



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA BAJA SOBRE EL  
RITMO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE  
*Procambarus clarkii* (ACOCIL)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**IRVING EDUARDO PALMA ANZURES**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MARIA LUISA FANJUL PEÑA  
2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1.-Datos del alumno

Palma  
Anzures  
Irving Eduardo  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
304121393

### 2.-Datos del tutor

Doctora  
María Luisa  
Fanjul  
Peña

### 3.-Datos del sinodal 1

Doctor  
Raúl Antonio  
Aguilar  
Roblero

### 4.- Datos del sinodal 2

Doctora  
Guillermina  
Alcaraz  
Zubeldia

### 5.- Datos del sinodal 3

M. en C.  
Enrique  
Moreno  
Saenz

### 6.- Datos del sinodal 4

Doctora  
Ivette  
Caldelas  
Sánchez

## Índice

<b>1</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Introducción a los ritmos biológicos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Características fundamentales de los ritmos circadianos.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Persistencia del ritmo bajo condiciones constantes.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Sincronización.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Compensación a la temperatura.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.4</b>	<b>Curva de respuesta de fase.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>Mecanismo molecular del reloj circadiano de <i>Drosophila</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>El acocil como un modelo circadiano.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Descripción de la especie.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Características cronobiológicas.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Ritmo de actividad locomotora.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>19</b>
<b>5.1</b>	<b>Objetivo general.....</b>	<b>19</b>
<b>5.2</b>	<b>Objetivo particular.....</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>Materiales y método.....</b>	<b>20</b>
<b>6.1</b>	<b>Animales y aclimatación.....</b>	<b>20</b>
<b>6.2</b>	<b>Registro de actividad locomotora y procedimientos experimentales.....</b>	<b>20</b>
<b>6.3</b>	<b>Análisis de datos.....</b>	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>24</b>
<b>8</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>30</b>
<b>9</b>	<b>Conclusión.....</b>	<b>33</b>
<b>10</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>34</b>

# **1 Introducción**

## **1.1 Introducción a los ritmos biológicos**

Por definición, un ritmo es un cambio que se repite a intervalos temporales constantes con un patrón similar. Todos los organismos que habitan la tierra, poseen un orden rítmico interno que les permite regular sus funciones y adaptarse al ambiente. Por ejemplo, a lo largo de las 24 horas del día, las hojas cambian su orientación con respecto al sol, la temperatura corporal de los mamíferos y sus niveles de actividad conductual fluctúan. Estos cambios rítmicos de la vida representan sólo un pequeño segmento de la enorme red de ritmos biológicos (Koukkari y Sothorn, 2006).

Una característica notable de los ritmos observados en diferentes organismos como las algas, las moscas de la fruta y los humanos es que estos no son simples respuestas a los cambios durante el día, sino que surgen de un sistema temporal interno que puede ser sincronizado por fenómenos celestes o geofísicos y por otras señales externas presentes en el ambiente, imponiendo su periodo y generando una ritmicidad diaria, es decir, con un periodo de 24 horas. Este sistema de conservación de tiempo o reloj biológico permite que los organismos se preparen con anticipación para los cambios en el ambiente físico asociados con la noche y el día. Por lo tanto los organismos se adaptan tanto conductual, como fisiológicamente para satisfacer los desafíos diarios presentes en el ambiente (Takahashi y Turek, 2001). Un reloj biológico, puede actuar como una señal para iniciar procesos conductuales o fisiológicos en una fase apropiada del ciclo ambiental diario o estacional. En algunos organismos, la medición exacta del tiempo a través de un ciclo diario es importante para calcular el momento óptimo para llevar a cabo procesos

bioquímicos y fisiológicos que le permiten optimizar su metabolismo. Otra función del reloj biológico es que actúa como un estimador de la duración del día y la noche (Johnson et al, 2004).

