

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Ciencias Agrícolas



“Efecto del estrés por calor en el comportamiento y expresión de transportadores de nutrientes, HSP90, leptina y grelina en cerdos en crecimiento”

T E S I S
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA
SOCORRO ELISA MARGARITA COTA MAGALLANES

DIRECTORA DE TESIS
ADRIANA MORALES TREJO

La presente tesis **“Efecto del estrés por calor en el comportamiento y expresión de transportadores de nutrientes, HSP90, leptina y grelina en cerdos en crecimiento”** fue realizada por la **C. Socorro Elisa Margarita Cota Magallanes**, dirigida por la **Dra. Adriana Morales Trejo**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias Agropecuarias

Comité Particular

Dra. Adriana Morales Trejo
Directora de Tesis

Dr. Miguel Cervantes Ramírez
Secretario

Dr. Alfonso Benedicto Araiza Piña
Sinodal

Dra. Sawako Oshima
Sinodal

Dr. José Luis Stephano Hornedo
Sinodal

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	III
ÍNDICE	VI
ÍNDICE	VII
1.- Introducción	1
2.-Revisión de literatura	2
2.1 El estrés por calor en animales de producción.....	2
2.2 Estrés por calor e índice de calor.....	3
2.3 Temperatura de confort para cerdos en producción.....	3
2.4 Respuesta fisiológica al estrés por calor.....	5
2.5 Respuesta celular al estrés por calor.....	5
2.6 Proteínas de choque térmico.....	7
2.6.1 <i>Proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90)</i>	9
2.7 Transportadores de glucosa.....	10
2.7.1 <i>Transportador de glucosa dependiente de sodio SGLT1</i>	10
2.7.2 <i>Transportador de glucosa GLUT4</i>	10
2.8 Transportadores de aminoácidos.....	12
2.8.1 <i>Sistema de transporte rBAT/b⁰AT</i>	12
2.8.2 <i>Transportador de aminoácidos catiónicos CAT-1</i>	13
2.9 Músculo esquelético y miosina.....	13
2.10 Proteínas reguladoras del consumo de alimento.....	15

2.10.1 <i>Leptina</i>	15
2.10.2 <i>Grelina</i>	16
3.- “Efecto del estrés por calor en el comportamiento y expresión de transportadores de nutrientes, HSP90, leptina y grelina en cerdos en crecimiento”	
3.1. Resumen	18
3.2. Abstract	20
3.3. Introducción.....	21
3.4. Materiales y métodos	22
3.4.1. <i>Locación, animales y dieta</i>	22
3.4.2. <i>Recolección de tejidos</i>	24
3.4.3. <i>Extracción de ARN y transcripción reversa</i>	24
3.4.4 <i>PCR-Tiempo Real</i>	25
3.4.5. <i>Análisis estadístico</i>	26
3.5. Resultados	28
3.5.1 Temperatura ambiental, humedad relativa y heat index.....	28
3.5.2 Frecuencia respiratoria y temperatura corporal.....	30
3.5.3 Comportamiento de cerdos.....	32
3.5.4 Expresión genética.....	32
3.6. Discusión	35
3.7. Conclusiones	40
4.- Referencias bibliográficas.....	41

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, por darme la oportunidad de volver y realizar mis estudios de posgrado.

A la Dra. Adriana Morales Trejo, por su constante apoyo y dirección durante toda mi formación.

Al Dr. Miguel Cervantes Ramírez, por su aporte de conocimientos y sugerencias que enriquecieron mi permanencia durante mis estudios doctorales.

A los dos en particular por su constante guía, gran apoyo e infinita paciencia y por ser un ejemplo del investigador que me gustaría ser.

Al Dr. Benedicto Alfonso Araiza Piña, por el gran apoyo brindado durante mis estudios de posgrado, además por sus aportaciones y sugerencias en el desarrollo de mi tesis doctoral.

A la Dra. Sawako Oshima, por formar parte de mi formación, por sus aportaciones y sugerencias en la realización del presente estudio.

Al Dr. José Luis Stephano Hornedo, por haber formado parte de mi educación desde hace más de 20 años, y siempre motivarme a seguir estudiando, seguir aprendiendo.

A todos mis amigos y compañeros del Cuerpo Académico de Nutrición Animal (CANA). En particular a Néstor, Gil, Nelly, Lorenzo y Avelar, por su valiosa

colaboración en equipo, por siempre ayudarme cuando lo necesité y ser mis amigos.

Al Dr. Roberto Soto por siempre creer en mí, y apoyarme durante todos estos años.

A Sandrita por estar siempre al pendiente.

A mis maestros del Doctorado por colaborar en mi formación y brindarme su amistad.

A toda la comunidad del Instituto de Ciencias Agrícolas que de diferentes maneras formaron parte de mis estudios y ayudaron a que pudiera estar aquí.

A Dios por darme la vida y permitirme llegar hasta este momento....

Un agradecimiento muy grande a mis Papás: que siempre me inculcaron el gusto por el estudio, y apoyarme cuando decidí estudiar
Biología y poder llegar aquí

A mis hermanos por su apoyo y ánimos todos estos años

A toda mi familia que estuvo apoyándome para poder concluir esta etapa

A mis amigos, por darme ánimos y escucharme

A Luis, Luis Carlos y Sara por su amor y paciencia

Gracias

A Luis... por estar conmigo, quererme y dejarme ser

A Luis Carlos y Sara..... Por ustedes y para ustedes

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Índice de temperatura – humedad, de acuerdo con las condiciones ambientales (Adaptado de Rothfusz, 1990; NOAA, 2015).

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para el análisis del cDNA por PCR cuantitativo derivados de proteínas de choque térmico 90KDa, leptina, grelina, transportadores de aminoácidos ($b^{0,+}$ AT y CAT1), transportadores de glucosa (SGLT1 y GLUT4), y ARN ribosomal 18S de cerdos.

Cuadro 3. Frecuencia respiratoria (FR) y temperatura corporal (TC) de cerdos alojados en sala termoneutral con alimentación *ad libitum* (TN_{ad}) o alimentación restringida (TN_{pr}), y cerdos alojados en condiciones de estrés por calor (EC).

Cuadro 4. Ganancia diaria de peso (GDP), ingesta de alimento (CDA) tasa de conversión alimenticia (CA) de cerdos alojados en sala termoneutral con alimentación *ad libitum* (TN_{ad}) o alimentación restringida (TN_{pr}), y cerdos alojados en condiciones de estrés por calor (EC).

Cuadro 5. Expresión relativa de RNA mensajeros que codifican para proteínas de choque térmico 90 (HSP90), grelina y leptina en diversos tejidos de cerdos alojados en sala termoneutral con alimentación *ad libitum* (TN_{ad}) o alimentación restringida (TN_{pr}), y cerdos alojados en condiciones de estrés por calor (EC; unidades arbitrarias: proporción ARNm:ARNr 18S)

Cuadro 6. Expresión relativa de RNA mensajeros que codifican para transportadores de aminoácidos ($b^{0,+}$ AT, CAT-1) y glucosa (SGLT1, GLUT4) en diversos tejidos de cerdos alojados en sala termoneutral con alimentación *ad*

libitum (TN_{ad}) o alimentación restringida (TN_{pf}), y cerdos alojados en condiciones de estrés por calor (EC; unidades arbitrarias : proporción ARNm:ARNr 18S) .

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variaciones diurnas de temperatura ambiental (línea continua) y humedad relativa (línea punteada) dentro de las salas EC y termoneutral durante 13 días (d3 a d16) del experimento.

Figura 2. Promedio de la temperatura ambiental (TA) registrada en 4 diferentes horas del día (0800, 1200, 1600 and 2000 h) dentro de las salas de estrés por calor y termoneutral, el índice de calor (IC) calculado en base a la temperatura ambiente y humedad relativa, de los d 17 a 20 del experimento.

1.- INTRODUCCIÓN

Durante el verano la producción animal en algunas regiones del Norte de México es afectada porque la temperatura ambiental excede los 38°C y llega a alcanzar los 50°C. Esta temperatura sobrepasa el umbral de tolerancia de los animales que, en consecuencia, padecen de estrés por calor. En esas condiciones los animales modifican su metabolismo y el uso de nutrientes para mantener su homeostasis, lo que en consecuencia afecta su desempeño productivo (Baumgard, 2012).

Se ha evidenciado ampliamente que los animales en estrés por calor incrementan su tasa respiratoria y temperatura corporal (Nienaber y Hahn, 1996; Quiniou *et al.*, 2000), reducen su consumo de alimento y actividad física (Nienaber y Hahn, 1982; Nienaber *et al.*, 1987; Quiniou *et al.*, 2001). En esta condición, el aumento de la temperatura ambiental puede reducir hasta un 50% el consumo de alimento de los cerdos, por lo que este factor se ha considerado como el principal responsable de la baja productividad de los animales en estrés por calor (Collin *et al.*, 2001).

Hasta el día de hoy la mayoría de los estudios previos en cerdos bajo estrés por calor se han llevado en condiciones de temperatura ambiental que no sobrepasa los 36°C, y sin tomar en cuenta las fluctuaciones de temperatura a lo largo del día. Sin embargo, esta información no coincide con lo que realmente ocurre en animales que viven en regiones donde durante algunas horas al día, la temperatura ambiente suele sobrepasar los 40°C y puede disminuir hasta alcanzar menos de 25°C. El objetivo de este estudio fue establecer el efecto del estrés por calor severo en el desempeño productivo, constantes fisiológicas y expresión genética en cerdos bajo condiciones de verano típicas de esta región.

2.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El estrés por calor en animales de producción

Cuando los animales se exponen a temperatura y humedad relativa elevadas, éstos padecen de estrés por calor (EC), el cual se traduce en una serie alteraciones fisiológicas, metabólicas, inmunológicas y de conducta, que afecta su salud y producción (Zumbach *et al.*, 2008; Horowitz *et al.*, 2004).

El EC ocurre en los organismos que habitan zonas muy cálidas, pero su impacto se incrementa con el paso de los años debido al cambio climático y calentamiento global (Baumgard *et al.*, 2012). Este hecho afecta la salud y crecimiento de los animales y probablemente sea uno de los principales retos de la producción animal en el presente siglo.

La principal consecuencia observada en los animales en estrés por calor, es la reducción en el consumo de alimento, misma que se presenta en diferentes proporciones (20 al 50%) dependiendo de la temperatura ambiental (Collin *et al.*, 2001), lo cual compromete su eficiencia productiva en términos de reducción en la ganancia de peso, producción de leche y eficiencia productiva (Kouba *et al.*, 2001). Además de la reducción en el consumo, es posible que en estas condiciones los animales desvíen sus nutrientes y energía para mantener estable su metabolismo (Baumgard y Rhoads, 2013); aunque esta hipótesis no ha sido comprobada a la fecha, ni tampoco se ha logrado establecer claramente cómo y en qué proporción se desvía el uso de nutrientes para contrarrestar el calor.

Otros cambios fisiológicos observados en los animales en respuesta al incremento en la temperatura ambiental y humedad relativa, son el incremento en la tasa de respiración y en la temperatura corporal (Huynh *et al.*, 2005), ésta última debida a la dificultad del animal para disipar el calor excedente. Además se han observado cambios en la conducta de los animales, principalmente una reducción en la actividad física (Nienaber y Hahn, 1982; Nienaber *et al.*, 1987; Quiniou *et al.*, 2001) con la finalidad de no generar calor, o bien disiparlo de forma más eficiente (Huynh *et al.* 2005).

2.2 Estrés por calor e índice de calor

Una forma de estimar en qué medida la temperatura y humedad relativa afectan al bienestar de los organismos es calculando el índice de temperatura-humedad o ITH. La siguiente fórmula para estimar el ITH fue desarrollada por Steadman (1979) y modificada por Rothfusz (1990):

$$\text{ITH} = -42.379 + 2.0490T + 10.143RH - 0.22476TRH - 6.8378 \times 10^{-3}Tf^2 - 5.4817 \times 10^{-2}RH^2 + 1.2287 \times 10^{-3}Tf^2RH + 8.5282 \times 10^{-4}RH^2Tf - 1.99 \times 10^{-6}Tf^2RH^2$$

(ITH, índice de temperatura-humedad; T, temperatura en grados Fahrenheit; RH, humedad relativa expresada en porcentaje).

De acuerdo con la fórmula anterior, en el Cuadro 1 se presenta la clasificación del nivel de estrés en los organismos expuestos a diferentes temperaturas y humedad relativa en el ambiente en donde se encuentren.

2.3 Temperatura de confort para cerdos en producción

Debido a su capacidad limitada para disipar calor a través del sudor, los cerdos son una especie muy delicada respecto a su tolerancia al calor (Ingram, 1965). De acuerdo a Mount (1979), la zona termoneutral de los cerdos se define como el rango de temperatura ambiental dentro de la cual su tasa metabólica es mínima, constante e independiente de la temperatura externa. La zona termoneutral puede ser dividida en dos puntos, basados en la actividad evaporativa del cerdo. La primera es la zona de confort que cubre el rango más bajo de la zona termoneutral en donde se activan sus funciones de evaporación. La segunda comprende el borde más alto de la zona de confort donde la pérdida de vapor incrementa considerablemente.

Cuadro 1. Índice de temperatura – humedad, de acuerdo con las condiciones ambientales (Adaptado de Rothfusz, 1990; NOAA, 2015).

HEAT INDEX °F (°C)													
Temp.	RELATIVE HUMIDITY (%)												
	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
110 (47)	136 (58)												
108 (43)	130 (54)	137 (58)											
106 (41)	124 (51)	130 (54)	137 (58)										
104 (40)	119 (48)	124 (51)	131 (55)	137 (58)									
102 (39)	114 (46)	119 (48)	124 (51)	130 (54)	137 (58)								
100 (38)	109 (43)	114 (46)	118 (48)	124 (51)	129 (54)	136 (58)							
98 (37)	105 (41)	109 (43)	113 (45)	117 (47)	123 (51)	128 (53)	134 (57)						
96 (36)	101 (38)	104 (40)	108 (42)	112 (44)	116 (47)	121 (49)	126 (52)	132 (56)					
94 (34)	97 (36)	100 (38)	103 (39)	106 (41)	110 (43)	114 (46)	119 (48)	124 (51)	129 (54)	135 (57)			
92 (33)	94 (34)	96 (36)	99 (37)	101 (38)	105 (41)	108 (42)	112 (44)	116 (47)	121 (49)	126 (52)	131 (55)		
90 (32)	91 (33)	93 (34)	95 (35)	97 (36)	100 (38)	103 (39)	106 (41)	109 (43)	113 (45)	117 (47)	122 (50)	127 (53)	132 (56)
88 (31)	88 (31)	89 (32)	91 (33)	93 (34)	95 (35)	98 (37)	100 (38)	103 (39)	106 (41)	110 (43)	113 (45)	117 (47)	121 (49)
86 (30)	85 (29)	87 (31)	88 (32)	89 (33)	91 (34)	93 (35)	95 (36)	97 (38)	100 (39)	102 (41)	105 (42)	108 (44)	112 (46)
84 (29)	83 (28)	84 (29)	85 (29)	86 (30)	88 (31)	89 (32)	90 (32)	92 (33)	94 (34)	96 (36)	98 (37)	100 (38)	103 (39)
82 (28)	81 (27)	82 (28)	83 (28)	84 (29)	84 (29)	85 (29)	86 (30)	88 (31)	89 (32)	90 (32)	91 (33)	93 (34)	95 (35)
80 (27)	80 (27)	80 (27)	81 (27)	81 (27)	82 (28)	82 (28)	83 (28)	84 (29)	84 (29)	85 (29)	86 (30)	86 (30)	87 (31)

Condición

Fatal
Estrés severo
Estrés
Estrés medio

Con respecto a la zona termoneutral de cerdos en finalización, Verstegen y Henken (1987) establecieron que el borde más bajo de la zona termoneutral para cerdos de 40 kg de peso, está en el rango 19 a 20°C. Si la temperatura ambiental excede el punto en el cual el balance de producción y pérdida de calor pueda mantenerse, la pérdida del calor estará a su máximo y la evaporación por respiración será insuficiente para mantener constante la temperatura corporal, en estas condiciones los animales están arriba de su zona termoneutral, lo que incrementa su tasa respiratoria, reduce el consumo de alimento y deprime la producción de calor (Quiniou et al., 2001; Verstegen *et al.*, 1987). Quiniou *et al.*, (2000) encontraron que los cerdos de 30 a 90 kg disminuyen su ingesta de alimento cuando la temperatura se incrementa de 23° a 25°C.

