIP para ubiquitinar y censar proteínas para el sistema de proteosomas; así que CHIP funciona como una chaperona dependiente de la ubiquitina ligasa involucrada en la degradación de la llamada Chaperona mediada a la autofagia (CMA, chaperone-mediated autophagy, en inglés) y chaperona de autofagia selectiva asistida (CASA, chaperone-assisted selective autophagy, en inglés; Ketterm *et al.*, 2010).

Según Beckham *et al.*, 2004 y King *et al.*, 2002, la importancia de HSP70 radica, en la termotolerancia celular que ayuda a la supervivencia de los modelos animales con quienes se ha trabajado; sin embargo, y aunque su función ante el estrés por calor no ha sido bien elucidada, se sugiere su participación en la reparación del daño en células intestinales (Shapiro *et al.*, 1986).



**Figura 10.** Plegamiento contra degradación. A) El complejo de la HSP se asocia con otras chaperonas como Hip y Hop. Hip promueve la unión al sustrato, mientras que Hop promueve el reclutamiento de la maquinaria del plegado de HSP70. B) El complejo chaperona HSP70 incluye la asociación con BAG-1 y CHIP. BAG-1 compite con Hip por la unión al sitio dominante de la ATPasa y favorece el reclutamiento del proteosoma, mientras que CHIP compite con Hop y dirige la ubiquitinación de las proteínas chaperonas. (Tomado de Lanneau *et al.*, 2010).

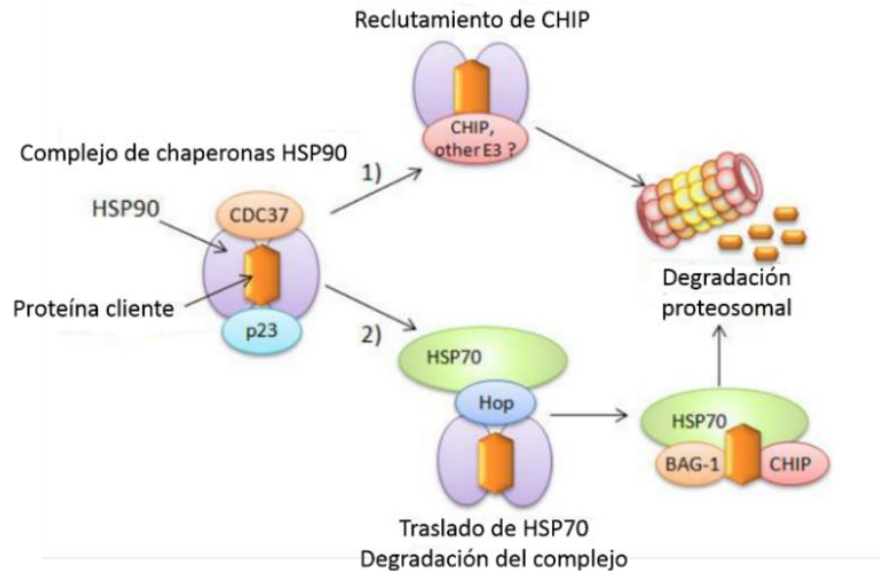
#### 4.5.2.2 Proteína de choque térmico90 (HSP90)

La HSP90 representa alrededor del 2% de la proteína total de la célula y posee una estructura muy bien conservada. Según Katschinski, (2004), HSP90 se conforma de dos subunidades, una de ~25 kDa conectada electrostáticamente en su extremo NH<sub>2</sub> terminal con el extremo COOH- de la subunidad de ~55 kDa; además esta proteína posee dos sitios de unión al ATP, uno localizado en la región NH<sub>2</sub> y otro en la región COOH- terminal. Tras la unión de ATP o por efecto del calor, HSP90 cambia su conformación de modo que las dos unidades se separan generando una estructura toroidal que permite la unión de HSP90 a su sustrato. De esta forma HSP90 actúa como chaperona dependiente de ATP. En cuanto a su función en la célula, HSP90 juega un rol clave en la replicación de ADN, transcripción de ARN, plegamiento de proteínas, maduración, translocación a través del retículo endoplasmático y membranas mitocondriales, proteólisis y señalizaciones celulares. A nivel molecular activa algunos sustratos de proteínas, enciende la expresión de genes dependientes de oxígeno que atenúan su oxidación,



controla el plegamiento y actividad de proteínas quinasas, receptores esteroideos, factores de transcripción bHLH y desempeña un papel importante en la termoresistencia (Richter y Buchner 2001). Sin embargo, esta proteína es incapaz de presentar una actividad por sí misma, por ello es necesaria la interacción con el factor de transcripción HSF1 quien desencadena estas actividades.

El rol de HSP90 en la degradación de proteínas a menudo está asociado con la HSP70, principalmente porque ambos comparten co-chaperonas a través de las cuales son funcionales. De forma general, la HSP90 tiene la capacidad de trabajar con proteínas quinasas, factores de transcripción, receptores nucleares de hormonas, receptores de superficies celulares, entre otros; por lo que se vuelve difícil su esclarecimiento en cuanto a su especificidad (Dezwaan y Freeman, 2008). Cuando una proteína falla en su plegamiento y esta no es asociada a HSP90, la proteína es ubiquitinada por una ligasa E3 y es degradada por el proteosoma (Didelot *et al.*, 2007); esto se puede llevar a cabo a través de CHIP que a pesar que su socio principal es HSP70, puede también unirse al sitio dominante de TPR de HSP90 (Meacham *et al.*, 2001 y Xu *et al.*, 2002). Otro mecanismo posible, es que exista una interacción transitoria con HSP70 cediéndole la proteína “cliente” a ésta (Figura 11), de forma que CHIP, asociado a HSP70 pueda ubiquitinar y conducir a la proteína “cliente” a la maquinaria del proteosoma (Meacham *et al.*, 2001; Esser *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2010), tanto HSP90 y HSP70 como complejo, deben de completar al menos un ciclo de ATPasa y HSP90 en el ciclo final debe de estar unido a un ATP, sin embargo, estos mecanismos siguen siendo poco claros.



**Figura 11.** Degradación de las proteínas clientes. Las proteínas clientes de HSP90 se estabilizan con el complejo chaperona, que incluye a otros complejos de chaperonas como p23 y CDC37. Cuando la proteína falla en el plegamiento correcto o después del tratamiento con inhibidores de HSP90, la proteína cliente es ubiquitinada y dirigida al proteosoma. Esto se puede hacer ya sea 1) por el reclutamiento de CHIP u otra ligasa E3 sobre el complejo HSP90 o 2) por la transferencia de la proteína cliente al complejo de degradación de HSP70 (Tomado de Lanneau *et al.*, 2010).

### 4.5.3 Citocromo P450

P450, constituye una gran familia de proteínas hemo, responsables del metabolismo de numerosos xenobióticos, incluyendo drogas terapéuticas, químicos ambientales y constituyentes en dietas, por ejemplo; así como de componentes endógenos como esteroides y ácidos biliares, prostaglandinas y otros eicosanoides y retinoides (Rifkind, 1995; Duester, 1996; Rendic y Di Carlo, 1997). La nomenclatura de la superfamilia CYP se basa en su evolución genética, las familias con hasta un 40% de homología son agrupadas por un número arábigo (por ejemplo, CYP3), la subfamilia está indicada por una letra que representa los genes altamente relacionados (por ejemplo CYP 3A); además se agrega otro número arábigo (por ejemplo CYP3A4) que indica genes individuales (de Wildt *et al.*, 1999).

La estructura general de P450 está constituida por una combinación de regiones  $\alpha$ -hélice y hojas  $\beta$ ; en la región de la proteína que rodea al grupo hemo,



mientras que en las regiones más variables se presentan lugares de anclaje a la membrana o de unión y reconocimiento de sustratos (Gotoh, 1992). La alta conservación de la región del grupo hemo corresponde con el centro catalítico de la enzima, lo que refleja un mecanismo común de transferencia de electrones, protones y de activación de oxígeno (Williams *et al.*, 2000). La enzima permanece anclada a la membrana a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal, por lo que la mayor parte de la proteína se sitúa en la cara citosólica de la membrana (Chapple, 1998). Esta hélice transmembranal está seguida por una serie de aminoácidos básicos cuyos residuos interaccionan con las cargas negativas de los lípidos de la membrana (Donato, 2004).

Esta hemoproteína está relacionada con una segunda proteína de membrana, la NADPH-citocromo P450 reductasa en una relación aproximada de 10:1. Esta reductasa posee el complejo FAD/FMN capaz de transferir los electrones necesarios para la reacción oxidativa producida por el citocromo P450, aunque los electrones también pueden venir de otras vías, que facilitan su transferencia desde el NAD (P) H.

#### 4.5.3.1 CYP3A

La subfamilia CYP3A se expresa principalmente en esófago, duodeno y colon; además se ha localizado esta proteína en intestino delgado e hígado, tejidos en los que se le relaciona con el metabolismo de fármacos (Kivisto *et al.*, 1996; Paine *et al.*, 1997). Se ha observado su actividad sobre sustratos exógenos como fármacos terapéuticos, por ejemplo, eritromicina, midazolam, triazolam, ciclosporina, lidocaína y nifedipine (Leeder y Kearns, 1997). Entre sus sustratos endógenos se encuentran los esteroides como la testosterona, cortisol, progesterona, androstenediol, dehidroepiandrosterone 3-sulfato (DHEA-S) y estradiol (Wrighton y Stevens, 1992). La CYP3A4 es una de las isoformas más importantes, responsable de metabolizar más del 50% de medicamentos en humanos (Rendic y Di Carlo 1997; Rodríguez-Antona *et al.*, 2010). Sin embargo, los estudios con esta isoforma son limitados en experimentos *in vitro*, debido a la falta



de un modelo experimental, por ello, se ha trabajado con cerdos, los cuales son similares a los humanos en condiciones cardiovasculares, gastrointestinales, urogenitales, sistemas renales y en piel (Balk, 1987). Además, se ha reportado que las subunidades CYP3A29 y CYP3A4 de cerdos y humanos son altamente similares (Anzenbacherová *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2011).