Cuando una variable biológica muestra un ritmo o un comportamiento oscilante, a menudo se utilizan tres características para describirlo, estas características son el periodo, la amplitud y la fase. Cada una de estas puede ser expresada en unidades numéricas, esto provee medios para cuantificar el ritmo. El periodo representa el tiempo requerido para completar un ciclo. La frecuencia es el número de ciclos en unidades de tiempo y es el recíproco del periodo. La magnitud de la variable desde la línea base al pico máximo usado para describir el ritmo es llamada amplitud. La fase puede ser vista como cualquier estado instantáneo repetible de un ciclo (Koukkari y Sothorn, 2006).

Los ritmos se pueden clasificar de acuerdo a características como su frecuencia (o el inverso del periodo), fase, amplitud y capacidad de sincronización al ambiente (Aschoff, 1981). Los ritmos circadianos, circamareales, circalunares y circanuales en plantas, animales y otros organismos son distinguibles de otras oscilaciones biológicas por su relación temporal con ciclos ambientales de los cuales tienen sus nombres (Brady, 1979).

Muchos de los primeros trabajos en los ritmos biológicos se enfocaron en ciclos con un periodo de 24 horas. Estos ritmos diarios, al ser registrados en condiciones constantes de luz, oscuridad o temperatura, se conocen como ritmos circadianos, pues su periodo se encuentra en un rango de 19 a 28 horas. Los ciclos biológicos que tienen periodos menores a 19 horas se denominan ultradianos, mientras que los ciclos con periodos mayores a 28 horas son llamados infradianos. Existen subdivisiones propuestas para los ritmos

infradianos, como los que tienen periodos cercanos a una semana (circaseptanos), un mes (circatrigintanos), un año (circanuales). Otros ritmos incluyen mareales (12.4h) y lunares (29.53 días) (Koukkari y Sothorn, 2006).

## **1.2 Características fundamentales de los ritmos circadianos**

### **1.2.1 Persistencia de un ritmo circadiano bajo condiciones constantes**

La persistencia de un ritmo circadiano con un periodo de aproximadamente 24 horas es evidente bajo temperatura, luz o condiciones de oscuridad constante (Johnson et al, 2004). El campo de la investigación en ritmos circadianos recibió una unificación teórica cuando Pittendrigh introdujo el concepto de osciladores endógenos auto-sostenidos (Daan, 2009), pues virtualmente todos los ritmos que se observan en condiciones naturales continúan siendo expresados bajo condiciones constantes en el laboratorio, es decir, con la ausencia de cualquier clave o señal temporal externa oscilante. Sin embargo, bajo condiciones constantes, el periodo del ritmo muy pocas veces sigue siendo exactamente igual a 24 horas, en lugar de esto, se hace cercano a dicho periodo. Debido a que el periodo de estos ritmos es cercano pero no exactamente de 24 horas de duración, se le denomina circadiano, del latín *circa* y *diem* (*circa*=alrededor, *diem*=día). Cuando un ritmo circadiano se expresa en ausencia de cualquier señal diaria del ambiente externo, se dice que está en corrimiento libre u oscilación espontánea, es decir, el ritmo no está sincronizado por algún cambio cíclico en el ambiente. El hecho de que el periodo endógeno del reloj circadiano es raramente igual a 24 h, permite que los cambios ambientales puedan sincronizar de manera plástica el sistema del reloj interno regulando el ritmo (Johnson et al, 2004).

### **1.2.2 Sincronización**

Los ritmos circadianos pueden ser sincronizados por señales ambientales (“zeitgeber” o dador de tiempo) exactas de 24 horas, como los ciclos de luz-oscuridad, ciclos de temperatura u otros estímulos cíclicos. En la naturaleza oscilan múltiples factores ambientales a lo largo de ciclos diarios. Algunas de las variables más notables incluyen luz, temperatura, humedad, disponibilidad de alimento y algunas señales sociales. La sincronización tiene dos propósitos: el control de la fase y el ajuste de periodo (Takahashi y Turek, 2001), es decir, la modificación de la fase del reloj interno mediante señales de tiempo hasta que el día subjetivo corresponda a la fase fótica (fase de luz) del día externo (Johnson et al, 2004).