En consecuencia, se considera que la temperatura de confort para los cerdos en etapa de crecimiento y finalización está en el rango del 18 a 21°C (Ingram, 1965), mientras que en lechones la temperatura de confort puede incrementarse hasta 26°C (Close 1991).

2.4 Respuesta fisiológica al estrés por calor

Las primeras respuestas al estrés por calor se consideran mecanismos homeostáticos que incluyen un aumento en el consumo de agua, sudoración y respiración, reducción de la tasa cardíaca y disminución de la ingesta de alimento (Yousef, 1985; Horowitz, 2002); así como vasodilatación periférica para disipar calor a través de la piel (Rowell *et al.*, 1983), entre otras respuestas. Si la exposición al calor se prolonga, se activa un proceso de aclimatación (Horowitz, 2002), mediante este proceso se reduce el metabolismo basal y la producción de calor (Johnson, 1980; Yousef, 1987).

A la fecha se ha documentado que la reducción en el consumo de alimento de los cerdos en estrés por calor trae como resultado una menor velocidad de crecimiento que puede asociarse a 1) cambios en la distribución del tejido adiposo e incremento en la grasa abdominal, lo que reduce el aislamiento térmico y representa una adaptación a altas temperaturas (Le Dividich *et al.*, 1998); 2) reducción en la acumulación de proteína (Noblet y Le Dividich, 1982).

Aunque aún no existen muchos trabajos al respecto, es muy probable que en los organismos expuestos a un ambiente cálido, además de lo ya mencionado, cambie la expresión genética y actividad bioquímica de algunas proteínas, con la finalidad de proteger al organismo contra los efectos adversos del calor.

2.5 Respuesta celular al estrés por calor

Las células responden al estrés de diferentes formas que incluyen desde la activación de rutas que promueven la sobrevivencia hasta permitir la apoptosis para eliminar el daño a los tejidos. La respuesta inicial hacia el estímulo estresor va dirigida a ayudar a la célula a defenderse y recuperarse de ese daño, sin

embargo si el estímulo nocivo se mantiene, se activan las rutas de señalización de muerte. El hecho de que la célula sobreviva, depende de su habilidad de montar una respuesta apropiada hacia el estrés, ya sea ambiental o intracelular. Si por ejemplo, el estrés infligido no va más allá de un umbral de tolerancia, la célula puede soportarlo y activar una respuesta protectora adecuada, asegurando la sobrevivencia (Kultz, 2003). Al contrario si el daño es muy fuerte, la respuesta fallará, activándose una cascada de señalización que eventualmente conduzca a la muerte celular (Weston *et al.*, 2007; Perkins *et al.*, 2006).

Específicamente en la respuesta celular al estrés por calor participan proteínas reguladores del ciclo celular, proteínas chaperonas y de reparación, estabilización, reparación del ADN y la cromatina, y eliminación de proteínas dañadas. Muchas de las proteínas involucradas en aspectos claves en la respuesta celular al estrés por calor están conservadas en todos los organismos y pueden ser identificadas experimentalmente (Kultz, 2003). Por ejemplo, se ha observado el incremento en la expresión de algunas de las denominadas proteínas de choque térmico (HSP) para conferir a las proteínas de la célula resistencia al estrés (Parsell y Lindquist, 1993).

Desde hace tiempo se ha demostrado que en cultivos celulares el estrés por calor reduce la síntesis de proteínas, ARN y ADN (Mondovi *et al.*, 1969; McCormick y Penman, 1969). En adición, el calor también induce perturbaciones en los constituyentes de la membrana; por ejemplo, induce cambios en la composición de los lípidos y fluidez de la membrana celular (Bowler *et al.*, 1973; Yatvin *et al.*, 1982); inactiva o impide la unión de algunos receptores a membrana celular modificando las vías señalización (Calderwood y Hahn, 1983); o altera la integridad y permeabilidad de la membrana, lo que resulta en cambios en la concentración de iones intra- y extracelulares, y en la dinámica del citoesqueleto (Han *et al.*, 2000; Dorion y Landry, 2002).

En resumen, la respuesta celular al estrés por calor provoca las siguientes modificaciones: 1) inhibición de la síntesis de ADN, transcripción, procesamiento

del ARN y traducción; 2) inhibición de la progresión del ciclo celular; 3) desnaturalización y disgregación de proteínas; 4) incremento en la degradación de proteínas en lisosoma y proteosoma, 5) disrupción de los componentes del citoesqueleto; 6) alteraciones en el metabolismo y reducción del ATP en la célula y 7) cambios en la permeabilidad de la membrana (Fujita, *et al.*, 1999; Linnik *et al.*, 1986).

2.6 Proteínas de choque térmico

La respuesta celular al estrés por calor incluye la activación de factores de transcripción como el factor de choque térmico (heat shock factor, HSF), expresión de proteínas asociadas a una respuesta homeostática aguda, como las proteínas de choque térmico (HSP), y alteración en la expresión génica (Collier *et al.*, 2008). Esta primera respuesta dirige los cambios en la expresión de proteínas necesarias para reestablecer la función celular.

Las proteínas más estudiadas cuya expresión se modifica en de respuesta al calor son las HSP, estas proteínas son de particular importancia para la sobrevivencia de la célula durante la hipertermia (Sonna *et al.*, 2002). Los miembros de esta familia se expresan en todas las especies, y en condiciones normales se encuentran en las células a niveles bajos donde juegan una función importante en la protección de las proteínas (Muchowski *et al.*, 2005). Algunas HSP son constitutivas, mientras que otras son inducidas por diferentes tipos de estrés, como lo es el calor, drogas citotóxicas, o radiación por luz ultravioleta; todos ellos pueden alterar la estructura y plegamiento de las proteínas, mismo es reparado por las HSP. El peligro que representa el mal plegado de las proteínas es controlado por dos mecanismos, las chaperonas moleculares que facilitan el plegado apropiado y el sistema ubiquitina-proteosoma (Lanneau, *et al.*, 2010). El mecanismo de acción de las HSP es unirse a proteínas mal plegadas y restaurar su conformación nativa (Buchner *et al.*, 1996).

De acuerdo con su peso molecular las HSP de mamíferos se clasifican en HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 y HSP27 (Arya *et al.*, 2007), aunque cada una

tiene funciones y ubicaciones distintas (Feige *et al.*, 1994). De todas ellas, la HSP70 juega un intenso papel en la citoprotección (Volloch *et al.*, 1999) y es utilizada como biomarcador del estrés celular (Mizzen *et al.*, 1988); aunque si el daño debido a la exposición al calor no es o no puede ser reparado, ocurrirá la muerte celular vía apoptosis inducida por calor (Roti *et al.*, 2008).

La HSP27 y la HSP70 también protegen a las células de la inducción de la muerte celular debida a diferentes tipos de estrés, incluyendo apoptosis (Samali *et al.*, 1996; Jattela *et al.*, 1998) y necrosis (Kabakov *et al.*, 1995; Champagne *et al.*, 1999). Por ejemplo, HSP27 puede interactuar con actina ayudando a mantener la integridad del citoesqueleto y en consecuencia promover la sobrevivencia (Concannon *et al.*, 2003). Además, HSP27 y HSP70 inhiben la apoptosis interfiriendo con la activación de caspasas (Concannon *et al.*, 2001; Bruey *et al.*, 2000).

La actividad de HSP90 en la degradación de proteínas está frecuentemente asociada con la HSP70, porque ambas son chaperonas que pueden asociarse. HSP90 asegura la estabilidad de cientos de proteínas estructurales y funcionales, incluyendo un amplio rango de cinasas, receptores nucleares de hormonas, receptores de superficie de membrana, factores de transcripción como el factor inducible a hipoxia (HIF)-1 α , y muchos más (Dezwaan y Freeman, 2008).

2.6.1 Proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90)

La chaperona molecular HSP90 regula el plegamiento de proteínas celulares y se localiza en el citoplasma, aunque una pequeña fracción está presente en el núcleo. En general la mayoría de los organismos muestran dos isoformas de HSP90 una de ellas es inducible por estrés y puede llegar a ser hasta el 10% de las proteínas solubles en células u organismos bajo estrés. HSP90 es una fosfoproteína cuyos grupos fosfato son clave para su asociación con otras cochaperonas y proteínas clientes (Mollapour *et al.*, 2010; Mollapour *et al.*, 2012).

HSP90 es miembro de la superfamilia GHKL ATPasa/kinasa, se caracteriza por la presencia de una hendidura única de unión al ATP (Pearl, *et al.*, 2006).

Comparado con otras chaperonas la HSP90 reconoce muy selectivamente a sus sustratos, así que en lugar de actuar como un factor plegador de manera indiscriminada la HSP90 parece actuar como un sensor de la regulación de sus proteínas clientes (Pratt *et al.*, 1997, Galigniana *et al.*, 2010), estableciendo la cooperación crítica con otras chaperonas y cochaperonas como HSP70, HSP40, p23, HOP (heat-shock organizing protein; Pratt *et al.*, 1997).

La HSP90 es un dímero flexible de 588 a 854 aminoácidos que tiene una actividad débil de ATPasa, presenta 3 dominios conservados. Un dominio de unión a ATP N-terminal, el más conservado; un dominio medio, y un dominio de dimerización carboxi-terminal; éste último con una secuencia MEEVD que sirve como sitio de unión para cochaperonas que contengan el dominio TPR (Scheufler *et al.*, 2000).

La cantidad tan grande de proteínas con las que HSP90 se relaciona, en especial con HSP70, la hace difícil de estudiar ya que comparten cochaperonas y su clientela incluye proteínas estructurales y funcionales como cinasas, receptores hormonales y receptores celulares de superficie (Dezwaan y Freeman, 2008).

La expresión de HSP90 se incrementa en respuesta al estrés, y es mediada a nivel de transcripción por varios HSF, especialmente por HSF-1 en vertebrados (Zou *et al.*, 1998). En respuesta al estrés, el monómero inactivo del HSF-1 (unido a HSP90, 70 y 40) se convierte en homotrímero de unión al ADN, en donde se une a elementos de respuesta de estrés por calor (HSE) de los promotores de los genes de estrés por calor. Después de la trimerización HSF-1 es fosforilado y promueve la expresión de los genes de HSP (Morimoto *et al.*, 1998).

Una vez sintetizada, HSP90 está sujeta a modificaciones postraduccionales que incluyen fosforilación y acetilación que disminuye la afinidad al ATP, bajando su afinidad con algunos de sus clientes (Kovacs *et al.*, 2005); S-nitrosilación que promueve una inhibición significativa de su actividad ATPasa (Martínez-Ruiz 2005); oxidación debido a la habilidad del aldehído del 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) para reaccionar e interrumpir la actividad de HSP90 (Carbone *et al.*, 2005); ubiquitinación inducida para promover la muerte celular (Blank *et al.*, 2003); y

metilación, que en el músculo es necesario para la unión con una proteína indispensable para la elasticidad (Donlin *et al.*, 2012).

2.7 Transportadores de glucosa

2.7.1 Transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1)

La abundancia de transportadores de nutrientes en intestino está regulada por el tipo y la cantidad de nutrientes que entran en el lumen intestinal (Shirazi *et al.*, 1995). Existen varios transportadores de glucosa en intestino delgado, pero el más abundante en mucosa intestinal es el denominado transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1). Este SGLT1 se localiza en la membrana apical del intestino cubriendo las microvellosidades del enterocito (Hwang *et al.*, 1991; Ferraris *et al.*, 1992), y la distribución de su ARNm a lo largo del eje criptavellosidad, se correlaciona con la expresión de la proteína SGLT1 funcional. Se ha demostrado que tanto en rumiantes como en no rumiantes, la actividad de SGLT1 es regulada por la abundancia de carbohidratos en el lumen intestinal (Ferraris *et al.*, 1994; Shirazi- Beechey *et al.*, 1994).

La expresión de este transportador de glucosa SGLT1 es crucial para la absorción y transporte de glucosa en el intestino delgado (Rodriguez *et al.*, 2004). Sin embargo, éste es un órgano muy sensible al estrés (Nabuurs *et al.*, 2001; Soderholm y Perdue, 2001), en el que fácilmente podría limitarse la absorción de nutrientes como glucosa y aminoácidos debido a daño o alteraciones en su mucosa. Lamentablemente no existe información consistente acerca de cómo el estrés por calor afecta la expresión y actividad del SGLT1. Algunos reportes muestran cambios en la concentración de glucosa en sangre en ambientes con altas temperaturas, pero no son consistentes y mencionan que la reducción en el nivel de glucosa puede atribuirse a la reducción en el consumo de alimento o a una disminución de la gluconeogénesis en ambientes cálidos (Marai *et al.*, 1995).

2.7.2 Transportador de glucosa GLUT4

GLUT4 es el transportador de glucosa dependiente de insulina más abundante en los músculos. Como el músculo es el principal sitio periférico para la oxidación de nutrientes que responde a la acción de la insulina, es muy importante conocer los factores que regulan la expresión de GLUT4, como lo es un estado de inanición, dietas altas en grasas, exposición a temperatura severa y acción de la hormona tiroidea, etc. (Charron *et al.*, 1990).

El transportador GLUT4, codificado en el gen SLC2A4, es una proteína que pertenece a una familia de proteínas que contienen 12 dominios transmembranales (Shaohui *et al.*, 2007). Dentro de las células GLUT4 está presente en vesículas intracitoplasmáticas que tras el estímulo de insulina se traslocan a la membrana citoplasmática para permitir la entrada de glucosa (Storey, 2004). Además del músculo esquelético este transportador se expresa en tejido adiposo y músculo cardíaco (Stuart *et al.*, 2000, 2006).

Algunos cambios en la expresión de GLUT4 han sido relacionados con alteraciones en la tolerancia a la glucosa, problemas de obesidad (Olefsky *et al.*, 1988; Garvey *et al.*, 1991; Sinha *et al.*, 1991) y atrofia muscular (Didyk *et al.*, 1994; Blakemore *et al.*, 1996), entre otros padecimientos.