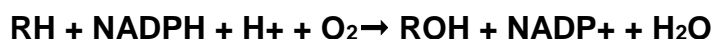
En cuanto a su estructura; se conforma por tres isoformas estructuralmente relacionadas: CYP3A4, CYP3A5 y CYP3A7; a pesar de la semejanza que muestran, estas subfamilias difieren en su distribución en los tejidos, edad, sexo, fisiología, dieta y propiedades metabólicas (de Wildt *et al.*, 1999). CYP3A4 es la enzima predominante del hígado adulto, mientras que en hígado fetal la principal enzima es CYP3A7. Aunque CYP3A4 y CYP3A7 en su secuencia de nucleótidos muestran 95% de similitud, tienen importantes diferencias en la especificidad de sus sustratos; por ejemplo, CYP3A7 puede metabolizar gran variedad de sustratos, de los cuales solo algunos son sustratos de CYP3A4 (Alcorn y McNamara, 2002).

De forma general, en estado de reposo, el citocromo presenta un grupo hemo de bajo spin hexacoordinado (6c-Ls; Estabrook, 2003); el sexto ligando axial es una molécula de agua unida débilmente; la unión del sustrato desplaza al ligando del agua para obtener un grupo hemo de alto spin pentacoordinado (estado funcional, 5c-Hs; Omura y Sato, 1964). El cambio de bajo spin a alto spin provoca en general un aumento de potencial redox del grupo hemo, que facilita la transferencia de electrones de su pareja redox al P450. En ese momento, P450 férrico 5c-Hs se reduce mediante su pareja redox, para producir hemo ferroso (Black y Coon, 1986), al que se une el oxígeno para producir un intermedio oxiferroso (Ladero *et al.*, 1998). P450 oxiferroso es el primero de una serie de intermediarios "oxi" que conducen a la activación del oxígeno molecular. El segundo electrón se transfiere en este momento desde la pareja redox al intermediario oxiferroso, para obtener un intermedio peroxo (Ding y Kaminsky, 2003), que posteriormente se protona dando un intermedio hidropoxo (Stasiecki *et al.*, 1980). Para finalizar se produce la ruptura heterolítica del enlace O-O, con la formación del intermediario oxiferriilo



altamente reactivo denominado Compuesto I por analogía con el grupo hemo de las peroxidasa (Hamdane *et al.*, 2008).

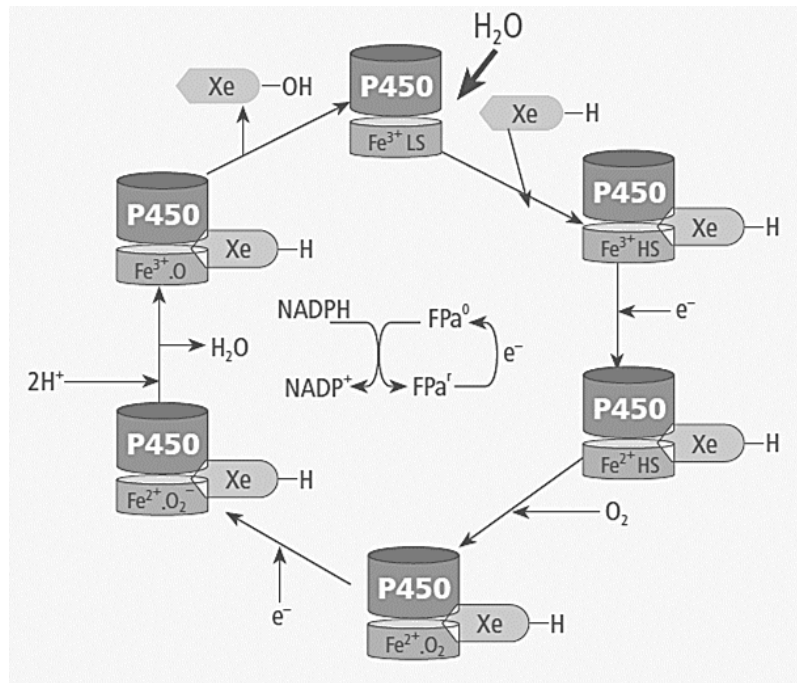
Resaltando puntos importantes, cuando el sistema está completamente acoplado, este opera con una eficiencia catalítica completa, de tal manera que los equivalentes redox y el oxígeno consumido están en relación estequiométrica con los productos hidroxilados (Narasimhulu, 2010); de forma que el ciclo catalítico (Figura 12) lleva asociado un sistema de transporte de electrones y de oxígeno molecular, como se muestra a continuación:



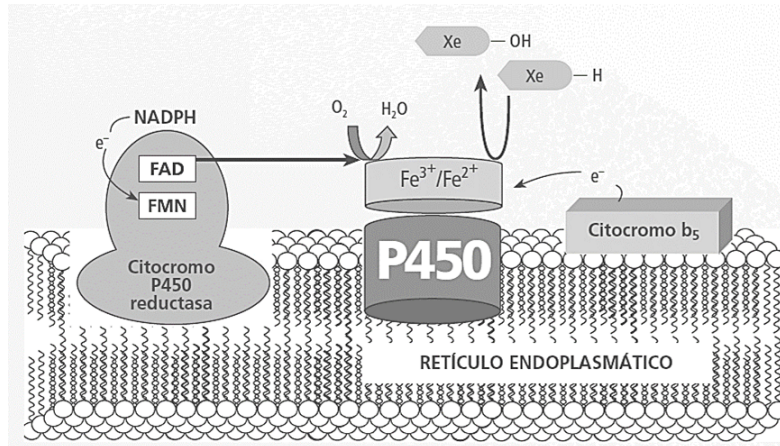
Sin embargo, cuando el sistema está desacoplado, se produce la formación de  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ . Estos últimos dos pueden convertirse en radicales OH altamente tóxicos en presencia del Fe proveniente del grupo hemo; y causar efectos tóxicos sobre la célula (Nelson, 1999).

Según Orellana y Guajardo (2004) en procariotas, las enzimas CYP450 se encuentran presentes en el citosol mientras que en eucariontes se encuentran en las mitocondrias y en diversos tipos de membranas celulares, siendo particularmente abundante en el retículo endoplásmico liso (microsomas; Figura 13). Coutiño *et al.*, (2010) y Muntané (2009) han reportado que la función de CYP3A es catalizar la biotransformación de una amplia variedad de compuestos xenobióticos además de ser inducida por algunos glucocorticoides y antibióticos macrólidos, por ello, se ha establecido que los CYP450 catalizan más de 20 reacciones distintas, entre ellas, la hidroxilación aromática y alifática, la N-, O- y S-desalquilación, sulfoxidación, epoxidación, desaminación, desulfuración, deshalogenación, deshidrogenación, peroxidación y la N- y S-oxidación (Coutiño *et al.*, 2010 y Sono *et al.*, 1996.)





**Figura 12.** Esquema de oxidación de un xenobiótico. El ciclo catalítico del P450 supone la unión del sustrato al sitio activo del enzima, lo cual provoca el desplazamiento de agua. Este proceso está asociado con una alteración en el estado de equilibrio del spin del hierro hemo, el cual cambia a hierro férrico de alto spin ( $\text{Fe}^{3+} \text{HS}$ ) (Lewis y Pratt, 1998). El centro catalítico de la enzima en su forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ), capta el xenobiótico (Xe) en la posición del solvente (normalmente agua) de forma regio y estereoespecífica (se une a un punto concreto del sustrato, originando exclusivamente un esteroisómero). El cambio conformacional en el P450 provoca una disminución del potencial de óxido-reducción, facilitando la transferencia de electrones desde la molécula de reductasa (Hlavica y Lewis, 2001). En un tercer estadio y mediante la captación de un átomo de oxígeno molecular se forma un complejo superóxido ( $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{O}_2$ ) el cual se vuelve a reducir mediante el aporte de un segundo electrón formando una especie activada de oxígeno ( $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{O}_2^-$ ) capaz de unirse a dos protones con la liberación de una molécula de agua ( $\text{Fe}^{3+} \cdot \text{O}^- + \text{H}_2\text{O}$ ). Esta última especie oxigenada del complejo pasa a la forma reducida del citocromo P450 liberando el metabolito oxidado del xenobiótico, el cual ve aumentada su hidrosolubilidad y es por tanto capaz de ser excretado, bien directamente o bien tras sufrir una reacción de fase II (sulfonación, glucuronconjugación, acetilación; tomado y modificado de Donato, 2004).



**Figura 13.** Localización del citocromo p450. La hemoproteína se encuentra relacionada con una segunda proteína de membrana, la NADPH- citocromo P450 reductasa en una relación aproximada de 10:1; esta reductasa posee el complejo FAD/FMN capaz de transferir los electrones necesarios para la reacción oxidativa producida en citocromo P450, aunque estos electrones también pueden provenir desde el citocromo b<sub>5</sub>, que facilita su transferencia desde el NAD (P) H. (Tomado y modificado de Donato, 2004).