En un ritmo sincronizado, las fases de un ritmo endógeno son determinadas por el horario de los sincronizadores ambientales, esta sincronización es una característica esencial de los ritmos circadianos. Un cambio en el ciclo ambiental puede causar un cambio en el patrón cíclico de una variable biológica, de modo que la fase inicia más temprano o más tarde comparada con la fase del ritmo antes del cambio ambiental (Koukkari y Sothorn, 2006). Las consecuencias de la sincronización son que el periodo de ritmo biológico adquiere un periodo igual al del estímulo ambiental y con una relación de fase estable entre el sincronizador y el ritmo endógeno producido por el reloj biológico (Johnson et al, 2004).

### **1.2.3 Compensación a la temperatura**

La duración del periodo de un ritmo circadiano es independiente de la temperatura dentro de ciertos valores de la misma: es decir, es capaz de compensar los cambios de temperatura. En otras palabras el efecto de la temperatura en el periodo de los ritmos circadianos es



mínimo (Koukkari y Sothorn, 2006), pues el periodo de un ritmo circadiano en condiciones constantes (corrimiento libre u oscilación espontánea) es muy similar cuando se mide a diferentes temperaturas ambientales (Johnson et al, 2004).

La compensación a la temperatura es considerada a menudo sólo como un aspecto de un mecanismo de compensación general que mantiene la duración del periodo, a pesar de las diferencias en los factores que afectan el metabolismo, como la temperatura corporal o la nutrición (Johnson et al, 2004).

Desde una perspectiva bioquímica la compensación a la temperatura es inusual, puesto que la tasa de la mayoría de los procesos metabólicos se incrementa con el aumento de la temperatura; esto se debe a que hay una mayor cantidad de energía cinética, esto implica que la tasa de las reacciones químicas a menudo se duplique por cada 10° C que se aumente la temperatura. Para expresar el efecto de la temperatura en la tasa de una reacción, o en el caso de un ritmo, en el cambio del periodo o la frecuencia, los biólogos hacen referencia al coeficiente llamado  $Q_{10}$ . El coeficiente de temperatura  $Q_{10}$  expresa la tasa o la frecuencia a una temperatura dada dividida por la tasa o la frecuencia a una temperatura 10° C menos. Dentro del rango de las temperaturas ambientales a las cuales un organismo permanece fisiológicamente viable, el  $Q_{10}$  para la mayoría de las reacciones químicas es aproximadamente de 2 a 3, sin embargo, los ritmos circadianos usualmente tienen un  $Q_{10}$  dentro de los rangos de entre 0.8-1.2, lo que comprueba el poco o nulo efecto de la temperatura en un ritmo circadiano (Koukkari y Sothorn, 2006).

El problema de la compensación no está aún dilucidado pero recientemente se han establecido modelos matemáticos que proponen que todos los osciladores pueden

compensar la temperatura por el principio del balance antagonista. Este principio establece que la velocidad de reacción que hace decrecer el periodo circadiano podría ser balanceado por velocidades de reacción que incrementan el periodo (Bodenstein et al, 2011).

En el caso de los organismos invertebrados, específicamente en *Drosophila*, este modelo de compensación se basa en el asa transcripción–traducción que explica la oscilación molecular del reloj (ver apartado 1.3) y propone la existencia de una asociación entre el retraso necesario para generar una periodicidad de 24 horas, y la lenta fosforilación en el citoplasma de una proteína reloj llamada PER, que forma parte del asa de retroalimentación molecular, pues únicamente las formas fosforiladas de PER son capaces de entrar al núcleo inhibiendo la transcripción del gen que le da origen, es decir, el gen *per*, de esta forma el sistema circadiano puede mantener la periodicidad del ritmo. Hong y Tyson (1997) han sugerido que la dimerización de PER determina la compensación de temperatura en *Drosophila*, puesto que las moscas mutantes que carecen del dominio de dimerización PER (el cuál es fundamental para el buen funcionamiento del reloj) carecen también de la propiedad de compensar la temperatura.