La expresión de GLUT4 en tejido adiposo, esquelético y músculo cardíaco, así como la regulación por ayuno y realimentación, está conferida dentro del segmento de ADN de 2.4kb de la región 5' del gen del GLUT4e (Liu *et al.*, 1992). Para su expresión específica en músculo esquelético, se ha encontrado un dominio de unión MEF2 (factor potenciador de miocito) en el segmento 466 a 457, que se considera crítico para su expresión en este tejido (Liu *et al.*, 1994). Cerca de esta región también se ha propuesto que un receptor de hormona tiroidea y Myo D formen un complejo con MEF2 para regular la expresión de GLUT4 (Santalucia *et al.*, 2001). Otro dominio implicado en su expresión tejido específica se denomina Dominio I e incluye la región de 742 a 712 antes del sitio de iniciación de la transcripción (Oshel *et al.*, 2000). Estos y otros datos sugieren un complejo modo de regulación de GLUT4 a nivel transcripcional que aún no ha sido entendido.

Respecto al estrés por calor, no existen estudios que lo relacionen con la expresión de GLUT4, pero como existe la evidencia de que cerdos sometidos a estrés, se vuelven más sensibles a insulina (Torlinska *et al.* 1987, Gupte *et al.* 2009, Wheelock *et al.* 2010), y que estudios hechos en ratas demuestran que la restricción calórica promueve la entrada de glucosa mediada por insulina (Sequa *et al.*, 2012), se cree que puede haber una relación estrecha en la expresión del transportador y las modificaciones en el metabolismo de la glucosa en cerdos en estrés por calor.

2.8 Transportadores de aminoácidos

2.8.1 Sistema de transporte rBAT/b^{0,+}AT

El sistema rBAT/b^{0,+}AT (SLC3A1/SLC7A9) es el principal transportador de aminoácidos catiónicos y neutros, en la membrana apical de riñón e intestino (Palacin *et al.*, 2001). Este sistema consiste en dos subunidades de proteína, la primera es la cadena ligera b^{0,+}AT, proteína transmembrana de 487 aa (masa molecular 50kDa) y 12 hélices α transmembrana, ésta es la unidad activa del sistema; la segunda es la proteína rBAT, que es conocida como la cadena pesada por su mayor masa molecular, compuesta de 685 aminoácidos y altamente glucosilada (Tate *et al.*, 1992; Wells *et al.*, 1992; Bertran *et al.*, 1993). Ambas subunidades se coexpresan en la superficie de la membrana, siendo b^{0,+}AT quien estabiliza a la subunidad mayor y promueve el tráfico a la membrana apical desde el retículo endoplásmico (Baunch *et al.*, 2003). En este transportador cistina y los aminoácidos catiónicos se transportan con valores de Km de 100 μ M, mientras que los neutros con Km más altas (Palacin, 1994). Este transportador realiza un mecanismo antiporter en el que se absorben aminoácidos catiónicos y salen de aminoácidos neutros, p. ej. intercambia leucina para absorber lisina (Broer, 2008).

Existe muy limitada información de sobre la expresión de transportadores de aminoácidos en animales sometidos a estrés por calor. Morales *et al.* (2014) encontraron una disminución en la expresión del transportador b^{0,+}AT en cerdos

en crecimiento bajo condiciones a estrés por calor, siendo las primeras evidencias de que este factor ambiental modifica expresión del transportador.

2.8.2 Transportador de aminoácidos catiónicos CAT-1

A diferencia del transportador anterior, el transportador heterodimérico denominado CAT-1 ha sido mayormente estudiando a nivel molecular, aunque la información sobre su expresión en condiciones de estrés por calor es limitada (Hatzoglou *et al.*, 2004). Esta proteína miembro de la familia CAT media el transporte de aminoácidos catiónicos independientemente de Na^+ . CAT-1 se expresa casi de manera ubicua, pero su expresión varía considerablemente en diferentes tejidos y células, lo que sugiere una regulación de su expresión, y puede ser modulado por una variedad de estímulos, incluyendo la proliferación celular, hormonas de crecimiento, citosinas, hormonas y nutrientes (Hatzoglou *et al.*, 2004).

CAT-1 es una proteína glucosilada con 14 dominios transmembrana (Hatzoglou *et al.*, 2004). La regulación de la expresión genética de CAT-1 involucra mecanismos a nivel transcripcional, posttranscripcional y posttraduccional (Hatzoglou *et al.*, 2004). El ARNm de CAT-1 es de aproximadamente 8kb, en ratas el 5'UTR contiene un marco de lectura para un péptido de 48 aminoácidos (Fernández *et al.*, 2002). El promotor de este gen no tiene caja TATA, y solo se ha mapeado un sitio de único de transcripción, lo que sugiere que la transcripción del promotor de CAT-1 puede requerir una combinación diferente de factores de transcripción. No se conocen a los factores que determinan la especificidad en un tejido (Zhou *et al.*, 2002).

Se ha observado que los niveles de mRNA de CAT-1 se incrementan por la limitación de un solo aminoácido esencial pero no se altera por la limitación de

aminoácidos no esenciales, lo cual sugiere que un mecanismo adaptativo celular global debe ser activado en respuesta a la limitación de aminoácidos, llevando a la síntesis de más CAT-1 (Fernández *et al.*, 2003).

2.9 Músculo esquelético

El crecimiento de los cerdos, y específicamente, el crecimiento muscular son importantes en la producción para obtener canales más grandes en menos tiempo. El músculo esquelético representa el 30 al 65% del peso corporal del cerdo dependiendo de su raza, y contiene el 45% de la proteína total del individuo. Además tiene un rol crítico en el control glicémico y la homeostasis metabólica, ya que se considera como un sitio para disponer de glucosa en condiciones de estimulación por insulina (DeFronzo *et al.*, 1981; Egan y Zierath 2013).

Entre las proteínas musculares la miosina es la más abundante, y de acuerdo a sus isoformas, a su abundancia en la fibra muscular y a su capacidad de contracción, las fibras musculares se han clasificado fibras del tipo I de contracción lenta, y del tipo II de contracción rápida, que pueden subdividirse en fibras IIA, IIB y IIX. (Egan *et al.*, 2013).

Cuando el músculo esquelético se contrae más frecuentemente de lo que está acostumbrado, éste se adapta sufriendo una hipertrofia (incremento en el contenido de proteína estructural y contráctil) y se altera la expresión de la cadena pesada de miosina (MHC) para permitir una contracción más favorable (Frier y Locke 2007). En cerdos, las fibras tipo IIB componen aproximadamente 80% del total de las fibras en algunos músculos (Davoli *et al.*, 2003) y se expresan ampliamente en músculos como *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus*.

Existe un gran número de factores de transcripción y proteínas que regulan el fenotipo del músculo esquelético integrando señales de estímulos fisiológicos y coordinando una adaptación metabólica (Hood 2001; Coffey y Hawley, 2007).

En estrés por calor el crecimiento muscular es afectado por la falta de nutrientes consecuencia de la reducción en el consumo de alimento, en esta condición es

probable que la síntesis de miosina se afecte. Horowitz *et al.* (1996), demostraron que durante la aclimatación al calor se llevan a cabo cambios en la señalización celular y de membrana, uno de esos cambios es la transformación de la miosina de la forma rápida a la forma lenta que es más eficiente en tejido cardíaco de ratas. Geraert *et al.*, (1996) observaron una reducción en la acumulación de proteína en pollos bajo estrés por calor, sugiriendo que esta disminución en la acumulación de proteína podría ser resultado de la falta de energía necesaria para el proceso. (Kouba 2001). Por su parte Morales *et al.*, 2014 encontraron que en músculo esquelético de cerdos en condiciones de estrés por calor la expresión de miosina fue cinco veces menor que en cerdos en condiciones termoneutrales, esta disminución de abundancia del ARNm de miosina coincidía con la reducción de la ganancia diaria de peso y el consumo de alimento. En concordancia, Streffer (1882), mencionó que la maquinaria para la síntesis de proteína muscular se ve reducida como resultado de la hipertermia ambiental; actualmente Baumgard *et al.* (2013) sugieren que el músculo esquelético, en particular los aminoácidos (AA) son movilizados durante periodos de una inadecuada ingesta de nutrientes para proveer sustratos en apoyo del metabolismo energético, habiendo un incremento en el catabolismo de proteínas.

2.10 Proteínas reguladoras del consumo de alimento

2.10.1 Leptina

La leptina es una hormona producida en el tejido adiposo encargada de regular o restringir el consumo de alimento una vez que se ha detectado un incremento en la concentración de ácidos grasos circulantes, de esta manera leptina ayuda a mantener la homeostasis energética (Rabe *et al.*, 2008).

Estructuralmente, leptina es una proteína de 167 aminoácidos, que incluye un péptido señal de 21 aminoácidos. Su estructura tridimensional presenta cuatro hélices alfa y un puente disulfuro entre las cisteínas en posición 96 y 146, siendo este último necesario para la actividad biológica de la hormona (Zhang, *et al.*, 1998, Considine, *et al.* 1997).

Se han identificado una gran variedad de factores que influyen la producción de leptina. A nivel fisiológico el ayuno, ejercicio y exposición al frío provocan una caída en la expresión del gen LEP y una disminución en los niveles circulantes de leptina, mismos que después del ayuno se restituyen rápidamente (Trayhurn, 1995; Becker, 1995). Varios factores metabólicos y endócrinos contribuyen a regular la transcripción del gen LEP en adipocitos, tales como insulina, glucocorticoides naturales y dexametasona (De voss, 1995; Saladin, 1995). Además, insulina parece regular a leptina por mecanismos postranscripcionales y movilizándola la leptina preexistente (Larsson *et al.*, 1996; Rentsch *et al.*, 1996). Por el contrario, las tiazolidinedionas, la noradrenalina y la isoprenalina inhiben la expresión y reducen los niveles circulantes de leptina (Gettys, 1996; Trayhurn, 1996). Gran variedad de citocinas tales como el TNF α (Hamilton *et al.*, 1997) e interleucinas IL-1, LIF y la IL-6 alteran la expresión del ARNm de leptina y su concentración sanguínea (Sarraf, 1997). La elevación de leptina en respuesta a citocinas puede contribuir a la anorexia y a la pérdida de peso en condiciones inflamatorias (Cakir *et al.*, 1999). La glucosa y la ingesta de lípidos poseen efectos similares sobre la leptina sugiriendo que la leptina actúa como un sensor del flujo de nutrientes en tejido adiposo (Janeckova *et al.*, 2001).

Algunos estudios han reportado que colecistoquinina (CCK) estimula la secreción gástrica de leptina *in vivo* e *in vitro* (Tsunoda, 2003). Más aún, la secreción de leptina se incrementa luego de la infusión de secretina, una hormona ácida inhibitoria, y luego de la estimulación vagal en humanos (Sobhani, 2000).

Debido a su actividad en la restricción del consumo, es importante conocer si leptina está involucrada en la reducción del consumo de alimento en animales sometidos a estrés por calor, sin embargo no existe mucha información al respecto. Únicamente un estudio realizado por Dridi *et al.*, (2008) en pollos encontró que en condiciones de calor, y a pesar de una disminución del crecimiento, se incrementó la expresión del gen de leptina hepática y su concentración en plasma, entendiéndose que la expresión de leptina puede ser modificada por efecto del estrés por calor.

2.10.2 Grelina

Grelina es una hormona peptídica secretada principalmente en el estómago. Juega un papel importante en la regulación del comportamiento alimentario tanto en animales como en humanos. Grelina estimula el apetito y por lo tanto está implicada en el control del balance energético y peso corporal. La regulación anormal de los niveles de grelina conduce tanto a sobre peso como a bajo peso, mientras que los efectos de la grelina han sido relativamente bien documentados, los mecanismos responsables de sus efectos están siendo continuamente investigados y actualizados (Tucci *et al.*, 2008). Es probable que al igual que leptina, grelina tenga importancia en el metabolismo energético y control del apetito en animales que se encuentran bajo estrés por calor.

En un estudio reciente se encontró que las altas temperaturas incrementan la expresión de ARNm de grelina en estómago, duodeno y yeyuno en pollos, más no en el hipotálamo, sitio en donde se encuentra el sistema de control de la ingesta de alimento y homeostasis energética (Lei *et al.*, 2013). Por el contrario en gallinas ponedoras en condición de estrés por calor se incrementó la expresión de grelina en hipotálamo (Sogn *et al.*, 2012). Sin embargo los escasos trabajos realizados en cerdos no son concluyentes, ya que se ha encontrado que la expresión y concentración sérica de grelina en estos animales no responden claramente a la alimentación o estatus energético (Scrimgeour *et al.*, 2008).

3.- EFECTO DEL ESTRÉS POR CALOR EN EL COMPORTAMIENTO Y EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES DE NUTRIENTES, HSP90, LEPTINA Y GRELINA EN CERDOS EN CRECIMIENTO

3.1 Resumen

El estrés por calor (EC) resulta de la exposición de animales a temperatura ambiental (TA) elevada que les provocan cambios fisiológicos, metabólicos y de comportamiento. Aunque el impacto del estrés por calor pareciera disminuir conforme el animal se aclimata, no queda claro si estas alteraciones permanecen durante todo el periodo de estrés. Se condujo un experimento para evaluar los efectos de las altas temperaturas en la expresión de genes que codifican para transportadores de AA catiónicos ($b^{0,+}AT$ y CAT-1) y de glucosa (SGLT1 y GLUT4), así como grelina, leptina y HSP90, en diversos tejidos de cerdos en crecimiento. Se emplearon 18 cerdos cruzados (32 ± 4 kg peso vivo), alojados en dos salas, una con temperatura constante en jaulas individuales y expuestos 1) a condiciones termoneutrales $22^{\circ}C$ (TN) con alimentación *ad libitum* ($n=6$); 2) Condiciones de EC (variación de TA típica de verano) con alimentación *ad libitum* ($n=6$); o 3) Alimentación restringida (pf) igualada a los de la sala de EC con condiciones TN (TN_{pf}), $n=6$. Se registró la temperatura corporal (TC), frecuencia respiratoria (FR) y la ingesta de alimento (IA). Se sacrificaron los cerdos a los 21 días de experimentación. La TC y FR fue más alta en cerdos EC comparados con los TN_{pf} durante todo el experimento ($P < 0.001$). No hubo diferencias en la GDP entre los cerdos TN_{pf} y los EC ($P = 0.320$). La expresión de HSP90 fue mayor en duodeno ($P = 0.017$) y músculo *Longissimus dorsi* ($P = 0.038$) de los cerdos EC comparados con los TN_{pf} . La expresión de CAT-1 en hígado fue más alta ($P = 0.050$) pero más baja en *Longissimus* ($P = 0.017$) en los cerdos EC comparados con los cerdos TN_{pf} . La expresión de SGLT1 fue más alta en duodeno de cerdos EC ($P = 0.045$), más no hubo diferencias en yeyuno, comparándolos con los cerdos TN_{pf} ($P = 0.545$). La expresión de leptina y grelina no se afectó por la ingesta de alimento o la TA ($P \geq 0.262$). Estas alteraciones parecieran ser componentes de un mecanismo permanente que los animales utilizan para sobrellevar el EC. Grelina y

leptina podrían no estar envueltas en la reducción de la ingesta de alimento de cerdos aclimatados al estrés. Al parecer el desempeño productivo de los cerdos no es afectado una vez que se aclimatan a la temperatura ambiental elevada.