Una función importante del citocromo p450 es que las reacciones de fase I son mediadas principalmente por este sistema enzimático, además de algunas hemoproteínas que catalizan la biotransformación de una amplia variedad de compuestos endógenos y exógenos, pero esto depende de la diversidad en la especificidad de sustrato, regulación y expresión de enzimas (Nelson, 2003).

#### 4.6 Planteamiento del problema

Han sido pocos los estudios emitidos acerca de la problemática que causa a nivel celular la exposición a temperatura ambiental elevada. En los últimos años, los cambios en la temperatura ambiente en las diferentes regiones geográficas del mundo, han sido cada vez más drásticos. Ante este fenómeno el estrés provocado en los organismos podría desencadenarse la activación de mecanismos de defensa a nivel celular, entre ellos los encargados de la desintoxicación de productos oxidativos, como aquellos mediados por proteínas desacoplantes (UCP), proteínas de choque térmico (HSP) y citocromos (CYP).



Una forma de abordar el estudio de estos procesos a nivel celular y molecular, es a partir de analizar la expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de las proteínas en cuestión, empleando modelos experimentales que respondan a una problemática específica como el estrés por calor. Tomando en cuenta sus condiciones ambientales durante el verano, consideramos al Valle de Mexicali como un excelente laboratorio natural para analizar el efecto del estrés por calor en los organismos. En consecuencia, se estudió la expresión del ARNm de las proteínas UCP3, HSP70 y P450 en tejido hepático y muscular de cerdos en crecimiento alojados en condiciones de estrés por calor severo.



## **V. HIPÓTESIS**

Las condiciones climáticas de calor intenso que ocurren en verano en el Valle de Mexicali provocan en los cerdos estrés por calor severo, esta condición modifica la expresión del ARN mensajero de proteínas desacoplantes, proteínas de choque térmico y citocromo p450, en tejido hepático y muscular comparados con animales en condiciones termoneutrales.



## **VI. OBJETIVO**

Analizar el efecto del estrés por calor severo en cerdos en crecimiento sobre la expresión de la proteína desacoplante 3 (UCP3), proteínas de choque térmico (HSP70) y citocromo p450, en hígado, músculo largo dorsal y músculo semitendinoso, en comparación con cerdos mantenidos en condiciones de confort térmico.

### **6.1 Objetivos particulares**

- Determinar, mediante análisis de PCR cuantitativo, el efecto del estrés por calor severo en cerdos en crecimiento sobre la expresión de los ARN mensajeros de las proteínas: UCP3, HSP70 y citocromo p450, en tejido hepático, en comparación con cerdos mantenidos en condiciones de confort térmico.
- Determinar, mediante análisis de PCR cuantitativo, el efecto del estrés por calor severo en cerdos en crecimiento sobre la expresión de los ARN mensajeros de las proteínas: UCP3 y HSP70 y citocromo p450 en músculos largo dorsal y semitendinoso, en comparación con cerdos mantenidos en condiciones de confort térmico.



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Trabajo de campo

El experimento se realizó siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el uso de animales en experimentación (NOM-062-Z00-1999, 2001). Éste trabajo se efectuó durante el verano de 2013 (julio-agosto) en las instalaciones del Laboratorio de Fisiología y Metabolismo de Cerdos y Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en Mexicali, Baja California.

El experimento se llevó a cabo simultáneamente en dos salas, una de ellas acondicionada con temperaturas controlada a 24 °C ( $\pm 2.0$  °C); la otra no contaba con sistema para controlar la temperatura, por lo que la temperatura en el interior de la sala dependía de la temperatura ambiental regular del verano en el Valle de Mexicali.

Se utilizaron 18 cerdos de 30-35 kg de peso vivo, de la cruce Landrace x Yorkshire x Duroc, de 3 meses de edad, aproximadamente. Todos los cerdos fueron alojados en corraletas individuales de 1.2 X 1.2m<sup>2</sup> con piso elevado, comederos de acero inoxidable y bebedero tipo chupón. La alimentación de los cerdos consistió en una dieta a base de trigo pasta de soya adicionada con los aminoácidos esenciales lisina, treonina y metionina (Cuadro 4), y se les ofreció agua a libre acceso.

Los cerdos fueron asignados a los siguientes tratamientos: 1, cerdos alojados en sala con temperatura controlada y alimentación *ad libitum* (TNL); 2, cerdos alojados en sala con temperatura controlada y alimentación restringida (TNR); 3, cerdos alojados en sala sin control de temperatura y alimentación restringida, es decir, en condiciones de estrés por calor (EC). Los cerdos en los tratamientos TNR y EC recibieron la misma cantidad de alimento todos los días, ésta consistía en la cantidad promedio de alimento que consumían *ad libitum* los animales en condiciones de EC. El horario de alimentación para TNR y EC se estableció a las



0700 y 1900 horas, se ofrecía la mitad de la ración en la mañana y la mitad en la tarde.

Antes del inicio del experimento se estableció un periodo de adaptación de 7 días en los cuales se acostumbró a los animales del TNR y EC a consumir su ración en 30 minutos o menos. Los primeros tres días se les ofreció 1kg en cada hora de comida y se pesó el rechazo en cada ocasión con la finalidad de establecer el consumo voluntario de los animales en EC. En el cuarto día, se ofreció a todos los animales el promedio consumido por el cerdo EC de mayor consumo en los días previos; y en los días 5 al 7 se les ofreció a todos la cantidad de alimento consumida por el cerdo de menor consumo; así se estableció la cantidad de alimento que se ofrecería diariamente a los animales TNR y EC. Para favorecer su consumo, el alimento se disolvió en agua en una proporción 1:1.

**Cuadro 4.** Composición de dieta ofrecida a los cerdos en el experimento.

| Ingrediente           | %             |
|-----------------------|---------------|
| Trigo                 | 82.93         |
| Pasta de soya         | 13.80         |
| L-Lisina HCl          | 0.50          |
| L-Treonina            | 0.15          |
| L-Metionina           | 0.07          |
| L-Valina              | 0.02          |
| Carbonato de calcio   | 1.28          |
| Ortofosfato           | 0.70          |
| Sal ionizada          | 0.35          |
| Vitaminas y minerales | 0.20          |
| <i>Total</i>          | <i>100.00</i> |

El experimento tuvo una duración de 21 días. Al término del experimento los animales se sacrificaron por desangrado previa insensibilización por descarga eléctrica en el laboratorio de carnes del ICA-UABC. Inmediatamente después del sacrificio se tomaron muestras de 0.5 gr de hígado, músculo lomo dorsal y músculo



semitendinoso. Todas las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C para su uso posterior en laboratorio.

## 7.2 Extracción de ARNm

Todas las muestras de tejido colectadas (hígado, músculo largo dorsal y músculo semitendinoso) fueron procesadas para extraer su ARN total por la técnica descrita por Méndez *et. al.*, (2011). Al finalizar la extracción se analizó la integridad de todas las muestras de ARN en un gel de agarosa al 1%.

## 7.3 Retrotranscripción (RT)

Una vez asegurada la calidad del ARNm, se procedió a realizar el proceso de retrotranscripción, la cual consiste en realizar una reacción en donde el ARNm es transcrito a ADN complementario (ADNc). Esta reacción se inició con 18.5µl de agua libre de nucleasasa la cual se le adicionaron 6µl de buffer 5X (fermentas), 5µl de ARN, 0.75µl de DNAasa; se centrifugó y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, terminado ese tiempo se incubó a 70°C por 5 minutos para detener la actividad de la DNasa. A continuación se agregó 1µl de random primer, 1µl de ANTP's y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos; se agregaron 2µl de buffer 5X, 1µl de inhibidor de RNAasa y se incubó a 42°C por dos minutos; para finalizar se agregó la enzima Transcriptasa reversa (RT-Superscript II, Invitrogen) y se incubó a 42 °C por 50 minutos, la reacción se detuvo a 70 °C por 15 minutos.

Se cuantificó la concentración del cDNA obtenido por medio de un espectrofotómetro con una absorbancia de 260nm ( $A_{260}$ ) estimando la concentración por medio de la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] \text{ ng / } \mu\text{l} = (A_{260} * \text{DO} * \text{factor de dilución})$$

En donde:

DO= densidad óptica (50); Factor de dilución = 200 (Sambroock y Russell, 2001).





#### 7.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR)

Para las reacciones de qPCR se emplearon 100 ng de ADNc de cada muestra (2  $\mu$ l de ADNc a concentración de 50 ng/ $\mu$ l), 3  $\mu$ l de los oligonucleótidos específicos para cada ARN mensajero (Cuadro 5) a una concentración de 2.5  $\mu$ M, se agregaron 12.5  $\mu$ l de SYBR Green Supermix (Máxima TM SYBR Green-rox qPCR Master 2X, Fermentas, Inc. USA; esta mezcla tiene a la enzima ADN polimerasa, un buffer de MgCl<sub>2</sub> y el Flúoruro SYBRGreen). Finalmente la reacción fue completada en un volumen de 25  $\mu$ l con agua libre de nucleasas. Las condiciones a las cuales se sometieron las muestras se colocan en el Cuadro 6.

El equipo empleado para los análisis de qPCR fue CFX96 Real-Time System de Bio-Rad (software CFX Manager 3.0).

#### 7.5 Análisis estadístico

El análisis de resultados se realizó con el programa Statistix 9.0, por medio del análisis de varianza (ANOVA) y contrastes polinomiales. Para determinar el efecto del nivel de alimentación se contrastó el tratamiento de temperatura controlada y alimentación *ad libitum* vs temperatura controlada y alimentación restringida (TNL vs TNR); y para determinar el efecto de temperatura ambiental se contrastaron los tratamientos de temperatura controlada y alimentación restringida vs estrés por calor (TNR vs EC). Las diferencias fueron consideradas significativas con  $P < 0.05$ .