#### **1.2.4 Curva de respuesta de fase**

A pesar de la independencia del periodo del ritmo ante los cambios de temperatura, el reloj circadiano no es insensible a los cambios en este parámetro ambiental, pues los pulsos de temperatura, al igual que otros estímulos ambientales aplicados a ciertas horas del día en diferentes momentos del ciclo, pueden cambiar la fase ( $\phi$ ) de los relojes circadianos. Este tipo de estímulos incluyen pulsos de luz, pulsos con fármacos, disponibilidad de alimento a ciertas horas y la actividad inducida (Johnson et al, 2004) y se utilizan para investigar tanto

el grado de sensibilidad del oscilador que genera el ritmo, como su capacidad de sincronización ante dichos estímulos. Esta manipulación experimental repetida a diferentes fases del ritmo permite generar lo que se conoce con el nombre de curva de respuesta de fase (CRF). Actualmente se tienen reportes sobre cambios de fase producidos por temperatura en algunas especies pertenecientes a diferentes taxa, estos incluyen cianobacterias, algas unicelulares, plantas, hongos, artrópodos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Rensing y Ruoff, 2002).

Debido a que los diversos organismos pueden presentar diferentes periodos de oscilación circadiana, es conveniente dividir cualquier periodo de corrimiento libre u oscilación espontánea en  $360^\circ$ , con el objeto de que todas las comparaciones sean basadas en la misma escala notacional de tiempo (en la sincronización a 24 horas a un ciclo de Luz-Oscuridad,  $360^\circ = 24$  horas), una notación alternativa es dividir el periodo de corrimiento libre en 24 horas circadianas y entonces expresar eventos en términos de tiempo circadiano o TC. Por convención el uso de una fase de referencia que podría normalmente coincidir con el inicio de la fase de oscuridad se le llama  $180^\circ$  o tiempo circadiano 12 (TC 12). La parte que cubre las fases  $0-180^\circ$  es también llamada día subjetivo, y la parte que cubre  $180^\circ-360^\circ$ , noche subjetiva (Daan, 1982)

Una curva de respuesta de fase es una relación gráfica de los cambios de fase de un ritmo circadiano en función de la hora circadiana en la cual se está dando un estímulo (Johnson et al, 2004), esta curva nos permite detectar los cambios en la longitud del periodo del ritmo circadiano (adelantos o atrasos) en diferentes fases del ciclo, es decir, mide la sensibilidad del sistema circadiano a los estímulos ambientales.

El efecto de la luz sobre la velocidad de oscilación de los ritmos circadianos ha sido muy estudiado, un pulso luminoso aplicado durante el día subjetivo podría tener pequeños efectos en la fase que se está estudiando, la luz aplicada en la noche temprana podría mover la fase hacia atrás con respecto al día anterior, retrasando el ritmo y la luz aplicada en la noche tardía podría mover la fase hacia adelante en el siguiente día, adelantándolo (Johnson et al, 2004). Sin embargo, debido a que se pueden generar pequeños y poco notables cambios de fase que ocurren cuando se aplica un estímulo lumínico durante el día subjetivo, la porción del día subjetivo es a menudo llamada “zona muerta” (Figura 1); algunas de estas características topológicas de las CRF de luz son cruciales en la determinación de la capacidad de los marcapasos u osciladores circadianos para sincronizar con el ciclo diario de luz-oscuridad (Johnson 1992).

Después del estímulo generalmente se producen ciclos transitorios antes de que el ritmo alcance una nueva fase estable. Los valores de cambio de fase usados en la construcción de una curva de respuesta de fase se deben calcular al terminar los ciclos transitorios cuando el ritmo ha alcanzado una fase estable; una vez que el ritmo ha alcanzado una fase estable se extrapola varios ciclos antes, y se compara con la hora en la cual esperaríamos la fase de referencia que se habría presentado en ausencia de la manipulación experimental, de esta forma, si se presenta un cambio de fase ( $\Delta\Phi$ ), es posible medir dicho cambio en unidades de tiempo (Johnson et al, 2004). Por ejemplo, si la fase esperada sin manipulación experimental se observaría a las 20 horas y la fase alterada por un pulso de luz durante la noche subjetiva temprana se presenta a las 23 horas, entonces esta fase se estaría observando tres horas más tarde con respecto a la que se esperaría sin manipulación experimental, por lo cual podríamos decir que se trata de un retraso de tres horas.