3.2 Abstract

Exposure of animals to high ambient temperature (AT) resulting in heat stress (HS) provokes changes in their physiology, metabolism and behavior. Although the HS impact seems to decrease as the animal becomes acclimated, it is not clear whether these alterations remain beyond this stage. An experiment was conducted to evaluate the effect of high AT on the expression of genes coding for the transporters of cationic AA ($b^{0,+}$ AT and CAT-1) and glucose (SGLT1 and GLUT4), as well as ghrelin, leptin and HSP90 in several tissues of growing pigs. Crossbred gilts (n=18; 32±4 kg BW) were housed in two rooms, one with constant climate-control room in individual pens and exposed to 1) thermal neutral (TN) conditions (22°C) with ad libitum intake (n=6), 2) HS conditions (summer natural AT variations) with ad libitum intake (n=6) or 3) pair-fed (PF in TN conditions [PFTN], n=6 Body temperature (BT), respiration frequency (RF), BW, and feed intake (FI) were measured. Pigs were sacrificed at 21 d of experimental conditions. BT and RF was higher in HS pigs compared with TN_{pf} pigs at all times (P<0.001). ADG of TN_{ad} pigs was higher than that of TN_{pf} pigs (P<0.001), but there was no difference between that of TN_{pf} and HS pigs (P=0.320). Expression of HSP90 was higher in duodenum (P=0.017) and Longissimus dorsi muscle (P=0.038) of HS pigs compared to TN_{pf} pigs. Cat-1 expression in liver was higher (P=0.050) but in longissimus dorsi was lower (P=0.017) in HS pigs than in TN_{pf} pigs. Expression of glucose transporter SGLT1 was higher (P=0.045) in duodenum of HS pigs than in TN_{pf} pigs but it was not different in jejunum (P=0.545). The expression of ghrelin in gastric mucosa and that of leptin in adipose tissue was not affected by feed intake or AT (P≥0.262). These alterations seem to be components of a permanent mechanism that the animals use to cope with HS. Ghrelin and leptin may not be involved in the reduction of the VFI of pigs acclimated to HS. Furthermore, it appears that the performance of HS pigs is not affected once they become acclimated to high AT.

3.3 Introducción

El estrés por calor (EC) resulta de la exposición de animales a temperatura ambiental (TA) elevada, que les provocan cambios fisiológicos, metabólicos y de comportamiento. Se ha observado que en cerdos que sufren estrés por calor se incrementa la frecuencia cardíaca (FC) y respiratoria (FR) (Patience *et al.*, 2005); el flujo de sangre periférica, y la temperatura corporal (TC) (Wilson and Crandall, 2011), pero disminuye el consumo voluntario de alimento (CVA) (Huynh *et al.*, 2005; Renaudeau *et al.*, 2010).

Estos cambios están orientados a promover la disipación de calor al ambiente y reducir el calor producido dentro del cuerpo (Bernabucci *et al.*, 2009). El impacto del EC es más intenso durante los primeros 8 a 10 días de exposición a la TA elevada (Yu *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2013), dentro de los cuales se observa un incremento en la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP), alteraciones en la función de la membrana plasmática, proliferación celular (Sonna *et al.*, 2002) y altura en las vellosidades intestinales de cerdos (Yu *et al.*, 2010). Los cerdos en estrés por calor tienen menos enterocitos y transportadores de nutrientes que pudieran afectar la absorción de nutrientes. Aunque el impacto del estrés por calor pareciera disminuir conforme el animal se aclimata (Renaudeau *et al.*, 2010), no queda claro si estas alteraciones permanecen durante todo el periodo de estrés.

La absorción del aminoácido lisina (Lis) es crítica en cerdos ya que es el primer AA limitante en la mayoría de los alimentos. Lis es transportada por los sistemas $b^{0,+}$ y CAT-1 (Majumder *et al.*, 2009); $b^{0,+}$ AT es expresado principalmente en células epiteliales (Torras-Llort *et al.*, 2001) y CAT-1 se expresa de manera ubicua (Hatzoglou *et al.*, 2004). Los sistemas SGLT1 y GLUT4 son los transportadores de glucosa más comunes tanto en células epiteliales como no epiteliales respectivamente. Una respuesta aguda al EC reduce la expresión de $b^{0,+}$ AT y las concentraciones séricas de Lis, e incrementa la expresión de HSP90 en cerdos (Morales *et al.*, 2014). Por otro lado, leptina y grelina participan en la regulación del CVA bajo condiciones termoneutrales (Carroll y Allee, 2007). Sin embargo, no se conoce si estas hormonas están involucradas en la reducción de la IVA en

condiciones de EC, y si estas alteraciones moleculares resultantes del estrés por calor permanecen en cerdos aclimatados a altas temperaturas.

La mayoría de los estudios relacionados con EC en cerdos son conducidos exponiéndolos a condiciones de alta TA constante y controlada artificialmente. Sin embargo, los cerdos en granjas en producción son expuestos diariamente a variaciones naturales de temperatura ambiental. Un mejor entendimiento de los cambios metabólicos y fisiológicos resultados de la exposición de cerdos a condiciones naturalmente altas de TA son necesarias para el diseño de estrategias de alojamientos y dietas más eficientes en la producción porcina. Los objetivos de este estudio fueron, a) evaluar los efectos de la alta TA en la expresión de genes que codifican para el transporte de aminoácidos catiónicos AA ($b^{0,+}$ AT y CAT-1) y glucosa (SGLT1 y GLUT4), así como de grelina, leptina y HSP90 en tejidos de cerdos en crecimiento, y b) determinar si la reducción en el comportamiento productivo en los cerdos expuestos a altas TA son provocados por factores diferentes a solamente la reducción del CVA.

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Locación, animales y dieta

Los cerdos utilizados en el presente experimento fueron manejados de acuerdo con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana para el cuidado de animales (NOM-062-Z00-1999, 2001).

Se condujo un experimento durante el verano cuando la TA fluctúa de 25 (promedio bajo) a 42 °C (promedio alto). 18 cerdos de cruce (Landrace x Hampshire x Duroc) con peso corporal (PC) de 32.6 ± 3.2 kg fueron distribuidos al azar en 3 grupos de 6 cerdos cada grupo, aleatorizados por sexo, camada y PC, bajo el diseño de bloques completos al azar. Los cerdos de un grupo fueron alojados en una sala en la que no había control de temperatura, expuestos a las elevaciones naturales de temperatura, y fueron alimentados *ad libitum* (EC). Los cerdos de los otros dos grupos fueron alojados en una sala con aire acondicionado (termoneutral) donde el termostato se ajustó a $24 (\pm 2)$ °C; de estos grupos, uno

fue alimentado *ad libitum* (TN_{ad}) mientras que en el otro grupo su alimentación fue restringida e igualada a la de los cerdos de la sala EC (TN_{pf}). Los cerdos fueron alojados individualmente en jaulas metabólicas con piso elevado (1.2 m ancho, 1.2 m largo y 1.0 m alto) equipadas con comederos de acero inoxidable, un bebedero tipo chupón y suelo de malla de hierro. Todos los cerdos se pesaron semanalmente; calculándose con la misma frecuencia la ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA) y la conversión alimenticia (CA). La media del PC de los cerdos al final de los 21 días de experimento fue de 46.1 ± 4.5 kg. Todos los cerdos fueron alimentados con una dieta (10.4% CP) a base de trigo (905 g/kg) y soya (65 g/kg) suplementada con 0.48% L-Lis y 0.13% L-Tre. Los ingredientes de la dieta fueron analizados para establecer el contenido de AA (método 982.30; AOAC, 2006). El contenido calculado de AA esenciales en la dieta (g/kg) fue: Arg, 7.1, His, 4.3; Ile, 4.7; Leu, 9.1; Lis, 8.3; Met, 2.5; Fen, 7.1; Tre, 5.2; Trp, 1.6; Val, 5.8. La dieta contenía 10.1 MJ de EN por kg y cubrió los requerimientos de los AA, minerales y vitaminas para cerdos de 20–50 kg (NRC, 1998). Tanto los cerdos EC como TN_{pf} tuvieron una ingesta similar, correspondiente aproximadamente al 95% del CDA de los cerdos EC con alimentación *ad libitum*, cantidad que fue previamente establecida y ajustada cada semana a lo largo del estudio. Esta cantidad fue aproximadamente 20% menos que el CDA estimado para cerdos TN_{ad} con este mismo peso. El alimento se ofreció 2 veces al día a las 0700 y 1900h. Los cerdos tuvieron un tiempo de adaptación a sus jaulas metabólicas y se les entrenó para consumir su alimento en 30 minutos o menos durante 7 días previos al inicio del experimento. Se ofreció agua purificada disponible a libre acceso durante todo el estudio. La TC y FR de cada cerdo fue tomada dos veces por semana a las 0800, 1200, 1600 y 2000 h. La TC se midió con la ayuda de un termómetro ótico, al mismo tiempo, se calculó la FR contando el número de expansiones del tórax resultado de la aspiración durante 1 minuto. También se registraron tanto la humedad relativa (HR) como la TA dentro de cada sala durante todo el estudio con la ayuda de termógrafos (Thermotracker BT; iButtonLink LLC, Whitewater, WI, USA), configurados para grabar valores de TA y HR cada 15 minutos, para luego ser analizados con el

software Thermotracker Pro (version y fabricante). Los resultados se utilizaron para calcular el índice de calor (IC) de acuerdo Steadman (1979) con la ecuación modificada por Rothfusz (1990).

3.4.2 Recolección de tejidos

Al final de los 21 días de experimentación, todos los cerdos se sacrificaron por aturdimiento eléctrico y desangrado, 2.5 horas después de su última alimentación. Se tomaron muestras (aproximadamente 1g) de estómago (región fúndica), mucosa de duodeno y yeyuno; hígado; músculos *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus*; y tejido adiposo (grasa dorsal de la 10^a y 11^a costilla). Las muestras se colocaron en tubos de 2-ml, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -82° C para su posterior análisis.

3.4.3 Extracción de ARN y transcripción reversa

Se extrajo ARN total de todos los tejidos colectados por medio del reactivo Trizol (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a lo reportado por Méndez *et al.* (2011). El ARN purificado se diluyó en 30 µl de agua destilada libre de ribonucleasas y se almacenó a -82 °C. La concentración total de ARN se determinó por espectrofotometría (Helios β, Thermo Electron Co., Rochester, NY, USA) a 260 nm, y la pureza del ARN se evaluó mediante el uso de la relación A260/A280, que varió desde 1.8 a 2.0 (Sambrook y Russell, 2001). La integridad del ARN total se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Todas las muestras de ARN tuvieron buena calidad con una relación de ARNr 28S:18S alrededor de 2.0:1 (Sambrook y Russell, 2001). Aproximadamente 2 µg de ARN total fue tratado con 1 U de Desoxirribonucleasa I (1 U µl⁻¹; Invitrogen) y se realizó su transcripción reversa de acuerdo a como lo habían descrito García-Villalobos *et al.* (2013). Las muestras de cDNA fueron cuantificadas por espectrofotometría, y diluidas para tener una concentración final de 50 ng·µl⁻¹.

3.4.4 PCR-Tiempo Real

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los ARNm de HSP90, leptina, grelina, $b^{0,+}$ AT, CAT-1, SGLT1 y GLUT4 y del gen que codifica al ARN ribosomal 18S, de acuerdo con sus secuencias publicadas en el Genbank (Cuadro 2). El gen constitutivo ARNr 18S fue utilizado como un control endógeno para normalizar las variaciones en el ARNm ya que su expresión es muy estable (Liao *et al.*, 2009). Antes de iniciar, se realizó PCR de punto final para estandarizar las condiciones de amplificación para cada par de oligonucleótidos; con el fin de confirmar la especificidad de los productos de PCR en relación con su ARNm, una muestra de cada producto de PCR se purificó con un kit comercial (PureLink PCR Purification kit, Invitrogen) y fue secuenciado en el Centro de Secuenciación Davis (Davis Sequencing, Davis, CA, USA). Los resultados de la secuenciación revelaron que los productos para HSP90, leptina, grelina, $b^{0,+}$ AT, CAT-1, SGLT1, GLUT, y ARNr 18S tuvieron 100% de homología con su secuencia esperada correspondiente de acuerdo a la secuencia virtual reportada en el GenBank.

Las expresiones de los genes que codifican para HSP90, leptina, grelina, $b^{0,+}$ AT, CAT-1, SGLT1 y GLUT4 se estimaron por PCR cuantitativo (qPCR), usando SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas) en un termociclador Chromo 4-DNA con un software MJ Opticon Monitor 3.1 (Bio-Rad, Herefordshire, England). El equipo se calibró con una curva estándar usando el ARNr 18S clonado en el vector TOPO 4.0, produciendo un cDNA que se utilizó como calibrador. Para obtener la curva estándar se realizaron diluciones seriales de 100 en 100 del cDNA cuya concentración se conocía. Las reacciones para PCR cuantitativo contenían 50 ng de cDNA, 0.5 μ M de cada oligonucleótido específico, 12.5 μ l de 2x SYBR green/ROX qPCR Master Mix, y agua libre de ADNasa/ARNasa para completar el volumen final de 25 μ l. Las condiciones de la PCR utilizadas en la amplificación y la cuantificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización (95 °C por 1 min), seguido por 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, alineación a 56 °C durante 15 segundos, y extensión a 72 °C durante 30 segundos) y un programa de curva de desnaturalización (60°C a

90°C). La fluorescencia se midió al final de cada ciclo y cada 0.2 °C durante el programa de desnaturalización. La abundancia relativa de ARNm fue normalizada con la abundancia relativa del 18S calculando la tasa de abundancia relativa ARNm:ARNr 18S (Liao *et al.*, 2009).