**Cuadro 5.** Oligonucleótidos específicos a cada ARN mensajero analizado, temperatura de alineación y concentraciones de MgCl<sub>2</sub> utilizadas.

|  | Primer | Amplicon<br>(pb) | Secuencia              | Temp. de<br>alineación<br>°C | Concentración<br>de MgCl <sub>2</sub><br>(μM) |
|--|--------|------------------|------------------------|------------------------------|---|
| <b><i>Sus scrofa uncoupling protein 3 mRNA</i></b>           |        |                  |                        |                              |   |
| <b>UCP2</b>  | S1     | 192              | CTGCAGATCCAGGGAGAAAG   | 55                           | 3   |
|  | A1     |                  | GCTTGACGGAGTCGTAGAGG   |                              |   |
| <b>UCP3</b>  | S2     | 281              | GAAGTGTGCCGAGATGGTGA   | 55                           | 5   |
|  | A2     |                  | AGCTTCCCAAGCGCAAAAAG   |                              |   |
| <b><i>Sus scrofa heat shock protein 70 (HSP70), mRNA</i></b> |        |                  |                        |                              |   |
| <b>HSP70</b>   | S2     | 152              | TCCCCACGGTAGGAAACG     | 55                           | 4   |
|  | A2     |                  | GCCCTGAATCCGCAGAATA    |                              |   |
| <b><i>Sus scrofa cytochrome P450 3A (CYP3A) mRNA</i></b>     |        |                  |                        |                              |   |
| <b>P450</b>  | S2     | 288              | GGTGCCAGTCTTCGTGCTTC   | 56                           | 3   |
|  | A2     |                  | AGAACGACAGGTTTTTCCGTTG |                              |   |
| <b><i>Sus scrofa 18s AY265350</i></b>                        |        |                  |                        |                              |   |
| <b>Ribosomal</b>   | S2     | 295              | ATCCGAGGGCCTCACTAAAC   | 56                           | 3   |
|  | A1     |                  | TAGAGGGACAAGTGCGCTT    |                              |   |

**Cuadro 6.** Condiciones de amplificación para las muestras de qPCR.

| Etapa                            | Tiempo     | Temperatura<br>(°C) | Ciclos    |
|----------------------------------|------------|---------------------|-----------|
| <b>Desnaturalización inicial</b> | 5 min.     | 95                  |           |
| <b>Desnaturalización</b>         | 45 seg.    | 95                  | 40 ciclos |
| <b>Alineación</b>                | 45 seg.    | 55 ó 56*            |           |
| <b>Elongación</b>                | 45 seg.    | 72                  |           |
| <b>Elongación final</b>          | 5 min.     |                     |           |
| <b>Incubación</b>                | indefinido | 10                  |           |

\* La temperatura de alineación fue distinta dependiendo del ARN mensajero que se esperaba amplificar, ver cuadro 5.



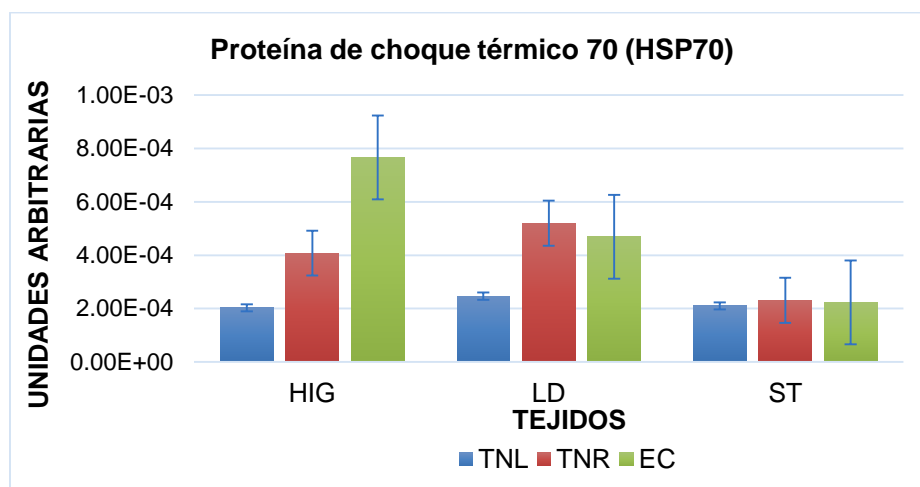
## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Expresión de proteínas en hígado

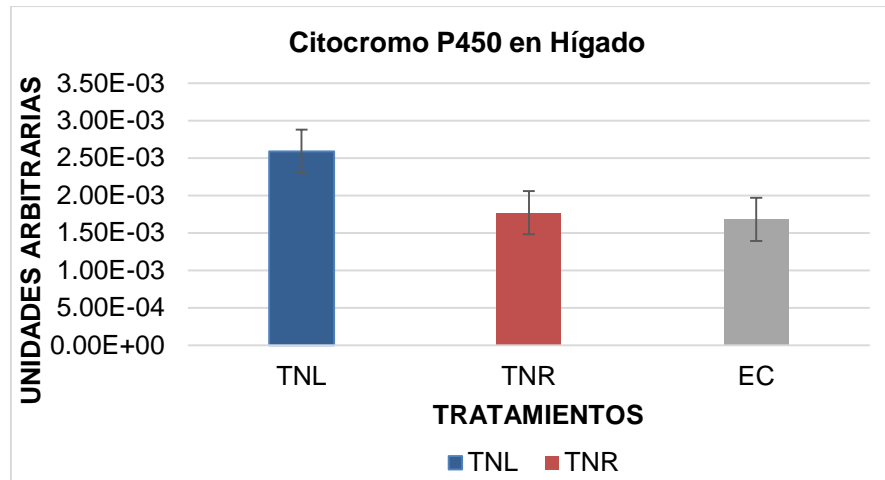
La expresión del ARNm de HSP70 en hígado, no se modificó por efecto del estrés por calor en cerdos que consumieron la misma cantidad de alimento por día, es decir EC vs TNR ( $P=0.399$ ). Al comparar el nivel de alimentación, tampoco se observó cambio en la expresión de HSP70 entre los animales con alimentación restringida o TNR, con respecto a los animales con alimentación *ad libitum* o TNL ( $P=0.393$ ) (Figura 14).

La expresión del ARNm de citocromo P450 en tejido hepático no fue diferente al compararla entre los animales asignados a los tratamientos EC vs TNR ( $P=0.369$ ). El nivel de alimentación, TNL vs TNL tampoco produjo ninguna diferencia en la expresión de esta proteína ( $P=0.894$ ; Figura 15).

Bajo las condiciones y metodología de este experimento no fue posible la detección del ARNm de la proteína UCP3 en hígado.



**Figura 144.** Expresión relativa de la proteína de choque térmico 70 (HSP70) en hígado (HIG) y músculos largo dorsal (LD) y semitendinoso (ST) de cerdos en condiciones termoneutrales alimentados *ad libitum* (TNL), termoneutrales con alimentación restringida (TNR), y en estrés por calor (EC; unidades arbitrarias, relación de ARN mensajero de HSP70: ARN ribosomal 18S).



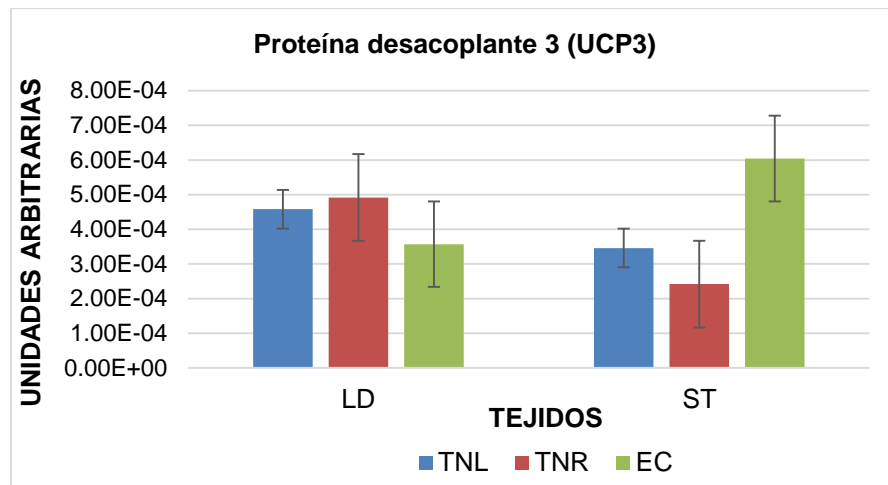
**Figura 15.** Expresión relativa de citocromo P450 (P450) en hígado de cerdos en condiciones termoneutrales alimentados *ad libitum* (TNL), termoneutrales con alimentación restringida (TNR), y en estrés por calor (EC; unidades arbitrarias, relación de ARN mensajero de P450: ARN ribosomal 18S).

## 8.2 Expresión de proteínas en tejido muscular

La expresión del ARNm de HSP70 en músculo largo dorsal, no fue afectada por las condiciones ambientales en que se alojaron los cerdos de este experimento bajo el mismo nivel de consumo de alimento (EC vs TNR;  $P=0.629$ ); ni tampoco cuando los cerdos alojados en condiciones de confort recibían diferente nivel de alimentación (TNR vs TNL;  $P=0.867$ ). En el músculo semitendinoso, la expresión de HSP70 no fue afectada por el estrés por calor (EC vs TNR,  $P=0.985$ ); ni por el nivel de alimentación recibida por los cerdos (TNR vs TNL,  $P=0.947$ ; Figura 14).