Las curvas de respuestas de fase obtenidas para estímulos de luz y temperatura han sido muy valiosas para la comprensión de los mecanismos mediante los cuales los marcapasos circadianos se sincronizan a los ciclos ambientales diarios de luz y temperatura (Pittendrigh, 1981). La sensibilidad de los marcapasos a estos estímulos se puede medir determinando el cambio de velocidad del ritmo (adelanto o atraso).

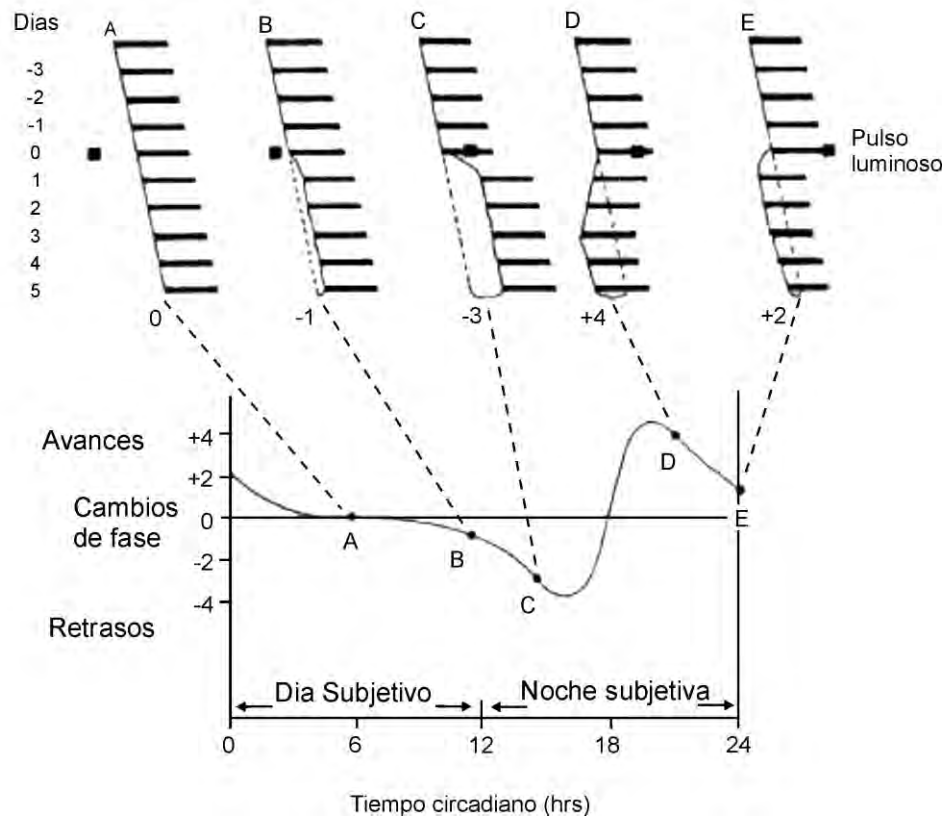


Fig 1 Curva de respuesta de fase esquemática para pulsos de luz representados por cuadrados negros, el tiempo de los desfases de la actividad mostrada en los actogramas ha sido graficada en relación al día subjetivo y a la noche subjetiva del animal experimental (modificado de Moore-Ede, 1982).

Cada estímulo causa un cambio de fase ( $\Delta\phi$ ) atrasando ( $-\Delta\phi$ ) o adelantando el ritmo ( $+\Delta\phi$ ); cuando la magnitud y el signo del cambio de fase causado por el estímulo se grafica como una función de la fase del ciclo en la cual se recibió el estímulo, se obtiene una curva de respuesta de fase (CRF). Winfree (1970) definió 2 tipos de CRF basándose en la pendiente de la curva de transición de fase (CTF) asociada a la CRF, que grafica la nueva fase (causada por el estímulo) como una función de la fase vieja (la que tenía el ritmo antes aplicar el estímulo). Si la CTF tiene una pendiente de 1, su CRF se denominará tipo 1. Si la CTF tiene una pendiente de 0, la CRF asociada se denominará tipo 0.