3.4.5 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del SAS (Statistical Analysis System 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). La frecuencia respiratoria y la TC fueron analizadas de acuerdo a un diseño de medición de repeticiones. Los niveles de probabilidad de $P \leq 0.05$, y $0.05 < P \leq 0.10$ se definieron como diferencias significativas y tendencias respectivamente.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para el análisis del cDNA por PCR cuantitativo derivados de proteínas de choque térmico 90KDa, leptina, grelina, transportadores de aminoácidos ($b^{0,+}AT$ y CAT1), transportadores de glucosa (SGLT1 y GLUT4), y ARN ribosomal 18S de cerdos.

mRNA	Oligos	Locación (bp) en el templete	Secuencia	Tamaño del Amplicón (pb)
<i>Sus scrofa</i> Proteína de choque térmico 90-kDa, HSP90AA1 (GenBank: NM_213973)				
	Sentido	991-1010	5'GATCACTTGGCTGTGAAGCA3'	470
	Antisentido	1441-1460	5'TTGAGGGAAACCATCTCGTC3'	
<i>Sus scrofa</i> leptina, LEP (GenBank: NM_213840.1)				
	Sentido	879-899	5'ACGTTGAAGCCGTGCCCATCT3'	307
	Antisentido	1168-1185	5'GGCAAGGGGCAGCTCTTGGA3'	
<i>Sus scrofa</i> grelina/obestatin prepropeptido, GHRL (GenBank: NM_213807)				
	Sentido	148-167	5'CAAGAAGCCAGCAGCCAAAC3'	290
	Antisentido	418-437	5'GAAGCCAGGTGAGCCCTTAG3'	
<i>Sus scrofa</i> Transportador de aminoácidos, $b^{0,+}AT$ (SLC7A9, GenBank: EF127857)				
	Sentido	1-19	5'CGGAGAGAGGATGAGAAGT3'	562
	Antisentido	545-562	5'GCCCCGCTGATGATGATGATGA3'	
<i>Sus scrofa</i> Transportador catiónico de aminoácidos, CAT1 (SLC7A1, GenBank: AY371320)				
	Sentido	4239-4258	5'GTCGGTTGCAAAGACCATTT3'	329
	Antisentido	4548-4567	5'GAGCGGTGCTGACAACAGTA3'	
<i>Sus scrofa</i> contrtransportador de sodio/glucosa SGLT1(SLC5A1, GenBank: NM_001164021)				
	Sentido	9-28	5'GGCTGGACGAAGTATGGTGT3'	342
	Antisentido	331-350	5'CCCAAGGCCAAGGTGATGAA3'	
<i>Sus scrofa</i> Transportador de glucosa facilitado, GLUT4 (SLC2A4, GeneBank: NM_001128433)				
	Sentido	354-373	5'GAAGGAAGAAGGCAATGCTG3'	300
	Antisentido	634-653	5'CCAGGAGTAGTGGCCATAGG3'	
<i>Sus scrofa</i> RNA ribosomal 18S (GenBank: AY265350)				
	Sentido	236-255	5'GGCCTCACTAAACCATCCAA3'	295
	Antisentido	511-530	5'TAGAGGGACAAGTGGCGTTTC3'	

3.5 Resultados

3.5.1 Temperatura ambiental, humedad relativa y heat index

La TA y HR registradas cada 15 minutos en las salas de calor y termoneutral los días 8 al 20 se muestran en la Figura 1. La TA máxima y mínima en la sala EC fue de 37.6 y 23.6 °C respectivamente, con una media de 32.1 °C; la HR fluctuó entre 30 y 85%. En contraste, en la sala termoneutral la TA máxima y mínima fue de 28.6 y 22.5 °C, con una media de 24.8 °C, los rangos de HR fueron de 52 a 82%. Las medias de los valores registrados de TA de las salas EC y termoneutral en 4 horas determinadas (0800, 1200, 1600 and 2000 h), del día 17 al 20, así como el IC calculado se presentan en la Figura 2. Los rangos de temperatura presentes en la sala termoneutral fueron de 24.9 a 27.0°C mientras que en la sala EC fluctuaron de 31.8 a 36.3 °C. De igual manera los rangos del IC fueron de 78.9 a 83.1 para la sala termoneutral, y 98.3 to 105.3 para la sala de calor. Los rangos de HR en la sala termoneutral fueron de 58.0 a 79.9% y para la sala de calor de 36.4 hasta 57.5%.

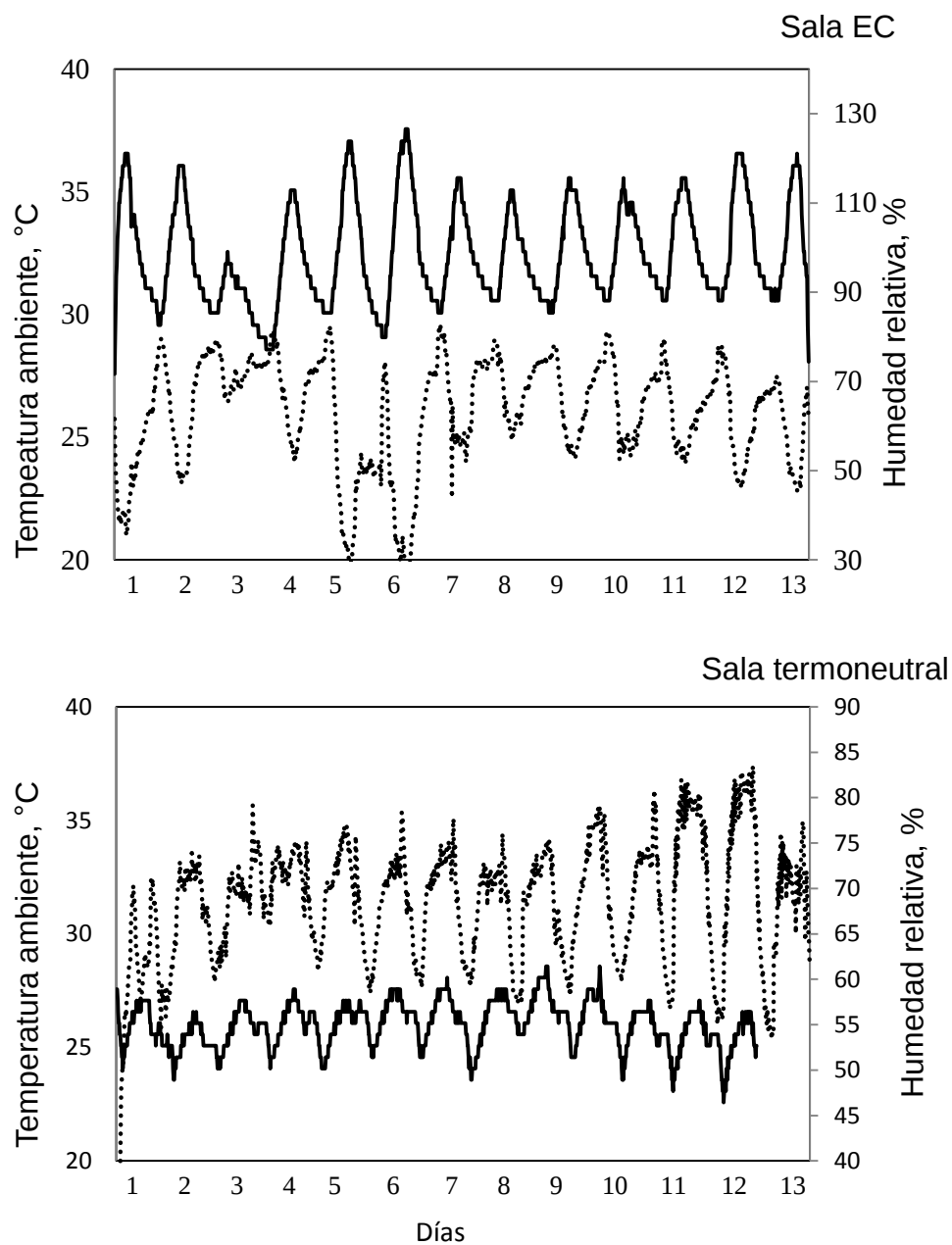


Figura 1. Variaciones diurnas de temperatura ambiental (línea continua) y humedad relativa (línea punteada) dentro de las salas EC y termoneutral durante 13 días (d3 a d16) del experimento.

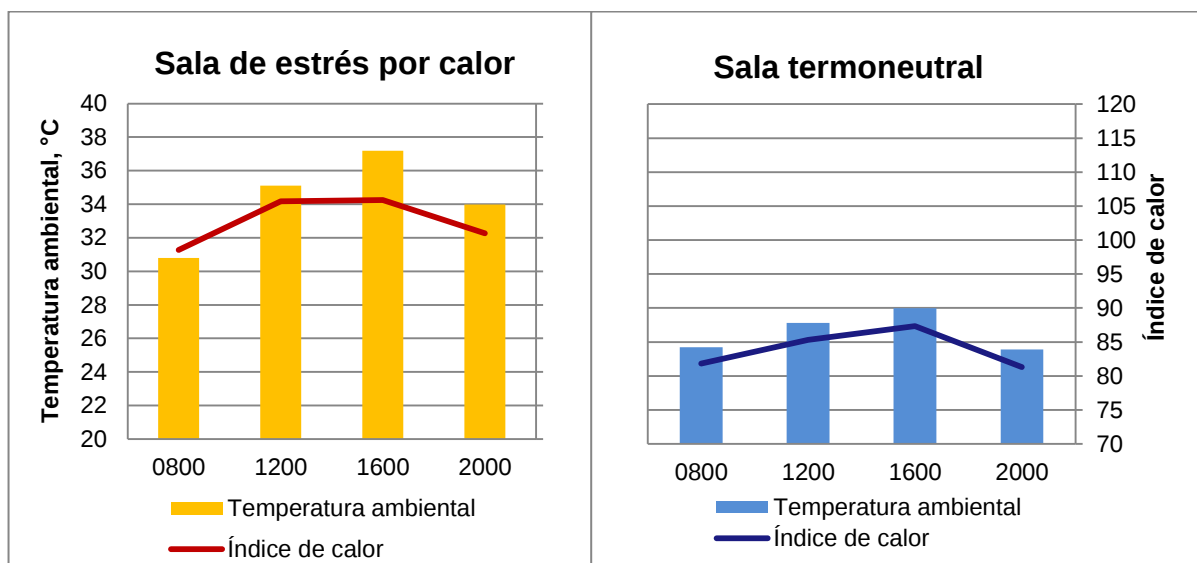


Figura 2. Promedio de la temperatura ambiental (TA) registrada en 4 diferentes horas del día (0800, 1200, 1600 and 2000 h) dentro de las salas de estrés por calor y termoneutral, el índice de calor (IC) calculado en base a la temperatura ambiente y humedad relativa, de los d 17 a 20 del experimento.

3.5.2 Frecuencia respiratoria y temperatura corporal

Los valores de FR y TC de los cerdos TN_{ad} , TN_{pf} o EC tomadas a diferentes horas se presentan en el Cuadro 3. La FR de los cerdos TN_{ad} fue siempre mayor que la de los cerdos TN_{pf} ($P < 0.05$). La FR de los cerdos EC también fue más alta comparado con los cerdos TN_{pf} ($P < 0.001$), éstos últimos tuvieron la misma ingesta de alimento que los EC. No hubo diferencias en la temperatura corporal tomada a las 0800, 1200 y 2000 h de los cerdos TN_{ad} y TN_{pf} , pero fue más elevada en los cerdos TN_{ad} que en los TN_{pf} a las 1600 h ($P = 0.037$). En contraste la TC fue mayor en los cerdos EC comparada con los cerdos TN_{pf} a cualquier hora ($P < 0.001$). Cuando se comparó la FR y la TC a diferentes horas del día, dentro de cada tratamiento, el valor más alto de la TC en los cerdos TN_{ad} se observó a las 1600 y

2000 h, pero el valor más alto de FR se observó a las 1600 h ($P<0.05$). La FR y TC no varió en los cerdos TN_{pf} ($P>0.10$). En los cerdos EC tanto la FR como TC presentaron sus puntos más altos a las 1200 y 1600 h ($P<0.01$). En promedio, las FR y TC fueron mayores en los cerdos EC que en TN_{ad} y TN_{pf} ($P<0.001$).

Cuadro 3. Frecuencia respiratoria (FR) y temperatura corporal (TC) de cerdos alojados en sala termoneutral con alimentación *ad libitum* (TN_{ad}) o alimentación restringida (TN_{pf}), y cerdos alojados en condiciones de estrés por calor (EC).

Punto	Tiempo	Tratamiento			SEM	Contrastes, $P=$	
		TN_{ad}	TN_{pf}	EC		TN_{ad} vs. TN_{pf}	TN_{pf} vs. EC
FR	0800	58.7	47.7	76.4	3.48	0.031	<0.001
	1200	54.8	46.9	122.1	5.88	0.034	<0.001
	1600	71.2	55.3	112.1	5.25	<0.001	<0.001
	2000	56.6	46.4	78.5	4.77	0.006	<0.001
TC	0800	38.1	37.9	38.8	0.13	0.242	<0.001
	1200	37.7	37.9	39.4	0.20	0.625	<0.001
	1600	38.6	37.8	39.4	0.11	0.037	<0.001
	2000	38.6	38.0	38.9	0.15	0.136	<0.001

3.5.3 Comportamiento de los cerdos

Los resultados de comportamiento productivo se presentan en el Cuadro 4. Como se esperaba la GDP de los cerdos TN_{ad} fue más elevada ($P<0.001$), pero no hubo diferencias entre los cerdos TN_{pf} y EC ($P=0.320$). El CDA fue más elevado en cerdos TN_{ad} que en los cerdos TN_{pf} ($P<0.001$) pero, debido al diseño experimental no hubo diferencia entre los cerdos TN_{pf} y EC ($P=0.412$). La CA no se afectó por la ingesta del alimento o la TA.

Cuadro 4. Ganancia diaria de peso (GDP), ingesta de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA) de cerdos alojados en sala termoneutral con alimentación *ad libitum* (TN_{ad}) o alimentación restringida (TN_{pf}), y cerdos alojados en condiciones de estrés por calor (EC).

Variable	Tratamiento			SEM	Contrastes, $P=^*$	
	TN _{ad}	TN _{pf}	EC		TN _{ad} vs. TN _{pf}	TN _{pf} vs. EC
ADG, kg/d	0.666	0.515	0.473	0.028	< 0.001	0.320
ADFI, kg/d	1.47	1.20	1.17	0.028	< 0.001	0.428
FCR	2.22	2.38	2.54	0.139	0.193	0.412

*TN_{ad} vs. TN_{pf}: Efecto del nivel de ingesta de alimento; TN_{pf} vs. EC: Efecto de la temperatura ambiental.

3.5.4 Expresión genética

Los valores de expresión de HSP90, grelina y leptina en diferentes tejidos, se presentan en el Cuadro 5. La expresión de HSP90 fue más alta en duodeno ($P=0.017$) y músculo *Longissimus dorsi* ($P=0.038$) de los cerdos EC comparado con los cerdos TN_{pf}. En contraste la expresión de HSP90 no se afectó por el nivel de ingesta de alimento en duodeno, hígado, *Longissimus dorsi* y *Semitendinosus* ($P\geq 0.181$); la expresión de HSP90 tampoco se afectó por la TA en hígado ($P=0.437$) ni en músculo *Semitendinosus* ($P=0.654$). La expresión de grelina en la

mucosa gástrica y leptina en tejido adiposo no se afectó por la ingesta de alimento o la TA ($P \geq 0.262$).

Cuadro 5. Expresión relativa de RNA mensajeros que codifican para proteínas de choque térmico 90 (HSP90), grelina y leptina en diversos tejidos de cerdos alojados en sala termoneutral con alimentación *ad libitum* (TN_{ad}) o alimentación restringida (TN_{pf}), y cerdos alojados en condiciones de estrés por calor (EC; unidades arbitrarias: proporción ARNm:ARNr 18S) .

Gen	Tejido	Tratamiento				Contrastes, $P = *$	
		TN _{ad}	TN _{pf}	EC	EE	TN _{ad} vs. TN _{pf}	TN _{pf} vs. EC
Grelina	Estómago	0.0038	0.0061	0.0042	0.0014	0.262	0.335
Leptina	Adiposo	0.0017	0.0007	0.0008	0.0006	0.270	0.924
HSP90	Duodeno	0.0072	0.0036	0.176	0.0036	0.496	0.017
	<i>Longissimus</i>	0.0007	0.0005	0.0017	0.0004	0.670	0.038
	<i>Semitendinosus</i>	0.0008	0.0006	0.0007	0.0002	0.634	0.654
	Hígado	0.0059	0.0086	0.0063	0.0028	0.366	0.437

*TN_{ad} vs. TN_{pf}: Efecto del nivel de ingesta de alimento; TN_{pf} vs. EC: Efecto de la temperatura ambiental.