La expresión del ARNm UCP3 en músculo largo dorsal no fue afectada por el ambiente en que se alojaron los cerdos (EC vs TNR  $P=0.836$ ); los animales que fueron alojados confort con diferente nivel de alimentación tampoco presentaron diferencia su la expresión de UCP3 (TNR vs TNL,  $P=0.575$ ). La expresión de este mismo mensajero en músculo semitendinoso tampoco fue afectada por el estrés por calor (EC vs TNR,  $P=0.438$ ), ni por el nivel de alimentación (TNR vs TNL,  $P=0.224$ ; Figura 16).

La metodología empleada en este trabajo no permitió detectar la expresión del ARNm de citocromo P450 en los músculos analizados.



**Figura 16.** Expresión relativa de la proteína desacoplante 3 (UCP3) en músculos largo dorsal (LD) y semitendinoso (ST) de cerdos en condiciones termoneutrales alimentados *ad libitum* (TNL), termoneutrales con alimentación restringida (TNR), y en estrés por calor (EC; unidades arbitrarias, relación de ARN mensajero de UCP3: ARN ribosomal 18S).



## IX. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron algunos de los cambios a nivel celular que son provocados por estrés por calor severo en cerdos en crecimiento. Se hipotetizó que esta condición podría modificar la expresión del ARN mensajero de proteínas desacoplantes, proteínas de choque térmico y citocromo p450, en tejido hepático y muscular comparado con animales en confort térmico, sin embargo, los datos obtenidos mostraron lo contrario.

Durante el experimento, se registró la temperatura ambiental en ambas salas en donde se alojaron a los animales. En promedio la temperatura ambiental en la sala de estrés por calor fue de 33.3 °C, máxima de 37.6 °C y mínima de 29.5 °C; con una humedad relativa promedio de 50%, máxima de 65%; el horario en que se presentó la mayor temperatura ambiental fue de las 1400 a 1800 horas y la mayor humedad relativa fue 0700 a 0900 horas. En la sala de confort la temperatura ambiental se mantuvo a  $26 \pm 2.0$  °C, y la humedad relativa promedio fue de 68% (datos de laboratorio no presentados). Estas diferencias en las condiciones ambientales de ambas salas en donde fueron alojados los cerdos que participaron en el experimento son considerables si se toma en cuenta que la temperatura de confort para cerdos en crecimiento oscila alrededor de los 24 °C (Quiniou *et al.*, 2001), por lo que efectivamente se considera que los cerdos alojados en la sala EC realmente estuvieron en condiciones de estrés por calor.

El comportamiento de los cerdos fue similar al reportado anteriormente por Morales *et al.*, (2014) en otro trabajo de este mismo grupo en donde se analizó el efecto del estrés por calor en cerdos. En el presente experimento, los cerdos expuestos al estrés por calor aumentaron su frecuencia respiratoria y cardiaca, y redujeron su consumo de alimento; además se les observó aletargados en las horas de mayor estrés. En las salas de confort térmico los cerdos permanecieron tranquilos sin modificaciones aparentes en su conducta, ni en sus constantes fisiológicas.

La proteína desacoplante 3 o UCP3, según Fleury *et al.*, (1997) y Gimeno *et al.*, (1997) se encuentra en la membrana interna mitocondrial de las células de



algunos tejidos como músculo esquelético, corazón y en menor grado en tejido adiposo café (Echtay, 2007). De acuerdo con Schrauwen y Hesselink (2004) UCP3 funciona como transportador de aniones de ácidos grasos, actuando como protector de lipoperoxidación. De esta forma, cuando el suministro de ácidos grasos es alto y atraviesan la membrana mitocondrial, éstos no se metabolizan y se acumulan en la matriz mitocondrial debido a la falta de acetil CoA sintasa, lo que incrementa el riesgo de la lipoperoxidación. También, se ha hipotetizado que UCP3 actúa en conjunto con la tioesterasa mitocondrial (MTE-1) para liberar a la CoA y exportar a los aniones de los ácidos grasos; la exportación de estos aniones provenientes de la matriz mitocondrial a través de UCP3 no solo permite las mayores tasas de oxidación de ácidos grasos, sino que también puede reducir el potencial de membrana y mitigar la producción de ERO (Katsumata *et al.*, 2004). En este trabajo, no se detectó expresión cuantificable de UCP3 en el tejido hepático de los cerdos expuestos ante EC, TNR y TNR. A pesar de que algunos autores como Fleury *et al.*, (1997) y Gimeno *et al.*, (1997) habían reportado que esta UCP3 se expresa de forma ubicua en la membrana interna de la matriz mitocondrial, en 2007 Echtay reportó que UCP3 se encuentra específicamente en músculo esquelético, corazón y en tejido adiposo café, pero no en tejido hepático. Otra posible hipótesis por la cual no se observó la expresión de UCP3 en hígado podría ser debida a que ante la generación de radicales libres, entre ellos ERO por la exposición a EC, la UCP3 entre en acción inmediatamente después de la detección de los primeros niveles de desbalance celular; por lo que su degradación pueda compararse con la del comportamiento de los radicales libres. Otros trabajos realizados en tejidos animales y cultivos celulares (Valko *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005), mencionan la dificultad para detectar los diferentes radicales libres, debido a su corto tiempo de vida. Por lo anterior se podría especular que después de 21 días de exposición a EC, la expresión y actividad de UCP3 en hígado pudiera haberse adaptado y mantenido en un nivel muy bajo, por lo que no fue posible detectar ningún cambio en su expresión. Esto último es posible si se considera que UCP3 no es la única ni la principal proteína para la eliminación de ERO en tejido hepático.



Según Boorstein *et al.*, (1994) HSP70 es una chaperona altamente conservada que representa del 1-2% del total de la proteína celular; encontrándose en núcleo y citoplasma. Se ha demostrado su actividad asistiendo en el ensamblaje y translocación de nuevas proteínas sintetizadas en la célula y en la reparación y replegamiento de proteínas dañadas ante condiciones normales y de estrés provocados, entre otros por ERO (Jaattela y Wissing 1993; Marber *et al.*, 1995; Kregel, 2002). En este trabajo se observó que la expresión del ARNm de HSP70 no fue diferente ante EC, TNR y TNL. Este efecto se puede atribuir a que ante condiciones de EC pudo haber existido un posible daño en el ensamblaje y translocación de nuevas proteínas; en la reparación y el replegamiento de estas proteínas, probablemente membranales; y aunque la membrana por su conformación química es más susceptible a ser dañada por ERO (Cejas *et al.*, 2004), pudo no haber sido afectada. En cuanto a la termo tolerancia, algunos autores como Shapiro *et al.*, (1986), Kregel (2002), King *et al.*, (2002) y Beckham *et al.*, (2004) mencionan que la expresión de HSP70 se presenta después de varias horas o días (3-5 d) de exposición al calor, sin embargo, su papel sigue siendo poco claro. Es probable que después del periodo de exposición a EC, los cerdos emplearan algún mecanismo de aclimatación o adaptación, que según Bernabucci *et al.* (2010), les permitiera disminuir los daños ocasionados por el ambiente. Este mecanismo de aclimatación, funcionaría como una adaptación biológica que reduciría la tensión fisiológica ante estos eventos, Maloyan *et al.* (1999) reportaron que esta aclimatación ocurre minutos después de la exposición al EC; pero que, sin embargo, tarda hasta 24 horas para observarse en animales, lo que podría provocar que el animal soporte los siguientes eventos. Kamanga *et al.*, (2011) demostraron que en cultivos celulares de fibroblastos de cerdo después de 48h de exposición a 40.5°C continuo, HSP70 se expresó 1.4 veces más con respecto al control. Otro estudio en novillos Angus expuestos durante 110d a EC en verano de Austria determinó la concentración sanguínea de HSP70 y encontró su máxima concentración en el día 30, misma que se redujo en muestreos posteriores a los 60, 90 y 110 d; los autores sugieren que esas diferencias pueden ser debidas a las





diferencias en la adaptación y termotolerancia de cada animal (Gaughan *et al.*, 2013).

Respecto a P450, se sabe que cuando el sistema de esta hemoproteína está completamente acoplado, opera con una eficiencia catalítica completa, de tal manera que los equivalentes redox y el oxígeno consumido están en relación estequiométrica con los productos hidroxilados (Narasimhulu, 2010). Sin embargo, cuando el sistema esta desacoplado, se produce la formación de ERO, algunos de ellos pueden convertirse en radicales OH altamente tóxicos en presencia del Fe proveniente del grupo hemo; y en consecuencia, causar efectos tóxicos sobre la célula (Nelson, 1999). En este trabajo únicamente se detectó la expresión de P450 en hígado, en donde su expresión fue similar entre tratamientos. Es probable que al final de los 21 días de experimentación, la transcripción, activación y actividad misma del citocromo haya estado funcionando con la misma eficiencia en todos los cerdos del experimento, por lo que no se observó diferencia en su expresión. Por otra parte, se sabe que algunas reacciones de eliminación de radicales libres se deben a reacciones enzimáticas de fase I (Nelson, 2003), las cuales también pudieron estar interactuando y regulando la expresión de P450.