Aschoff ha puntualizado que hay por lo menos seis diferentes vías en las cuales una curva de respuesta de fase puede ser obtenida para un ciclo de luz-oscuridad (Moore-Ede, 1982) las cuales se muestran en la Figura 2:

- I. La primera estrategia es la forma clásica de obtener una CRF, en la cual los animales en corrimiento libre bajo condiciones de oscuridad constante reciben pulsos de luz a fases circadianas predeterminadas, entonces el cambio de fase es medido varios días después, cuando se ha alcanzado la fase estable y han pasado los ciclos transitorios .
- II. La segunda estrategia para obtener una CRF implica dejar al animal bajo condiciones constantes a partir de un ciclo previo de Luz-Oscuridad (LO), para recibir un pulso de luz durante los primeros días subjetivos de corrimiento libre, al igual que en la primera estrategia, los cambios de fase son medidos días después con el fin de evitar los ciclos transitorios.

- III. La tercera estrategia utiliza la disminución o el aumento drástico de la intensidad de luz. El animal se deja bajo condiciones constantes de oscuridad para manifestar su ritmo de oscilación libre, entonces el animal es colocado abruptamente en condiciones de luz constante durante la fase que interese al experimentador, nuevamente, el cambio de fase se medirá después de varios días hasta que el ritmo alcance una fase estable.
- IV. La cuarta estrategia utiliza el fenómeno conocido como coordinación relativa, si el pulso de luz es dado al mismo tiempo cada día con una intensidad que no sea suficientemente fuerte para sincronizar al animal, se manifestará una coordinación relativa cuando el ritmo muestra incrementos en el periodo a ciertas fases del día subjetivo y decrementos a otras. El cambio de fase en el ritmo relativo al tiempo de la señal luminosa puede ser usado para determinar la CRF. En este protocolo, el cambio de fase se mide un día después del pulso de luz, puesto que la constancia en los pulsos de luz, no permite la manifestación clara del ritmo de corrimiento libre aun cuando estos pulsos no sincronicen al ritmo.
- V. En la quinta estrategia es esencialmente una combinación de la segunda y tercera estrategia, es decir, el animal proveniente de un ciclo de LO es colocado en condiciones constantes de oscuridad, durante el primer día de corrimiento libre el animal es puesto de manera abrupta en condiciones de luz continua hasta el final del registro, el cambio abrupto de condiciones constantes deberá llevarse a cabo justo en la fase de interés del experimentados. La fase es medida después de varios días cuando el ritmo alcance una fase estable.

VI. En la estrategia seis, el animal es mantenido a través del experimento en un ciclo regular de LO, es decir, mientras el animal se encuentra sincronizado, entonces, los pulsos de luz son dados durante la fase de oscuridad, midiendo los cambios de fase horas después de haber dado el pulso, pues el animal se encuentra sincronizado y por lo tanto no es posible observar su ritmo de corrimiento libre. Con este método, sólo ciertas fases del ritmo circadiano pueden ser medidas.