Los valores de expresión de los transportadores de AA y glucosa en intestino, hígado y músculo, se presentan en el Cuadro 6. La expresión de b^{0,+}AT en duodeno y yeyuno no se afectó por el nivel de ingesta de alimento o la TA ($P \geq 0.371$). La expresión de CAT-1 en el hígado fue más alta ($P = 0.050$) pero en *Longissimus dorsi* fue menor ($P = 0.017$) en cerdos EC comparados con los cerdos TN_{pf}; la ingesta de alimento no afectó la expresión de los genes de transportadores de aminoácidos en ninguno de los tejidos analizados ($P \geq 0.270$). La expresión del transportador de glucosa SGLT1 fue mayor ($P = 0.045$) en duodeno de los cerdos EC que en los cerdos TN_{pf} pero no hubo diferencias en

yeyuno ($P=0.545$); el nivel de ingesta de alimento no afectó la expresión de este gen ($P\geq 0.606$). El transportado de glucosa GLUT4 presentó una tendencia a una mayor expresión en músculo *Semitendinosus* de cerdos EC ($P=0.063$), pero no se observaron diferencias en hígado y *Longissimus dorsi* ($P\geq 0.164$). La ingesta de alimento no afectó la expresión GLUT4 en ninguno de los tejidos estudiados ($P\geq 0.435$).

Cuadro 6. Expresión relativa de RNA mensajeros que codifican para transportadores de aminoácidos ($b^{0,+}AT$, CAT-1) y glucosa (SGLT1, GLUT4) en diversos tejidos de cerdos alojados en sala termoneutral con alimentación *ad libitum* (TN_{ad}) o alimentación restringida (TN_{pf}), y cerdos alojados en condiciones de estrés por calor (EC; unidades arbitrarias: proporción mRNA:ARNr 18S).

Gen	Tejido	Tratamiento				Contrastes, $P= *$	
		TN_{ad}	TN_{pf}	EC	EE	TN_{ad} vs. TN_{pf}	TN_{pf} vs. EC
$b^{0,+}AT$	Duodeno	0.0387	0.0311	0.0326	0.0062	0.401	0.865
	Yeyuno	0.0403	0.0284	0.0378	0.0090	0.371	0.475
CAT-1	Hígado	0.0011	0.0008	0.0181	0.0058	0.967	0.050
	<i>Longissimus</i>	0.0016	0.0023	0.0007	0.0004	0.270	0.017
	<i>Semitendinosus</i>	0.0009	0.0007	0.0013	0.0003	0.755	0.228
SGLT1	Duodeno	0.0014	0.0016	0.0047	0.0009	0.870	0.045
	Yeyuno	0.0143	0.0111	0.0148	0.0042	0.606	0.545
GLUT4	Hígado	0.0014	0.0016	0.0047	0.0015	0.722	0.164
	<i>Longissimus</i>	0.0033	0.0035	0.0048	0.0013	0.933	0.515
	<i>Semitendinosus</i>	0.0032	0.0024	0.0044	0.0005	0.435	0.063

* TN_{ad} vs. TN_{pf} : Efecto del nivel de ingesta de alimento; TN_{pf} vs. EC: Efecto de la temperatura ambiental.

3.6 Discusión

El presente experimento se condujo para analizar el desempeño productivo, respuesta en expresión genética y fisiológica de cerdos en EC con el mismo nivel de alimento que su contraparte en condición TN. La TA y HR registradas, así como el IC resultante, muestran que los cerdos de la sala de calor estuvieron expuestos a estrés por calor al menos 12 h diariamente (Xin *et al.*, 1998). Estos datos indican que los cerdos alojados en condiciones comunes, están expuestos a importantes variaciones de TA. En contraste, de acuerdo a Xin *et al.* (1998), el promedio de IC en la sala termoneutral fue menor al valor que se considera causante del estrés por calor. Por otro lado, los cerdos expuestos a condiciones de estrés por calor mostraron una dramática reducción en el consumo de alimento (Huynh *et al.*, 2005; Renaudeau *et al.*, 2010). En el presente experimento, uno de los 2 grupos de cerdos fue alojado bajo condiciones termoneutrales (TN_{pf}) pero con el mismo nivel de consumo de alimento que los cerdos EC para eliminar cualquier impacto potencial que la diferencia de la CDA pudiera tener al analizar las variables; el otro grupo de cerdos fue alimentado *ad libitum* (TN_{ad}). El consumo voluntario de alimento de los cerdos EC fue cerca del 79% de lo consumido por los cerdos TN_{ad}. Por lo que cualquier diferencia en el desempeño, temperatura corporal, respuesta fisiológica y molecular entre los cerdos EC y TN_{pf} puede ser atribuida simplemente a los cambios en la TA.

Los valores elevados en la FR (Patience *et al.*, 2005) y TC (Wilson y Crandall, 2011) son indicadores de EC en los cerdos. Pearce *et al.* (2014) reportaron que los cerdos expuestos de manera constante a temperaturas de 36 °C duplicaban su FR e incrementaban su TC 2.0 °C durante las primeras 2 h y ésta permanecía elevada después de 6 h. En el presente experimento, la TC de los cerdos EC tuvo un promedio de 1.2 °C más elevado que los cerdos TN_{pf}, con rangos que fueron de 0.9 °C a las 0800 h hasta 1.6 °C a las 1600 h. De la misma manera, la FR fue en promedio cerca del doble en los cerdos EC comparados con los cerdos TN_{pf}, con los valores más altos observados a las 1200 y 1600 h. Los valores más altos de TC y FR se observaron cuando la TA y el IC fueron también

los más elevados. Incrementos similares de la TC y FR en cerdos como resultado a la exposición constante de temperatura 36 °C durante 20 d, fueron reportados por Renaudeau *et al.* (2010). El consumo de alimento en cerdos alojados en condiciones termoneutrales no afectaron la TC. Estos datos, indican que el calor generado durante la digestión y metabolismo de nutrientes en cerdos bajo condiciones termoneutrales puede ser eliminado completamente sin incrementarse la temperatura corporal. Sin embargo, la elevada FR de los cerdos TN_{ad} comparada con los cerdos TN_{pf} sugiere que existe un mecanismo para eliminar el calor producido, y parcialmente explicar la diferencia en la TC entre los cerdos TN_{ad} y TN_{pf} .

La reducción en el consumo de alimento en los cerdos expuestos a condiciones de EC se supone, es la responsable de su bajo desempeño. En cerdos bajo estrés por calor se puede presentar un desvío de nutrientes, en especial aminoácidos dirigidos al crecimiento, para sustentar las alteraciones fisiológicas causadas por la TA (Baumgard and Rhoads, 2013). Utilizar el mismo nivel de alimentación en los cerdos permite diferenciar los efectos directos del EC de los indirectos (reducción de la ingesta de alimento) en el comportamiento de los animales. Recientemente reportamos una disminución del 11% en la ganancia de peso en cerdos EC comparados con su contraparte en condiciones termoneutrales bajo el mismo nivel de alimentación (Morales *et al.*, 2014). Sin embargo en el presente experimento la GDP y CA de los cerdos EC no mostró diferencias con los cerdos TN_{pf} , mientras que los cerdos TN_{ad} crecieron cerca del 23% más rápido que los cerdos, TN_{pf} y HS. Estas discrepancias podrían ser atribuidas al hecho de que los cerdos en el presente experimento fueron expuestos a TA máximas de 37 °C en contraste a otros casos donde los animales fueron expuestos a TA que alcanzaban los 45 °C por cerca de 4 h diariamente. Por lo tanto efectos directos del EC en cerdos parecen ser dependientes de la magnitud y duración de la TA a las que son expuestos. Por otro lado, Rhoads *et al.* (2009) reportaron que la disminución en la ingesta de alimento en vacas en EC solo explicaba el 35% de la reducción de la producción de leche y que el resto del decremento de la producción, eran resultado directo del EC. Los resultados del presente

experimento, al contrario del de las vacas lecheras, muestran que el comportamiento de cerdos en crecimiento con EC es afectado principalmente de manera indirecta por la reducción en el CDA, más que por los efectos directos del EC. Sin embargo es importante mencionar que los valores de GDP no ofrecen información sobre la composición de la ganancia de peso (tejido adiposo o músculo). Por consiguiente aunque no se presentaron diferencias en la GDP se puede especular que el EC podría afectar de manera indirecta el incremento en la composición (grasa o proteína) del tejido más allá de los efectos directos de la reducción del consumo de alimento.

La reducción en el consumo voluntario de alimento está dirigido a promover la pérdida de calor al ambiente y reducir el calor producido dentro del cuerpo (Bernabucci *et al.*, 2009). Leptina y grelina están involucrados en el mecanismo que regula el consumo voluntario de alimento en cerdos en condiciones termoneutrales (Carroll y Allee, 2009) pero no es claro si estas hormonas participan en la reducción del consumo en cerdos aclimatados a alta TA. Grelina que es secretada por el estómago después de 12 horas de ayuno, estimula el apetito (Salfen *et al.*, 2003). Lei *et al.* (2013) reportó un incremento en la expresión de grelina en el estómago, duodeno y yeyuno de pollos expuestos a temperaturas constantes de 36°C con 65% de HR durante las primeras 6 h, e indicó que grelina podría ser el principal blanco regulador de la anorexia inducida por el EC agudo. De manera similar, Pearce *et al.* (2014) reportaron incrementos en los niveles de grelina circulante durante las primeras 6 h al exponer a cerdos a temperaturas constantes de 37 °C con 40% de HR. En el presente experimento, sin embargo, la expresión de grelina no se vio afectada por el EC. Las concentraciones circulantes de grelina parecen reflejar más los cambios en el balance de energía que en su actividad de regulador del apetito. (Scrimgeour *et al.*, 2008), lo cual explica la falta de efecto del EC sobre la expresión de grelina. Leptina, en contraste, es un supresor del apetito producido por diversos tipos celulares, especialmente en adipocitos (Margetic *et al.*, 2002) y células gástricas; éstas últimas secretan leptina al lumen gástrico (Cammisotto y Bendayan, 2007). Un incremento en las concentraciones séricas de leptina fueron observadas en ratones obesos

expuestos a moderado EC crónico (35 °C) por 5 días (Morera *et al.*, 2012). En contraste, nosotros encontramos que la abundancia de ARNm de leptina en cerdos después de 21 días de ser alojados bajo condiciones variadas de EC, fue aproximadamente una décima comparada con la de los cerdos alojados en condiciones termoneutrales (Morales *et al.*, 2014). En el presente experimento la expresión de leptina no fue afectada por el EC. Por consiguiente nuestros datos de expresión de grelina y leptina podrían indicar que estos péptidos no están involucrados en la reducción del consumo de alimento de los cerdos aclimatados al EC. Un mecanismo de control alternativo al consumo de alimento como la motilidad entero-gástrica, colecistoquinina, y el péptido insulínico dependiente de glucosa, podrían estar involucrados pero todavía necesitan ser elucidados.

Alteraciones moleculares, incluyendo el sistema HSP que ayuda a proteínas recién formadas a mantener su plegado y función (Kiang y Tsokos, 1998), están asociadas comúnmente con la respuesta de los cerdos al EC. Estas son las proteínas más abundantes en la célula y su función consiste en ayudar al correcto ensamblado de las interacciones no covalentes en proteínas sintetizadas recientemente para facilitar el plegado correcto (Gething y Sambrook, 1992). El EC severo podría incrementar la cantidad de proteínas desnaturalizadas y desequilibrar la homeostasis, que podría llevar a la disfunción intracelular (Yamaguchi *et al.*, 2010). Pearce *et al.* (2014) reportaron un incremento en la expresión de HSP90 en íleon de cerdos durante las primeras 2 a 6 h de exposición constante a 36 °C. Una respuesta similar fue observada en células Caco-2 expuestas 2 h a altas temperaturas (Dokladny *et al.*, 2006). Recientemente reportamos mayor abundancia de ARNm de HSP90 en cerdos expuestos a EC por 20 d, comparado con cerdos en condiciones termoneutrales (Morales, *et al.*, 2014). En el presente experimento la expresión de HSP90 en duodeno y en músculo *Longissimus* fue cerca de 50 y 4 veces más alta, respectivamente, en cerdos con EC que en cerdos TN_{pr}. El incremento sustancial en la síntesis de HSP90 en cerdos con EC hasta el término de los 20 días de experimentación, sugiere que las HSP son componentes importantes del mecanismo de aclimatación a largo plazo. De manera adicional debido a que no se encontraron

diferencias en el comportamiento entre los cerdos EC y TN_{pf}, estos resultados sugieren un eficiente reciclado de proteínas funcionales como las HSP en cerdos.

Las respuestas a corto plazo (los primeros 3 días de exposición a alta TA) de cerdos con EC se asocian con impactos negativos sobre la integridad y fisiología intestinal, la cual puede comprometer su capacidad de absorción. Yu *et al.* (2010) reportaron daños considerables en las puntas de las vellosidades intestinales (vellosidades con menos altura y criptas profundas) en yeyuno de cerdos miniatura expuestos a temperaturas constantes de 40 °C por 5 h/d, durante los primeros 3 a 6 días. Sin embargo, la información es limitada en lo que respecta al efecto de la exposición crónica por alta TA en los aspectos moleculares de la capacidad de absorción intestinal. Recientemente reportamos que cerdos expuestos repetidamente a condiciones de temperatura extremadamente altas (40 a 45 °C) por 5 h/d o más, durante un periodo de 19 d, reducen la abundancia de ARNm de b^{0,+}AT en yeyuno e hígado comparándolos con su contraparte con el mismo nivel de alimentación en condiciones termoneutrales (Morales *et al.*, 2014). Esta respuesta en yeyuno fue explicada como resultado de una probable disminución de la proliferación de enterocitos (Yu *et al.*, 2010). El presente experimento tuvo una duración de 20 días, 10 días más después del tiempo en que se consideran aceptable para que los cerdos aclimaten al EC (Renaudeau *et al.*, 2010); además de que la máxima TA en la sala de calor estuvo en el rango de 34 a 37 °C. La expresión de b^{0,+}AT en duodeno y yeyuno no se afectó por el EC, pero la expresión de CAT-1 en hígado fue de 23 veces más elevada en cerdos EC. La falta de respuesta al EC respecto a la expresión de b^{0,+}AT en el presente experimento, sugiere que la expresión de genes en el intestino es dependiente de la intensidad y duración de la exposición a altas temperaturas. Por otro lado, el incremento en la expresión del transportador de glucosa más abundante en el intestino delgado, SGLT1, concuerda con el incremento de la concentración de glucosa en plasma de los cerdos durante la fase aguda de la exposición al EC, de acuerdo con lo reportado por Pearce *et al.* (2014). Esta respuesta podría indicar un mecanismo celular para mantener la disponibilidad de glucosa y compensar la reducción de ingesta de glucosa causada por la disminución del consumo de

alimento. De manera adicional, la tendencia de los cerdos EC de incrementar la expresión de GLUT4 en hígado y músculo *semitendinosus* sugeriría un incremento en la captación de glucosa por estos tejidos. Los cambios combinados en la expresión de CAT-1 y el transportador de glucosa observados en el presente experimento indican que los cerdos con EC hacen ajustes específicos para mantener la disponibilidad de nutrientes para las células.

En conclusión, los resultados del presente experimento muestran que el consumo voluntario de alimento permanece bajo mientras que las constantes fisiológicas FR y TC permanecen elevadas en cerdos aparentemente aclimatados al EC comparados con los que se encuentran en condiciones termoneutrales. La expresión de HSP90, CAT-1, SGLT1 y GLUT4, también se incrementan en algunos tejidos en cerdos bajo EC. Estas alteraciones parecieran ser componentes de un mecanismo permanente que los animales utilizan para sobrellevar el EC. Contrariamente la expresión de grelina y leptina no es afectada por el EC, sugiriendo que estas hormonas podrían no estar involucradas en la reducción del consumo de alimento en cerdos aclimatados al EC. Además pareciera que el comportamiento de los cerdos EC no es afectado una vez que se aclimatan a TA elevada.