Se esperaba que la expresión de UCP3 fuera superior en los cerdos en EC como respuesta a una modificación de las funciones celulares para contrarrestar los efectos negativos de éste; así como lo muestran estudios realizados por Dridi *et al.*, (2008). Esos autores observaron hasta un 71% de expresión en músculos de pollos de engorda expuestos a condiciones de EC de 32°C por 10 d comparados con los que se mantuvieron en condiciones de confort. Katsumata *et al.* (2004) expusieron cerdos de 110-120días de edad a 32 °C por cuatro semanas y encontraron que la expresión de UCP3 en LD se incrementó 10 veces más en EC que en condiciones de confort térmico.

La expresión de HSP70 en músculos LD y ST no fue diferente entre tratamientos. Este hecho apoya la hipótesis de que hubiera un efecto de aclimatación (McClung *et al.*, 2008) por parte de los cerdos en EC que a los 21 días de tratamiento demostraron similar abundancia de este mensajero para que como proteína realizara sus funciones de apoyo a los sistemas de ensamblaje y



translocación de nuevas proteínas sintetizadas, así como a la reparación y replegamiento de proteínas dañadas.

Finalmente, existen muchas publicaciones enfocadas al estudio de los procesos relacionados con la expresión de ARNm del citocromo P450 en diferentes modelos animales y linajes celulares, pero son pocos aquellos que consideran el efecto de la temperatura ambiental o de incubación en el caso de cultivos celulares. Además, los múltiples genes que pertenecen a esta familia hacen más complicado su estudio. En este trabajo no fue posible cuantificar la expresión de P450 en los músculos LD y ST a pesar del alto contenido de mitocondrias presentes en este tejido. Es posible que como en el caso de la expresión de las otras proteínas analizadas haya existido adaptación celular después de los 21 días de exposición al EC, por lo que se sugiere realizar otros trabajos que colaboran a explicar el efecto del EC en la producción y eliminación de ERO por proteínas citoplasmáticas y mitocondriales.



## **X. CONCLUSIÓN**

El estrés por calor severo no modifica la expresión de los ARNm que codifican para la proteína desacoplante 3 (UCP3), proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) y citocromo p450, en hígado, músculo largo dorsal y músculo semitendinoso de cerdos en crecimiento, en comparación con cerdos mantenidos en condiciones de confort térmico.



## XI. LITERATURA CITADA

- Alcorn J. y McNamara P.J. (2002). Ontogeny of hepatic and renal systemic clearance pathways in infants. Part I. *Clin Pharmacokinet* 41:959-998.
- Anzenbacherová E., Baranová J., Zuber R., Pechová A., Anzenbacher P., Soucek P., Martínková J. (2005). Model systems based on experimental animals for studies on drug metabolism in man: (mini)pig cytochromes P450 3A29 and 2E1, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96 244–245.
- Aquila H., Link, T.A., Klingenberg M. (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.* 4, 2369–2376.
- Arsenijevic D., Onuma H., Pecqueur C., Raimbault S., Manning B. S., Miroux B., Couplan E., Alves-Guerra M. C., Gubern M., Surwit R., Bouillaud F., Richard Collins D. and Ricquier S. (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26, 435–439.
- Azzu V., y Brand M. D. (2009). The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends in Biochemical Sciences* Vol.35 No.5.
- Baffy G. (2010). Uncoupling protein-2 and cancer, *Mitochondrion* 10 243–252.
- Bakau B. y Horwich A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines? *Cell* 92: 351–366.
- Banerjee M.S.; Kumar C.P.; Sharma D.R.; Raha S. (2009). Heat stress upregulates chaperone heat shock protein 70 and antioxidant manganese superoxide dismutase through reactive oxygen species (ROS), p38MAPK, and Akt.
- Balk M.W. (1987). Animal models: assessing the scope of their use in biomedical research, in: *Proceedings of The Sixth Charles River International Symposium on Laboratory Animal*, October 1985, Kyoto, Japan, Emerging models in the USA: swine, woodchucks, and the hairless guinea pig, Alan R. Liss Inc., New York, NY, pp 311–326
- Baumgard L. H. y Rhoads R. P. (2012). Ruminant nutrition symposium: ruminant production and metabolic responses to heat stress. *J Anim Sci.* 90:1855-1865.
- Baumgard L. y Rhoads R.P. Jr. (2013). Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013. 1:311–337.
- Baziz H.A., Geraert P.A., Padilha J.S.F., Guillaumin S. (1996). Chronic heat exposure enhances fat deposition and modifies muscle and fat partition in broiler carcasses. *Poult. Sci.* 75:505–13
- Beckham, J. T., M. A. Mackanos, C. Crooke, T. Takahashi, C. O'Connell-Rodwell, C. H. Contag, E. D. Jansen. (2004). Assessment of cellular response to thermal laser injury through bioluminescence imaging of heat shock protein 70. *Histochem. Photobiol.* 79:76–85.



- Bernabucci U., Lacetera N., Baumgard L. H., Rhoads R. P., Ronchi B., Nardone A. (2010). Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*, 4:7, pp 1167–1183.
- Bezaire V.; Seifert E. L.; Harper M. E. (2007). Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J.* 2:312–324; 2007.
- Boorstein W.R., Ziegelhoffer T., Craig E.A. (1994). Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 38: 1–17.
- Bouillaud F., (2009). UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. *Biochim. Biophys. Acta* 377 383.
- Bouillaud F., Raimbault S., Ricquier D. (1988). The gene for rat uncoupling protein: complete sequence, structure of primary transcript and evolutionary relationship between exons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 783–792.
- Black S.D. y Coon M.J. (1986). *Cytochrome P450*, pp 161-216, P Ortiz de Montellano, ed. Plenum, New York.
- Brand M. D., Pakay J. L., Ocloo A., Kokoszka J., Wallace D. C., Brookes P. S., Cornwall E. J. (2005). The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem. J.* 392, 353–362.
- Brand M.D., y Esteves T.C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2, 85–93.
- Brand M.D., Chien L.F., Ainscow E.K., Rolfe D.F.S., Porter R.K. (1994). The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim. Biophys. Acta* 1187, 132–139.
- Bridges T.C., Turner L.W., Gates R.S. (1998). Economic evaluation of misting-cooling systems for growing/ finishing swine through modeling. *Appl Eng Agric* 14:425–30.
- Cejas P., Casado E. Belda-Iniesta C., De Castro J., Espinosa E., Redondo A., Sereno M., Garcia-Cabezas M.A., Vara J.A.F., Dominguez-Caceres A., Perona R., y Gonzalez-Baron M. (2004). Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes and Control* 15: 707–719
- Chapple, C. (1998). Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P- 450 dependent monooxygenases. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 311-343.
- Chu K.Y. y Leung P.S. (2007). Angiotensin II Type 1 receptor antagonism mediates uncoupling protein 2-driven oxidative stress and ameliorates pancreatic islet beta-cell function in young Type 2 diabetic mice, *Antioxid. Redox Signal.* 9 869–878.
- Clapham J.C., Arch J.R., Chapman H., Haynes A., Lister C., Moore G.B., Piercy V., Carter S.A., Lehner I., Smith S.A., Beeley L.J., Godden R.J., Herrity N., Skehel M., Changani K.K., Hockings P.D., Reid D.G., Squires S.M., Hatcher J., Trail B., Latcham J., Rastan S., Harper A.J., Cadenas S., Buckingham J.A., Brand M.D., Abuin A. (2000). Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 406, 415–418.



- Collin A., Cassy S., Buyse J., Decuypere E., Damon M. (2005). Potential involvement of mammalian and avian uncoupling proteins in the thermogenic effect of thyroid hormones. *Domestic Animal Endocrinology* 29 78–87.
- Collin A., van Milgen J., Dubois S., Noblet J. (2001). Effect of high temperature and feeding level on energy utilization in piglets. *J. Anim. Sci.* 79:1849–57.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J., Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.* 3, 93–96.
- Coutiño E.M., Purrata A., Hernández P. (2010). Citocromo P450 biomarcador de exposición terapeútico-toxicológico-carcinogénico. *REB* 29:39-52.
- de Wildt S.N., Kearns G.L., Leeder J.S., van den Anker J.N. (1999). Cytochrome P450 3A: Ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet* 37:485-505.
- Degasperi G.R., Romanatto T., Denis R.G., Araújo E.P., Moraes J.C., Inada N.M., Vercesi A.E., Velloso L.A. (2008). UCP2 protects hypothalamic cells from TNF-alpha-induced damage, *FEBS Lett.* 582 3103–3110.
- Demori I., Burlando B., Gerdoni E., Lanni A., Fugassa E., Voci A. (2008). Uncoupling protein-2 induction in rat hepatocytes after acute carbon tetrachloride liver injury, *J. Cell. Physiol.* 216 413–418.
- Dezwaan, D.C. y Freeman, B.C. (2008). HSP90: the Rosetta stone for celular protein dynamics? *Cell Cycle* 7, 1006–1012.
- Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Joly, A.L., De Thonel, A., Chiosis, G., Garrido, C. (2007). Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Curr. Med. Chem.* 14, 2839–2847.
- Ding X. y Kaminsky L.S. (2003) Human extrahepatic cytochromes p450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 43: 149-73.
- Dridi S., Onagbesan O., Swennen Q., Buyse J., Decuypere E., Taouis M., (2004). Gene expression, tissue distribution and potential physiological role of uncoupling protein in avian species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 139 273– 283.
- Dridi S., Temim S., Derouet M., Tesseraud S., and Taouis M. (2008). Acute Cold- and Chronic Heat-Exposure Upregulate Hepatic Leptin and Muscle Uncoupling Protein (UCP). *Gene Expression in Broiler Chickens JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY* 309A:381–388
- Donato, M.T. (2004) ¿Qué es el citocromo P-450, y cómo funciona?. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. P 32-43.
- Duester G. (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* 35, 12221-12227.