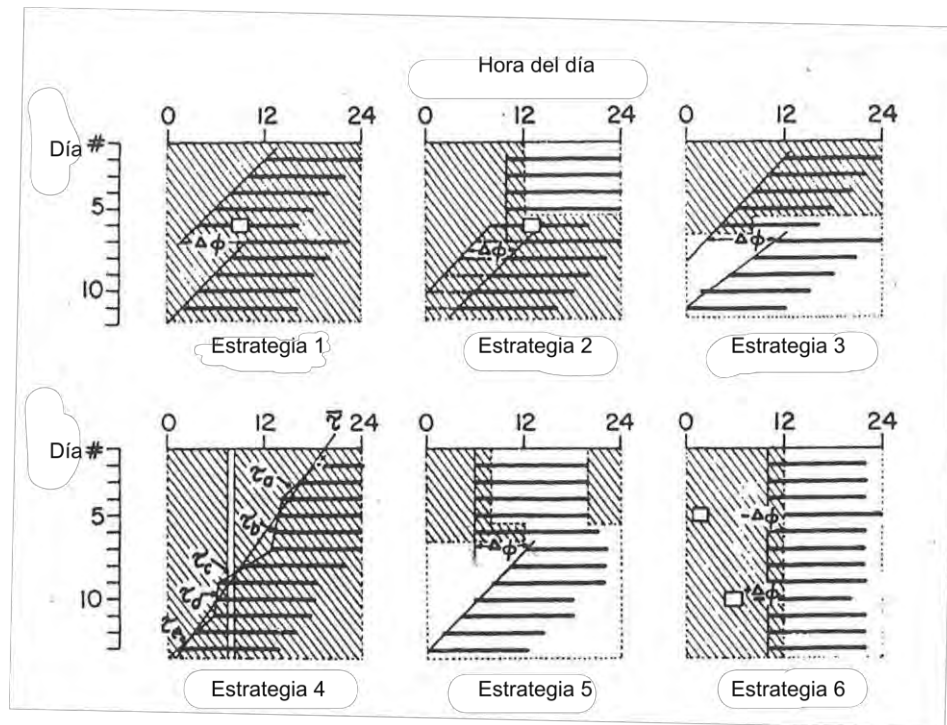


Fig 2 Representación esquemática de las seis estrategias propuestas por Aschoff para la obtención de una curva de respuesta de fase mediante estímulos lumínicos. Las porciones en blanco representan Luz, las porciones de líneas transversales representan oscuridad. Las estrategias se explican en el texto (modificado de Moore-Ede, 1982).



Recientemente se han identificado cambios moleculares en relación con los tipos de CRF en la mosca de la fruta por lo que describiré brevemente el funcionamiento molecular del reloj en esta especie.

### **1.3 Mecanismo molecular del reloj circadiano de *Drosophila***

El número y la localización de las neuronas reloj circadianas en el cerebro de la mosca de la fruta se ha determinado mediante tinciones citológicas para los productos de genes reloj, estos incluyen RNA mensajero y sus productos proteicos (Nitabach y Taghert, 2008). Éstas suman aproximadamente 150 neuronas en el cerebro de *Drosophila* y forman parte de una red neuronal que dirige el comportamiento circadiano en este organismo. Distintos subgrupos de estas 150 neuronas proporcionan diferentes aspectos en la conducta circadiana, particularmente dirigiendo la actividad locomotora a diferentes horas del día y bajo diferentes condiciones ambientales. Estas neuronas reloj pueden ser divididas en los siguientes grupos: ventrolaterales pequeñas y ventrolaterales grandes (sLNv y ILNv, respectivamente), neuronas dorsolaterales (LNd), tres grupos de neuronas dorsales (DN1, DN2 y DN3) y las neuronas laterales posteriores (LPN). Las LNv son especialmente importantes para la anticipación del comienzo del día y por tanto son llamadas células del día, mientras que LNd/DN1 son encargadas de la anticipación de la noche y estas son nombradas células de la noche (Allada y Chung, 2010).

El mecanismo molecular del reloj de *Drosophila* consiste en asas de retroalimentación positivas y negativas que determinan el periodo de la oscilación circadiana. Estas asas de retroalimentación consisten en proteínas de reloj que se autorregulan mediante la activación o la inhibición de la transcripción de sus genes; el heterodímero de las proteínas reloj

CLOCK-CYCLE (CLK-CYC) se une a secuencias de tipo E-box en promotores blanco que activan la expresión de genes. En la principal asa de retroalimentación, CLK-CYC activa la transcripción de los genes *period* y *timless* (*per* y *tim*) teniendo un pico durante la parte tardía del día. Las proteínas PERIOD y TIMLESS (PER y TIM) se acumulan y dimerizan en el citoplasma (noche temprana), estas se translocan al núcleo (media noche) y se unen al complejo CLK-CYC, inhibiendo su unión al DNA y consecuentemente su función de activación transcripcional (noche tardía; Fig 3). El asa transcripcional es un determinante para el periodo circadiano (Allada y Chung, 2010).