4.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. 2006. Official methods of analysis. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem. Arlington, VA.
- Arya R., Mallik M., Lakhotia SC., 2007. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci.*;32:595–610.
- Baumgard, L. H. and R. P. Rhoads Jr. 2013. Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*1:311–337.
- Bernabucci U., Basiricó L., Morera P., Lacetera N., Ronchi B., and Nardone A 2009. Heat shock modulates adipokines expression in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology* 42 139-147
- Bertran J, Werner A, Chillaron J, Nunes V, Biber J, Testar X, Zorzano A, Estivill X, Murer H, Palacin M. 1993. Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 268: 14842–14849.
- Bischof P, Campana A. 1996. A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Hum Reprod Update* 2:262-270.
- Blakemore, S.J., Rickhuss, P.K., Watt, P.W., Rennie, M.J., and Hundal, H.S. 1996. Effects of limb immobilization on cytochrome c oxidase activity and GLUT4 and GLUT5 protein expression in human skeletal muscle. *Clin. Sci. (Lond.)* 91, 591–599.

- Blank M., M. Mandel, Y. Keisari, D. Meruelo, G. Lavie, 2003. Enhanced ubiquitinylation of heat shock protein 90 as a potential mechanism for mitotic cell death in cancer cells induced with hypericin, *Cancer Res.* 63 8241–8247.
- Bowler, K., C.J. Duncan, R.T. Gladwell and T.F. Davison. 1973. Cellular heat injury. *Comp. Biochem. Physiol.* 45:953-963.
- Broer, S. 2008. Amino Acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol. Rev.* 88, 249–286.
- Bruey J.M., C. Ducasse, P. Bonniaud. et al., 2000. “Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c,” *Nature Cell Biology*, vol. 2, no. 9, pp. 645-652.
- Buchner J. 1996. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.*;10:10–9 C. G. Concannon, A. M. Gorman, and A. Samali,. 2003. “On the role of Hsp27 in regulating apoptosis,” *Apoptosis*, vol. 8, no. 1, pp. 61–70.
- Concannon C.G., S. Orrenius, and A. Samali,. 2001. “Hsp27 inhibits cytochrome c mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c,” *Gene Expression*, vol. 9, no. 4-5, pp. 195–201, Cakir B, Yonem A, Guler S, Odabasi E, Demirbas B, Gursoy G, Aral Y,. 1999. Relation of leptin and tumor necrosis factor alpha to body weight changes in patients with pulmonary tuberculosis. *Horm Res* 52:279-283.
- Calderwood, S.K. and G.W. Hahn. 1983. Thermal sensitivity and resistance of insulin-receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta* 756:1-8.

- Cammisotto P.G. and M. Bendayan. 2007. Review: Leptin secretion by white adipose tissue and gastric mucosa. *Histol. Histopathol.* 22:199-210.
- Carroll J.A., and G.L. Allee. 2009. Hormonal control of feed intake in swine In: Voluntary feed intake in pigs. D. Torrallardon and E Roura (Eds.). p. 155-187.
- Champagne M.J., P. Dumas, S. N. Orlov, M. R. Bennett, P. Hamet, and J. Tremblay,. 1999. "Protection against necrosis but not apoptosis by heat-stress proteins in vascular smooth muscle cells: evidence for distinct modes of cell death," *Hypertension*, vol. 33, no. 3, pp. 906–913.
- Charron, M. J. and B. B. Kahn. 1990. Divergent molecular mechanisms for insulin resistant glucose transport in muscle and adipose cells *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 265:7994-8000.
- Close, W. H., 1991: Meeting the nutritional requirements of pigs in hot conditions. *Recent advances in animal nutrition in Australia 1991*: 144-155.
- Coffey, V.G., and Hawley, J.A. 2007. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med.* 37, 737–763.
- Collier, R. J., J. L. Collier, R. P. Rhoads, and L. H. Baumgard. 2008. Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. *J. Dairy Sci.* 91:445–454.
- Collin, A., J. van Milgen, and J. Le Dividich. 2001b . Modelling the effect of high, constant temperature on food intake in young growing pigs. *Anim. Sci.* 72:519–527.

- Collin, A., J. van Milgen, S. Dubois, and J. Noblet. 2001a . Effect of high Temperature on feeding behaviour and heat production in group-housed piglets. *Br. J. Nutr.* 86:63–70.
- Collin, J. van Milgen, S. Dubois and J. Noblet, 2001,. Effect of high temperature and feeding level on energy utilization in piglets, , 79:1849-1857. *J ANIM SCI*.
- Cui J., Arbab-Zadeh A., Prasad A., Durand S., Levine B.D., and Crandall C.G. 2005. Effects of Heat Stress on thermoregulatory Responses in Congestive Heart Failure Patients. *Circulation* 112:2286-2292.
- Carbone D.L, J.A. Doorn, Z. Kiebler, B.R. Ickes, D.R. Petersen,. 2005. Modification of heat shock protein 90 by 4-hydroxynonenal in a rat model of chronic alcoholic liver disease, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315 8–15.
- Davoli, R.; Fontanesi, L.; Cagnazzo, M.;Scotti, M.; Buttazzoni, L.; Yerle, M.; Russo, V., 2003: Identification of SNPs,mapping and analysis of allele frequencies in two candidate genes for meatproduction traits: the porcine myosin heavy chain 2B (MYH4) and the skeletal muscle myosin regulatory light chain 2 (HUMMLC2B). *Animal Genetics* 34, 221– 225.
- De Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. 1995. Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* 270:15958-15961.
- DeFronzo, R.A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., and Felber, J.P. 1981. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30, 1000–1007.

- Dezwaan, D.C. and Freeman, B.C. 2008 HSP90: the Rosetta stone for cellular protein dynamics? *Cell Cycle* 7, 1006–1012.
- Didyk, R.B., Anton, E.E., Robinson, K.A., Menick, D.R., and Buse, M.G. 1994. Effect of immobilization on glucose transporter expression in rat hindlimb muscles. *Metabolism* 43, 1389–1394.
- Dokladny, K., D. Ye, J. C. Kennedy, P. L. Moseley, and T. Y. Ma. 2008. Cellular and molecular mechanisms of heat stress-induced up-regulation of occludin protein expression: regulatory role of heat shock factor-1. *Am. J. Pathol.* 172: 659-670. *Domestic Animal Endocrinology* 21, 297–317.
- Donlin L.T., C. Andresen, S. Just, E. Rudensky, C.T. Pappas, M. Kruger, E.Y. Jacobs, A. Unger, A. Zieseniss, M.W. Dobenecker, T. Voelkel, B.T. Chait, C.C. Gregorio, W. Rottbauer, A. Tarakhovsky, W.A. Linke,. 2012. Smyd2 controls cytoplasmic lysine methylation of Hsp90 and myofilament organization, *Genes Dev.* 26 114–119.
- Dorion, S. and J. Landry. 2002. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stress Chaperones.* 7:200-206.
- Dridi S, Temim S, Derouet M, Tesseraud S & 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* 309A381–388.
- Egan B., Juleen R. Zierath. 2013 *Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation Cell Metabolism* Elsevier Inc.

- Feige U, Polla BS. 1994. Hsp70—a multi-gene, multi-structure, multifunction family with potential clinical applications. *Experientia*.;50:979–86.
- Fernandez J, Lopez AB, Wang C, Mishra R, Zhou L, et al. 2003. Transcriptional control of the arginine/lysine transporter cat-1 by physiological stress. *J. Biol. Chem.* 278:50000–9.
- Fernandez JM, Yaman I, Merrick WC, Koromilas AE, Wek RC, et al. 2002. Regulation of internal ribosome entry site-mediated translation by eukaryotic initiation factor-2-alpha phosphorylation and translation of a small upstream open reading frame. *J. Biol. Chem.* 277:2050–58.
- Ferraris, R. P. & Diamond, J. M. 1993. Crypt-villus site of substrate-dependent regulation of mouse intestinal glucose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90, 586&5872.
- Ferraris, R. P. 1994. Regulation of intestinal nutrient transport. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd edn, pp. 1821-1844 [L. R. Johnson, editor]. New York: Raven Press
- Frier, B. C. and M. Locke. 2007. Heat stress inhibits skeletal muscle hypertrophy. *Cell Stress. Chaperones.* 12:132-141.
- Fujita J. 1999. Cold shock response in mammalian cells. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 243–255.
- Galigniana, P.C. Echeverria, A.G. Erlejman, G. Piwien-Pilipuk,. 2010. Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore, *Nucleus* 1 299–308.

- García-Villalobos H, Morales-Trejo A, Araiza-Piña BA, Htoo J.K., and Cervantes Ramírez M. 2012. Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 66:257-270.
- Garvey, W.T., Maianu, L., Huecksteadt, T.P., Birnbaum, M.J., Molina, J.M., and Ciaraldi, T.P. 1991. Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J. Clin. Invest.* 87, 1072–1081.
- Geraert, P. A., J. C. F. Padilha, and S. Guillaumin. 1996. Metabolic and endocrine changes induced by heat exposure in broiler chickens. Biological and endocrine parameters. *Br. J. Nutr.* 75:195–204.
- Gething M.J, Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45.
- Gettys TW, Harkness PJ, Watson PM. 1996. The beta 3-adrenergic receptor Inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 137:4054-4057.
- Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC. 2009. Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high fat diet. *Diabetes*;58:567–78.
- Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M. 1995. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med* 1:953-956.

- Han, S.I., K.S. Ha, K.I. Kang, H.D. Kim and H.S. Kang. 2000. Heat shockinduced actin polymerizatio, SAPK/JNK activation and heat-shock protein expresssion are mediated by genistein-sensitive tyrosine kinase(s) in K562 cells. *Cell Biol. Int.* 24:447-457.
- Hatzoglou, M.; Fernandez, J.; Yaman, I.; Closs, E.,. 2004. Regulation of cationic amino acid transport: The story of the CAT-1 transporter. *Annual Review of Nutrition* 24, 377-399.
- Hood, D.A. 2001. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 90, 1137–1157.
- Horowitz M. 2002. From molecular and cellular to integrative heat defense during exposure to chronic heat. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology* 131 475–483.
- Horowitz, M., Kaspler, P., Marmari, Y., Oron, Y.,. 1996. Evidence for contribution of effector organ cellular responses to the biphasic dynamics of heat acclimation.*J. Appl. Physiol.* 80, 77–85.
- Horowitz, M., Peiser, M.J., Muhlrاد, A.,. 1986. Alterations in cardiac myosin distribution as an adaptation to chronic environmental heat stress. *J. Mol. Cell Cardiol.* 18, 511–515.
- Horowitz, M.; Eli-Berchoer, L.; Wapinski, I.; Friedman, N.; Kodesh, E.,. 2004: Stress-related genomic responses during the course of heat acclimation and its association with ischemic-reperfusion cross-tolerance. *Journal of Applied Physiology* 97, 1496–1507.
- Huang, S., Lifshitz, L.M., Jones, C., Bellve, K.D., Standley, C., Fonseca, S., Corvera, S., Fogarty, K., and Czech, M.P. 2007. Insulin stimulates

membrane fusion and GLUT4 accumulation in clathrin coats on adipocyte plasma membranes. *Mol. Cell. Biol.*, in press.

- Huynh, T. T. T. et al. 2004. Thermal behavioral adaptation of growing pigs as affected by temperature and humidity. Accepted for publication in *Applied. Anim. Behav.*
- Huynh, T. T. T.; Aarnink, A. J. A.; Verste-gen, M. W. A.; Gerrits, W. J. J.; Heetkamp, M. J. W.; Kemps, B.; Canh, T. T.,. 2005: Effects of increasing temperatures on physiological changes in pigs at different relative humidities. *Journal of Animal Science* 83, 1385–1396.
- Hwang, E.-S., Hirayama, B. A. & Wright, E. M. 1991. Distribution of the SGLT1 Na⁺/glucose cotransporter and mRNA along the crypt-villus axis of rabbit small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 181, 1208-1217.
- Ingram: D.L. 1965. *Nature*, Lond. 207: 415.
- Jaattel M. a, D. Wissing, K. Kokholm, T. Kallunki, and M. Ege-blad, 1998. “Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases,” *EMBO Journal*, vol. 17, no. 21, pp. 6124–6134.
- Janeckova R. 2001. The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res* 50:443-459.
- Johnson HD. 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.

- Kabakov A.E. and V. L. Gabai, 1995. "Heat-shock-induced accumulation of 70-kDa stress protein (HSP70) can protect ATP-depleted tumor cells from necrosis," *Experimental Cell Research*, vol. 217, no. 1, pp. 15–21.
- Kiang J.G. and G.C. Tsokos, 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* 80:183-201.
- Kouba, M., D. Hermier, and J. Le Dividich. 2001. Influence of a high ambient temperature on lipid metabolism in the growing pig. *J. Anim. Sci.* 79:81–87.
- Kovacs, J. J., Murphy, P. J. M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J-T., Nicchitta, C. V., Yoshida, M., Toft, D. O., Pratt, W. B., and Yao, T. P. 2005. *Mol. Cell* 18, 601–607.
- Kultz "Annu. Rev. Physiol. 2005. 67:225–57.
- Lanneau David 1,2, Guillaume Wettstein^{1,2}, Philippe Bonniaud^{1,2,3}, and Carmen Garrido^{1,2}, Heat Shock Proteins: Cell Protection through Protein Triage Mini-Review *The Scientific World JOURNAL* (2010) 10, 1543–1552.
- Larsson H, Ahren B. 1996. Short-term dexamethasone treatment increases plasma leptin independently of changes in insulin sensitivity in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4428-4432.
- Le Dividich, J., J. Noblet, P. Herpin, J. van Milgen, N. Quiniou. 1998. Thermoregulation. In: J. Wiseman, M. A. Vailez, and J. P. Chadwick (ed.) *Progress in Pig Science*. pp 229–263. Nottingham University Press, Nottingham, U.K.
- Lei, L. Hepeng, L. Xianlei, J. Hongchao, L. Hai, A. Sheikahmadi, W. Yufeng and S. Zhigang,. 2013. Effects of acute heat stress on gene

expression of brain–gut neuropeptides in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) *ANIM SCI*, 91:5194–5201.

- Liao, S.F.; Vanzant, E.S.; Harmon, D.L.; McLeod, K.R.; Boling, J.A.; Matthews, J.C.,. 2009: Ruminal and abomasal starch hydrolysate infusions selectively decrease the expression of cationic amino acid transporter mRNA by small intestinal epithelia of forage-fed beef steers. *Journal of Dairy Science* 92, 1124–1135.
- Linquist S. 1986. The heat–shock response. *Annual Review of Biochemistry* 55 1151–1191.
- Liu, F., J. Yin, M. Du, P. Yan, J. Xu, X. Zhu, and J. Yu. 2009. Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with downregulation of epithelial growth factor signaling. *J. Anim Sci.* 87:1941–1949.
- Liu, M.L., Olson, A.L., Edgington, N.P., Moye-Rowley, W.S., and Pessin, J.E. 1994. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding site is essential for C2C12 myotube specific expression of the rat GLUT4/ muscle-adipose facilitative glucose transporter gene. *J. Biol. Chem.* 269, 28514–28521.
- Majumder, M.; Yaman, I.; Gaccioli, F.; Zeenko, V.V.; Wang, C.; Caprara, M.G.; Venema, R.C.; Komar, A.A.; Snider, M.D.; Hatzoglou, M., 2009: The hnRNA binding proteins hnRNP L and PTB are required for efficient translation of the Cat-1 arginine/lysine transporter mRNA during amino acid starvation. *Molecular and Cellular Biology* 29, 2899–2912.
- Marai, I.F.M., Habeeb, A.A., Daader, A.H., Yousef, H.M., 1995. Effects of Egyptian subtropical summer conditions and the heat stress alleviation

technique of water spray and a diaphoretic on the growth and physiological functions of Friesian calves. *Journal of Arid Environments* 30, 219–225.