- Echtay K.S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins. What is their physiological role? *Free Radical Biology & Medicine* 43 1351–1371.
- Echtay K.S., Esteves T.C., Pakay J.L., Jekabsons M.B., Lambert A.J., Portero-Otin, M., Pamplona R., Vidal-Puig A.J., Wang S., Roebuck S.J., Brand M.D. (2003). A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* 22, 4103–4110.
- Echtay K.S., Pakay J.L., Esteves T.C., Brand M.D. (2005). Hydroxynonenal and uncoupling proteins: a model for protection against oxidative damage. *BioFactors* 24, 119–130.
- Estabrook R.W. (2003). A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P 450. pp 1465-1467.
- Esser, C., Scheffner, M., Hohfeld, J. (2005). The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 280, 27443–27448.
- Fleury C., Neverova M., Collins S., Raimbault S., Champigny O., Levi-Meyrueis C., Bouillaud F., Seldin M. F., Surwit R. S., Ricquier D. Warden C. H. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* 15, 269–272.
- Fuquay, J.W. (1981). Heat stress as it affects animal production. *J. Anim. Sci.* 52:164-174.
- Garrido C., Gurbuxani S., Ravagnan L., Kroemer G. (2001). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 433–442.
- Garrido C. y Solary E. (2003). A role of HSPs in apoptosis through “protein triage”?. *Cell Death and Differentiation* 10, 619–620.
- Gaughan J. B. Bonner S.L., Loxton I., Mader T. L. (2013). Effects of chronic heat stress on plasma concentration of secreted heat shock protein 70 in growing feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 91:120–129.
- Geraert P.A., Padilha J.C., Guillaumin S. (1996). Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. *Br. J. Nutr.* 75:195–204.
- Gimeno R. E., Dembski M., Weng X., Deng N., Shyjan A. W., Gimeno C. J., Iris F., Ellis S. J., Woolf E. A., and Tartaglia L. A. (1997). Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 46, 900–906.
- Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzi L., Minucci S., Marcaccio M., Pinton P., Rizzuto R., Bernardi P., Paolucci F., Pelicci P. G. (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122, 221–233.
- Gotoh, O. (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P-450 family 2 (CYP2) protein from comparative analysis of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 267, 83-90.



- Gomes A., Fernandes E. Lima J. L.F.C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65: 45–80.
- Green, K.; Brand, M. D.; Murphy, M. P. (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53: S110–S118.
- Hagen T. y Lowell B. B. (2000). Chimeric proteins between UCP1 and UCP3: the middle third of UCP1 is necessary and sufficient for activation by fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 642–648.
- Hall D.M., Xu L., Drake V.J., Oberley L.W., Oberley T.D., Moseley P.L., Kregel K.C. (2000). Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver after heat stress. *J Appl Physiol* 89: 749–759.
- Hall, D.M., K.R. Baumgardner, Overley T.D., Gisolfi G.V. (1999). Splanchnic tissues undergo hypoxic stress during whole body hyperthermia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 276:G1195-G1203.
- Hamdane D.; Zhang H., Hollenberg P. (2008). *Photosynth Res.* 98(1-3): 657- 666.doi: 10.1007/s11120-008-9322-1.
- Harper J.A., Stuart J.A., Jekabsons M.B., Roussel D., Brindle K.M., Dickinson K., Jones R. B., Brand M.D. (2002). Artfactual uncoupling by uncoupling protein 3 in yeast mitochondria at the concentrations found in mouse and rat skeletal-muscle mitochondria. *Biochem J.*; 361:49–56.
- Heath M.E. (1983). The effects of rearing-temperature on body composition in young pigs. *Comp. Biochem. Physiol.* 76:363–66
- Heath M.E. (1989). Effects of rearing temperature and level of food intake on organ size and tissue composition in piglets. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67:526–32.
- Himms-Hagen J. and Harper, M.E. (2001). Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Exp. Biol. Med.* 226, 78–84.
- Horowitz M. (2002). From molecular and cellular to integrative heat defence during exposure to chronic heat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 131, 475–483.
- [http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12&Itemid=112](http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=12&Itemid=112)  
Citada el 10 de junio de 2014.
- Hlavica P., Lewis D.F.V. (2001). Allosteric phenomena in cytochrome P450- catalyzed monooxygenations. *Eur. J. Biochem.* 268, 4817-4832.
- Iwaki, K., S. H. Chi, Dillmann W.H., Mestrlil R. (1993). Induction of HSP70 in cultured rat neonatal cardiomyocytes by hipoxia and metabolic stress. *Circulation* 97:2023–2032.
- Jaburek M., Miyamoto S., Di Mascio P., Garlid K.D., Jezek P. (2004). Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *J. Biol. Chem.* 279, 53097–53102.





- Jaattela M. y Wissing D. (1993). Heat shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med* 177: 231-236.
- Johnson H.D. (1980). Depressed chemical thermogenesis and hormonal functions in heat. In *Environmental physiology aging, heat and attitude* (ed. SM Horvath and MK Yousef), pp. 3–9. Elsevier North Holland, NY, USA.
- Katschinski, D.M. (2004). On Heat and Cells and Proteins. *News Physiol Sci* 19: 11-15.
- Katsumata M., Matsumoto M., Kawakami S. and Kaji Y. (2004). Effect of heat exposure on uncoupling protein-3 mRNA abundance in porcine skeletal muscle. *J Anim Sci.* 82:3493-3499.
- Kamanga-Sollo E., Pampusch M. S., White M. E., Hathaway M. R., Dayton W. R. (2011). Effects of heat stress on proliferation, protein turnover, and abundance of heat shock protein messenger ribonucleic acid in cultured porcine muscle satellite cells. *J ANIM SCI* 2011, 89:3473-3480
- Kettern, N., Dreiseidler, M., Tawo, R., Hohfeld, J. (2010). Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol. Chem.* 391, 481–489.
- King, Y. T., C. S. Lin, J. H. Lin, W. C. Lee. (2002). Whole-body hyperthermia induced thermotolerance is associated with the induction of Heat Shock Protein 70 in mice. *J. Exp. Biol.* 205:273–278.
- Kivisto K.T., Bookjans G., Fromm M.F., Griese E. U., Munzel P., Kroemer H. K. (1996). Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue. *Br J Clin Pharmacol*; 42 (3): 387-9.
- Kozak L. P., Britton J. H., Kozak U. C., Wells J. M. (1988). The mitochondrial uncoupling protein gene. Correlation of exon structure to transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* 263, 12274–12277.
- Kregel K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92: 2177–2186.
- Lacruz G., Figeac F., Movassat J., Kassis N., Coulaud J., Galinier A., Leloup C., Bailbé D, Homo-Delarche F., Portha B. (2009). Diabetic beta-cells can achieve selfprotection against oxidative stress through an adaptive up-regulation of their antioxidant defenses, *PLoS One* 4 e6500.
- Ladero J. M., García-Agúndez J.A., Benítez J. (1998) Enzymatic polymorphisms and lung cancer. *Med Clin.* Barcelona; 111:465-470.
- Lambert, G. P. (2008). Intestinal barrier dysfunction, endotoxemia, and gastrointestinal symptoms: The ‘canary in the coal mine’ during exercise heat-stress. *Med. Sport Sci.* 53:61–73.
- Lambert, G.P. (2009). Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci.* 87:E101-E108.
- Lanneau D., Wettstein G., Bonniaud P., y Garrido C., (2010). Heat Shock Proteins: Cell Protection through Protein Triage. *TheScientificWorldJOURNAL* 10, 1543–1552.



- Lee F.Y., Li Y., Zhu H., Yang S., Lin H.Z., Trush M., Diehl A.M. (1999). Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice liver, *Hepatology* 29 677–687.
- Leeder J.S. y Kearns G.L. (1997). Pharmacogenetics in pediatrics. *Pediatr. Clin. North. Am.*; 44 (1): 55-77.
- Liebig M., von Praun C., Heldmaier G., and Klingenspor M. (2004). Absence of UCP3 in brown adipose tissue does not impair nonshivering thermogenesis. *Physiol. Biochem. Zool.* 77, 116–126.
- Lewis D.F.V. y Pratt J.M. (1998) The P450 cycle catalytic cycle and oxygenation mechanism. *Drug Metab. Rev.* 30, 789-786.
- Lewis D.F.V., Pratt J.M. (2001) The P450 cycle catalytic cycle and oxygenation mechanism. *Drug Metab. Rev.* 30, 789-786.
- Lu Q., Wen J., Zhang H. (2007). Effect of chronic heat exposure on fat deposition and meat quality in two genetic types of chicken. *Poult Sci* 86:1059–1064.
- Luo, W., Z hong, J., Chang, R., Hu, H., Pandey, A., and Semenza, G.L. (2010). Hsp70 and CHIP selectively mediate ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha but Not HIF-2alpha. *J. Biol. Chem.* 285, 3651–3663.
- Mao W., Yu X. X., Zhong A., Li W., Brush J., Sherwood S. W., Adams S. H., and Pan G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett.* 443, 326–330.
- Marber M.S., Mestril R., Chi SH., Sayen R., Yellon Y.M., and Dillman W.H. (1995). Overexpression of the rat inducible 70-kDa heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 95: 1446–1456.
- Mattiasson G. y Sullivan P. G. (2006). The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid. Redox Signal.* 8:1–38.
- Maloyan, A., A. Palmon, and M. Horowitz. (1999). Heat acclimation increases the basal HSP72 level and alters its production dynamics during heat stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 276:R1506–R1515.
- McClung, J. P., J. D. Hasday, J.-R. He, S. J. Montain, S. N. Cheuvront, M. N. Sawka, and I. S. Singh. (2008). Exercise-heat acclimation in humans alters baseline levels and ex vivo heat inducibility of HSP72 and HSP90 in peripheral blood mononuclear cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294:R185–R191.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., and Cyr, D.M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* 3, 100–105.
- Medvedev A.V., Robidoux J., Bai X., Cao W., Floering L.M., Daniel K.W., Collins S. (2002). Regulation of the uncoupling protein-2 gene in INS-1  $\beta$ -cells by oleic acid, *J. Biol. Chem.* 277 42639–42644.
- Mookerjee S.A., Divakaruni A. S. Jastroch M. Brand M.D. (2010). Mitochondrial uncoupling and lifespan. *Mechanisms of Ageing and Development* 131 463–472.