- Margetic, S.; Gazzola, C.; Pegg, G. G.; Hill, R. A., 2002: Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International, Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 26, 1407-1433.
- Martinez-Ruiz A., L. Villanueva, C. Gonzalez de Orduna, D. Lopez-Ferrer, M.A. Higuera, C. Tarin, I. Rodriguez-Crespo, J. Vazquez, S. Lamas,. 2005. S- nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 8525–8530.
- McCormick, W. and S.H. Penman. 1969. Regulation of protein synthesis in HeLa cells: Translation at elevated temperatures. *J. Mol. Biol.* 39:315-333.
- Méndez, V.; Avelar, E.; Morales, A.; Cervantes, M.; Araiza, A.; González, D., 2011: A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genetics and Molecular Research* 10, 3251-3255.
- Mizzen LA, Welch WJ. 1988. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J Cell Biol.*;106:1105–16.
- Mollapour M., S. Tsutsumi, A.C. Donnelly, K. Beebe, M.J. Tokita, M.J. Lee, S. Lee, G.Morra, D. Bourbouli, B.T. Scroggins, G. Colombo, B.S. Blagg, B. Panaretou, W.G.Stetler-Stevenson, J.B. Trepel, P.W. Piper, C. Prodromou, L.H. Pearl, L. Neckers,. 2010. Swe1Wee1-dependent tyrosine phosphorylation of Hsp90 regulates distinct facets of chaperone function, *Mol. Cell* 37. 333–343.

- Mondovi, B., A. Finazzi-Agro, G. Rotilio, R. Strom, G. Moricca and A. Rossi-Fanelli. 1969. The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. *Eur. J. Cancer* 5:137-146.
- Morales A., Grageola F., García H., Arce N., Araiza B., Yáñez J., Cervantes M. 2014. Performance, serum amino acid concentrations and expression of selected genes in pair-fed growing pigs exposed to high ambient temperatures. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98:928-935.
- Morera, P.; Basirico, L.; Hosoda, K.; Bernabucci, U., 2012: Chronic heat stress up regulates leptin and adiponectin secretion and expression and improves leptin, adiponectin and insulin sensitivity in mice. *Journal of Molecular Endocrinology* 48, 129–138.
- Morimoto RI. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12:3788–96.
- Mount, L.E. 1979. *Adaptation to thermal environment: Man and his productive animals*. Edward Arnold Limited, Thomson Litho Ltd, East Kilbride, Scotland.
- Muchowski, P.J. and Wacker, J.L. 2005. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev.* 6, 11–22.
- Nabuurs, M.J.A., van Essen, G.J., Nabuurs, P., Niewold, T.A., Vander, M.J., 2001. Thirty minutes transport causes small intestinal acidosis in pigs. *Research in Veterinary Science* 70, 123–127.

- Nienaber, J. A., and G. L. Hahn. 1982. Heat production and feed intake of ad Libitum fed growing swine as affected by temperature. ASAE paper no. 82-4065. Am. Soc. Agric. Eng., St. Joseph, MI.
- Nienaber, J. A., G. L. Hahn, and J. T. Yen. 1987. Thermal environment effects on growing-finishing swine. Part 1—Growth, feed intake and heat production. Trans. ASAE 30:1772–1775.
- Nienaber, J. A., G. L. Hahn, T. P. McDonald, and R. L. Korthals. 1996. Feeding patterns and swine performance in hot environments. Trans. Am. Soc. Agric. Eng. 39:195–202.
- Noblet, J., J. Le Dividich. 1982. Effect of environmental temperature and feeding level on energy balance traits of early weaned piglets. Livest. Prod. Sci. 9:619–632.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). 2001: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. In: M.L.I. Ochoa (ed.). Diario Oficial de la Federación, Norma Oficial Mexicana, Mexico (DF), Mexico, pp. 1–58.
- Olefsky, J.M., Garvey, W.T., Henry, R.R., Brillon, D., Matthaei, S., and Freidenberg, G.R. 1988. Cellular mechanisms of insulin resistance in non-insulin-dependent (type II) diabetes. Am. J. Med. 85, 86–105.
- Oshel, K.M., Knight, J.B., Cao, K.T., Thai, M.V., and Olson, A.L. 2000. Identification of a 30-base pair regulatory element and novel DNA binding protein that regulates the human GLUT4 promoter in transgenic mice. J. Biol. Chem. 275, 23666–23673.

- Palacin M, Fernandez E, Chillaron J, Zorzano A. 2001. The amino acid transport system b⁰+,₊ and cystinuria. *Mol Membr Biol* 18: 21–26.
- Palacin M. 1994. A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic And zwitterionic amino acid transport: a tale of two proteins in search of a transport function. *J Exp Biol* 196: 123–137.
- Parsell, D.A., S. Lindquist. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann. Rev. Genet.* 27:437-496.
- Patience, J.F., J.F. Umboh, R.K. Chaplin and C.M. Nyachoti. 2005. Nutritional and physiological responses of growing pigs exposed to a diurnal pattern of heat stress. *Livestock Prod. Sci.* 96: 205-214.
- Pearce, S. C., M. V. Sanz-Fernandez, J. H. Hollis, L. H. Baumgard, and N. K. Gabler. 2014. Short-term exposure to heat stress attenuates appetite and intestinal integrity in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 92:5444–5454
- Pearce, S. C., V. Mani, T. E. Weber, R. P. Rhoads, J. F. Patience, L. H. Baumgard, and N. K. Gabler. 2013c. Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *J. Anim. Sci.* 91:5183–5193.
- Pearce, V. Mani, T. E. Weber, R. P. Rhoads, J. F. Patience, L. H. Baumgard and N. K. 2013. Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs, *J ANIM SCI*
- Pearl L.H., C. Prodromou,. 2006. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery, *Annu. Rev. Biochem.* 75 271–294.

- Perkins and T. D. Gilmore. 2006. "Good cop, bad cop: the different faces of NF κ B," *Cell Death and Differentiation*, vol. 13, no. 5, pp. 759–772,
- Pratt W.B., D.O. Toft. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones, *Endocr. Rev.* 18 306–360.
- Quiniou, N., J. Noblet, J. van Milgen, and S. Dubois. 2001. Modelling heat Production and energy balance in group-housed growing pigs exposed to cold or hot ambient temperatures. *Br. J. Nutr.* 85:97–106
- Quiniou, N., S. Dubois, and J. Noblet. 2000. Voluntary feed intake and feeding behaviour of group-housed growing pigs are affected by ambient temperature and body weight. *Livest. Prod. Sci.* 63:245–253.
- Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG & Broedl UC 2008 Adipokines and insulin resistance. *Molecular Medicine* 14 741–751.
- Renaudeau, D., C. Anais, L. Tel, and J. L. Gourdine. 2009. Effect of temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using a nonlinear function. *J. Anim. Sci.* 8:3715–3724.
- Rentsch J, Chiesi M. 1996. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett* 379:55-59
- Rhoads Jr. 2013. Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1:311–337.
- Rhoads, M. J. Van Baale, R. J. Collier, S. R. Sanders, W. J. Weber, B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J. Dairy Sci.* 92:1986-1997

- Rhoads, M. L., R. P. Rhoads, M. J. VanBaale, R. J. Collier, S. R. Sanders, W. J. Weber, B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J. Dairy Sci.* 92:1986–1997.
- Rothfusz Lans. 1990, The Heat Index "Equation" (or, More Than You Ever Wanted to Know About Heat Index. Scientific Services Division NWS Southern Region Headquarters. Technical Attachment. Fort Worth, TX.
- Roti Roti JL. 2008. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia*;24:3–15
- Rowell, L.B. 1983. Cardiovascular adjustments to thermal stress. In: Shepard, J.T. & Abboud, F.M. (eds.) *Handbook of physiology* (vol. III), pp. 967-1023. Baltimore, MD: Waverly Press.
- Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. 1995. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-529
- Salfen, BE., Carroll, J.A. and Keisler, D.H, 2003. Endocrine responses to short-term feed deprivation in weanling pigs. *Journal of Endocrinology*. 178: 541-551.
- Samali and T. G. Cotter. 1996. "Heat shock proteins increase resistance to apoptosis," *Experimental Cell Research*, vol. 223, no. 1, pp. 163–170..
- Sambrook, J.; Russell, D. W. 2001: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Santalucia, T., Moreno, H., Palacin, M., Yacoub, M.H., Brand, N.J., Zorzano, A. 2001. A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. *J. Mol. Biol.* 314, 195–204
- Scheufler, C., A. Brinker, G. Bourenkov, S. Pegoraro, L. Moroder, H. Bartunik, F.U. Hartl, and I. Moarefi. 2000. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell.* 101:199–210.
- Scrimgeour M. J., Gresham, L. R., Giles P. C., Thomson P. C. Wynn R E. 2008. Ghrelin secretion is more closely aligned to energy balance than with Feeding behaviour in the grower pig, *Journal of Endocrinology.* 198, 135–145
- Shirazi-Beechey, S. P., Gribble, S. M., Wood, I. S., Tarpey, P. S., Beechey, R. B., Dyer, J., Scott, D. & Barker, P. J. 1994. Dietary regulation of the intestinal sodium dependent glucose cotransporter (SGLT). *Biochemical Society Transactions* 22, 655-658.
- Shirazi-Beechey, S.P. 1995. Molecular biology of intestinal glucose transport. *Nutr. Res. Rev.* 8:27-4.
- Sinha, M.K., Raineri-Maldonado, C., Buchanan, C., Pories, W.J., Carter-Su, C., Pilch, P.F., and Caro, J.F. 1991. Adipose tissue glucose transporters in NIDDM. Decreased levels of muscle/fat isoform. *Diabetes* 40, 472–477
- Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, Attoub S, Lehy T, Henin D, Mignon M, Lewin MJ., 2000. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 7:178-183

- Song, Z., L. Liu, A. Sheikahmadi, H. Jiao, H. Lin. 2012. Effect of heat exposure on gene expression of feed intake regulatory peptides in laying hens. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:484869
- Tucci S. 2008. Grelina en regulación del apetito y papel en obesidad y trastornos alimentarios: abordajes terapéuticos *Rev Venez Endocrinol Metab* 01/2008; 6:15-23.
- Sonna, L. A.; Fujita, J.; Gaffin, S. L.; Lilly, C. M., 2002: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *Journal of Applied Physiology* 92, 1725–1742.
- Steadman, R.G. 1979. "The assessment of sultriness. Part I: A temperature Humidity index based on human physiology and clothing science," *J. Appl. Meteor.*, 18, 861 873.
- Storey. 2004. Biochemical adaptation. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. First Edition.
- Streffer, C. 1988. Aspects of Metabolic change after hyperthermia. *Recent Results in Cancer Res.* 107:7-16.
- Tate SS., Yan N., Udenfriend S., 1992. Expression cloning of a N⁺-independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc Natl Acad. Sci USA* 89: 1–5.
- Torlinska, T., R. Banach, J. Paluszak, and A. Gryczka-Dziadecka. 1987. Hyperthermia effect on lipolytic processes in rat blood and adipose tissue. *Acta. Physiol. Pol.* 38:361–366

- Torras-Llort, M.; Torrents, D.; Soriano-García, J. F.; Gelpí, J. L.; Estévez, R.; Ferrer, R.; Palacín, M.; Moretó, M., 2001: Sequential amino acid exchange across $b^{0,+}$ -like system in chicken brush border jejunum. *Journal of Membrane Biology* 180, 213–222.
- Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV, Hardie LJ. 1996. Rapid inhibition of ob gene expression and circulating leptin levels in lean mice by the beta 3-adrenoceptor agonists BRL 35135A and ZD2079. *Biochem Biophys Res Commun* 228:605-610
- Trayhurn P, James WP. 1978. Thermoregulation and on-shivering thermogenesis In the genetically obese (ob/ob) mouse. *Pflugers Archives* 373: 189–193
- Tsunoda Y, Yao H, Park J, Owyang C. 2003. Cholecystokinin synthesizes and secretes leptin in isolated canine gastric chief cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310:681-684
- Verstegen, M. W. A., A. M. Henken, and W. vanderHel. 1987. Influence of some environmental, animal and feeding factors on energy metabolism in growing pigs. Pages 70–86 in *Energy Metabolism in Farm Animals*. V. M. W. A. Verstegen, and A.M.Henken, ed. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands
- Volloch V, Rits S.1999. A natural extracellular factor that induces Hsp72, inhibits apoptosis, and restores stress resistance in aged human cells. *Exp Cell Res.*;253:483–92.
- Wells RG, Hediger MA. 1992. Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5596–5600.

- Weston R. J. Davis, .2007. "The JNK signal transduction pathway," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 19, no. 2, pp. 142–149.
- Wheelock JB, Rhoads RP, VanBaale MJ, Sanders SR, Baumgard LH. 2010. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.*;93:644–55.
- Wilson T.E., Crandall C.G. 2011. Effect of Thermal Stress on Cardiac Function. *Exerc Sport Sci. Rev.* 39(1): 12–17.
- Xin, Hongwei and Harmon, Jay D., 1998. "Livestock Industry Facilities and Environment: Heat Stress Indices for Livestock" Agriculture and Environment Extension Publications. Book 163.
- Xu, W. M. Mollapour, C. Prodromou, S. Wang, B.T. Scroggins, Z. Palchick, K. Beebe, Siderius M., M.J. Lee, A. Couvillon, J.B. Trepel, Y. Miyata, R. Matts, L. Neckers. 2012. Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90 P50(CDC37)-AHA1 chaperone machine, *Mol. Cell* 47 434–443.
- Yamaguchi T, Suzuki T, Arai H, Tanabe S, Atomi Y. 2010. Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298: C140–C148.
- Yatvin, M.B., T.C. Cree, C.E. Elso, J.J. Gipp, I.M. Tegmo and J.W. Vorpahl. 1982. Probing the relationship of membrane "fluidity" to heat killing of cells. *Radiat. Res.* 89:644-646
- Yousef, M. 1985. *Stress Physiology in Livestock*. 1st ed. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

- Yu, J.; Yin, P.; Liu, F.; Cheng, G.; Guo, K.; Lu, A.; Zhu, X.; Luan, W.; Xu, J., 2010. Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and Gene expression study. *Comparative Biochemistry and Physiology* 156, 119–128.
- Zhou T, Chiang CM. 2002. Sp1 and AP2 regulate but do not constitute TATA-less human TAF(II)55 core promoter activity. *Nucleic Acids Res.* 30:4145–57.
- Zou J., Y. Guo, T. Guettouche, D.F. Smith, R. Voellmy. 1998. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1, *Cell* 94 471–480.
- Zumbach B, Misztal I, Tsuruta S, Sanchez JP, Azain M, Herring W, Holl J, Long T, Culbertson M. 2008. Genetic components of heat stress in finishing pigs: parameter estimation. *J Anim Sci*;86:2076–8.