- Moseley P.L. (2000). Exercise, stress, and the immune conversation. *Exerc Sport Sci Rev* 28: 128–132.
- Munguía C.M.E. (2003). La "Contaminación Atmosférica en el Sur de la Zona Metropolitana del Valle de México. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Mex.* 16 (1):48-53.
- Muntané J. (2009). Regulation of drug metabolism and transporters. *Curr Drug Metab* 10:932-945.
- Méndez V., Avelar E., Morales A., Cervantes M., Araiza A. and González D. (2011). A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genet. Mol. Res.* 10 (4): 3251-3255.
- Morales A., Grageola F., Garcia H., Arce N., Araiza B., Yanez J. Cervantes M. (2014). Performance, serum amino acid concentrations and expression of selected genes in pair-fed growing pigs exposed to high ambient temperatures. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98 928–935
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., and Tanaka, K. (2001). CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* 2, 1133–1138.
- Murphy M.P., Echtay K.S., Blaikie F.H., Asin-Cayuella J., Cocheme H.M., Green K., Buckingham J.A., Taylor E.R., Hurrell F., Hughes G., Miwa S., Cooper C.E., Svistunenko D.A., Smith R.A.J., Brand M.D. (2003). Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *J. Biol. Chem.* 278, 48534–48545.
- Narasimhulu, S. (2010). *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* January; 6(1): 1-15. Doi: 10.1517/17425250903329095.
- Nelson, D.R. (2003): Comparison of P-450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P-450 evolution. *Arch Biochem Biophys* 409, 18-24.
- Nelson DR. (1999): Cytochrome P-450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys*, 369: 1-10.
- Nedergaard J. y Cannon B. (2003). The 'novel' 'uncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp. Physiol.* 88:65–84.
- Negre-Salvayre A., Hirtz C., Carrera G., Cazenave R., Trolly M., Salvayre R., Penicaud L., y Carteilla L. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J*; 11(10):809–15.
- Nicholls D. G., Bernson V. S. and Heaton G. M. (1978). The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl.* 32, 89–93.
- Omura T. y Sato R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 239, 2370-2378.



- Orellana B.M. y Guajardo T.V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev Méd Chile* 132:85-94.
- Paine M.F., Khalighi M., Fisher J.M., Shen D.D.; Kunze K.L., Marsh C.L., Perkins J.D., Thummel K.E. (1997). Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*; 283 (3): 1552-62
- Palleros D.R., Welch W.J., and Fink A.L. (1991). Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5719– 5723.
- Pearce, S. C., N. K. Gabler, J. W. Ross, J. Escobar, J. F. Patience, R. P. Rhoads, and L. H. Baumgard. (2013). The effects of heat stress and plane of nutrition on metabolism in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 91:2108–2118.
- Pecqueur C., Alves-Guerra M.C., Gelly C., Levi-Meyrueis C., Couplan E., Collins S., Ricquier D., Bouillaud F., Miroux B. (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation, *J. Biol. Chem.* 276 8705–8712.
- Pirkkala L., Nykanen .P, Sistonen L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15: 1118-1131.
- Pratt W.B, y Toft D.O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* 222:111–33.
- Quiniou, N., Noblet J., van Milgen J., Dubois S. (2001). Modeling heat production and energy balance in group-housed growing pigs exposed to low or high ambient temperatures. *Br. J. Nutr.*85:97–106.
- Rendic S., Di Carlo F.J. (1997). Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors, *Drug Metab. Rev.* 29 413–580.
- Rendic S. y Di Carlo F.J. (1997). Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors, *Drug Metab. Rev.* 29 413–580.
- Richter K. y Buchner J. (2001). Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* 188: 281\_290.
- Ricquier D. y Bouillaud F., (2000). The uncoupling protein homologues: UCP- 1, UCP-2, UCP-3, St UCP and At UCP. *Biochem. J.* 345, 161– 179.
- Rifkind A. B., Lee C., Chang T. K. and Waxman D. J. (1995). Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenación and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic epoxygenation in human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 380±389.
- Ritossa F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571–573.
- Rodriguez-Antona C., Gomez A., Karlgren M., Sim S.C., Ingelman-Sundberg M. (2010). Molecular genetics and epigenetics of the cytochrome P450 gene family and its relevance for cancer risk and treatment, *Hum. Genet.* 127 1–17.



- Rolfe D.F.S., Newman J.M.B., Buckingham J.A., Clark M.G., Brand M.D., (1999). Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR. *Am. J. Physiol.* 276, C692–C699.
- Sanchis D., Fleury C., Chomiki N., Goubert M., Huang Q., Neverova M., Grégoire F., Easlick J., Raimbault S., Le´vi-Meyrueis C., Miroux B., Collins S/, Seldin M., Richard D., Warden C., Bouillaud F. and Ricquier D. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol Chem.* 273, 34611–34615.
- Sambrook J. y Russell D. W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*. Third edition. Vol. 2. Ed. Cold spring harbord laboratory press, Cold Harbor, New York.
- Schrauwen P. y Hesselink M.K.C. (2004). The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity? *Proc. Nutr. Soc.* 63, 287–292.
- Sergey S., Korshunov, Vladimir P., Skulachev, Anatoly A., Starkov. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15–18.
- Shapiro, Y., M. Alkan, Y. Epstein, F. Newman, A. Magazanik. (1986). Increase in rat intestinal permeability to endotoxin during hyperthermia. *Eur. J. Appl. Physiol.* 55:410–412.
- Silanikove N. (1994). The struggle to maintain hydration and osmoregulation in animals experiencing severe dehydration and rapid rehydration: the story of ruminants. *Experimental Physiology* 79, 281–300.
- Skulachev VP. (1997). Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Biosci Rep* 17:347–66.
- Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. (2002). Invited Review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol* 92: 1725–1742.
- Sono M., Roach M.P., Coulter E.D., Dawson J.H. (1996). Heme-containing oxygenases. *Chem Rev* 96:2841–2888.
- Stasiecki P., Oesch F., Bruder G., Jarasch E.D., Franke W.W. (1980). Distribution of enzymes involved in metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons among rat liver endomembranes and plasma membranes. *Eur J Cell Biol*; 21:79–92.
- Surwit R.S., Wang S., Petro A.E., Sanchis D., Raimbault S., Ricquier D., Collins S. (1998). Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 4061–4065.
- Valko M., Morris H. and Cronin M.T.D. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1161–1208.
- Vesce S., Jekabsons M. B., Johnson-Cadwel, L. I., Nicholls D. G. (2005). Acute glutathione depletion restricts mitochondrial ATP export in cerebellar granule neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 38720–38728.



- Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, Y., Johnson, E.F. & McRee, D.E. (2000) Mammalian microsomal cytochrome P-450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* 5, 121-131.
- Wrighton S.A. y Stevens J.C. (1992). The human hepatic cytochrome P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol*; 22 (1): 1-21.
- INEGI 2014. [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx) Citada el 10 de junio de 2014.
- Xie Z., Zhang J., Wu J., Viollet B., Zou M.H. (2008). Upregulation of mitochondrial uncoupling protein-2 by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells attenuates oxidative stress in diabetes, *Diabetes* 57 3222–3230.
- Xu W., Marcu M., Yuan X., Mimnaugh E., Patterson C., Neckers L. (2002). Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12847–12852.
- Yan Y., Zhao Y., Wang H., Fan M.(2006). Pathophysiological factors underlying heatstroke. *Med. Hypotheses* 67:609–617.
- Yao M., Dai M., Liu Z., Huang L., Chen D., Wang Y., Peng D., Wang X., Liu Z., Yuan Z. (2011). Comparison of the substrate kinetics of pig CYP3A29 with pig liver microsomes and human CYP3A4, *Biosci. Rep.* 31 211–220.
- Yonezawa T., Kurata R., Hosomichi K., Kono A., Kimura M. Inoko H. (2009). Nutritional and Hormonal Regulation of Uncoupling Protein 2. *IUBMB Life*, 61(12): 1123–1131.
- Yousef M.K. (1985). Measurements of heat production and heat loss. In: Book- Series Title Stress physiology in livestock (ed. MK Yousef), vol. 1, pp. 35–46. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Yousef M.K. (1987). Principle of bioclimatology and adaptation. In *Bioclimatology and the adaptation of livestock* (ed. HD Johnson), pp. 17–29. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, the Netherlands.
- Yunianto V.D., Hayashi K., Kaneda S., Ohtsuka A., Tomita Y. (1997). Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 77:897–909.
- Zhang C. Y., Baffy G., Perret P., Krauss S., Peroni O., Grujic D., Hagen T., Vidal-Puig A. J., Boss O., Kim Y. B., Zheng X. X., Wheeler M. B., Shulman G. I., Chan C. B., Lowell B. B. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105, 745–55.