La regulación postraduccional de los componentes inhibitorios impone retrasos temporales entre la activación transcripcional CLK-CYC (día tardío) y la represión de PER-TIM (noche tardía). Los retrasos temporales entre la activación y la inhibición resultan en oscilaciones diarias de CLK-CYC. PER, TIM y CLK muestran ritmos de estados de fosforilación, con picos máximos durante la noche tardía/día temprano. PER es fosforilado por la CASEIN CINASA 1 $\epsilon$ /DOUBLETIME (DBT) y la CASEIN CINASA 2 (CK2). La fosforilación por DBT y CK2 aumenta la actividad represora de PER; TIM es fosforilada por la GLUCÓGENO SINTASA CINASA 3 $\beta$  /SHAGGY (GSK3 $\beta$ /SGG) y CK2. El complejo nuclear PER-DBT también se asocia con CLK y la fosforila, activando su degradación (Fig. 3) y de esta forma proporcionan un mecanismo para la inhibición del asa de retroalimentación. La pérdida de PER mitiga la represión de CLK-CYC, permitiendo un nuevo ciclo de la activación transcripcional (Allada y Chung, 2010).

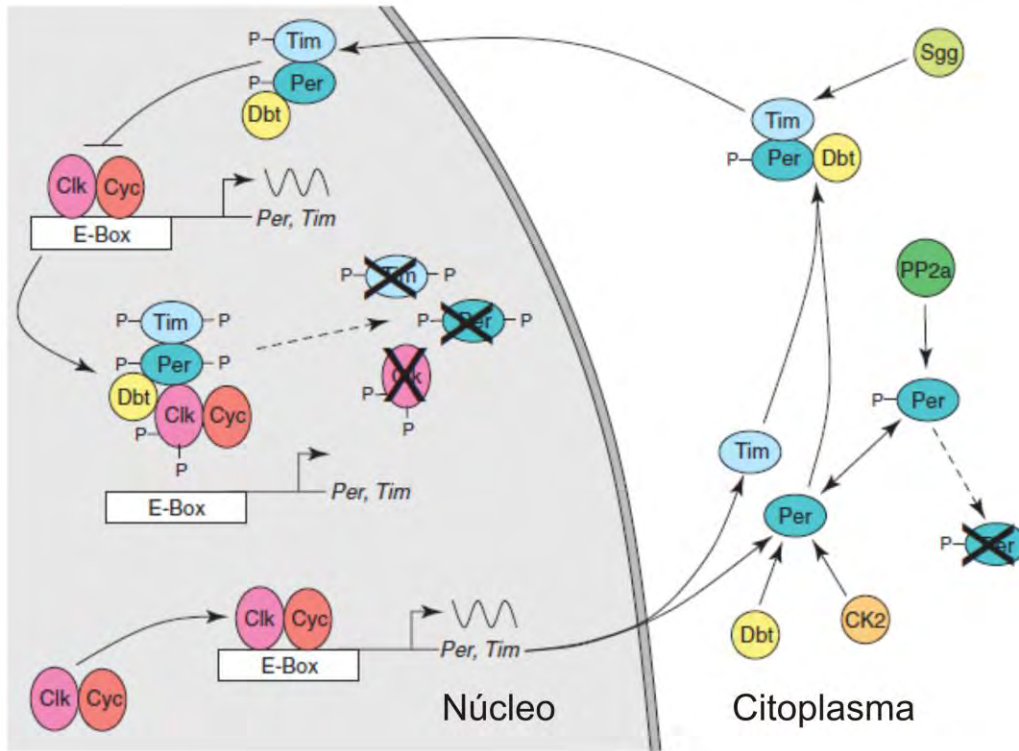


Fig 3. Modelo molecular del asa de retroalimentación canónica de *Drosophila melanogaster*, (modificada de Hardin, 2005), los detalles del mecanismo se presentan en el texto.

Estudios recientes han demostrado que el acocil *P. clarkii* presenta proteínas reloj que podrían funcionar de manera análoga a las proteínas presentes en el asa de retroalimentación de *Drosophila* (Escamilla-Chimal et al, 2010), los resultados del estudio muestran que se presenta inmunoreactividad de PER, TIM y CLK en el citoplasma y el núcleo de grupos específicos de neuronas localizadas en la retina, el lóbulo óptico y cerebro, sin embargo, la presencia de PER, TIM y CLK y sus cambios en la abundancia a dos diferentes horas del día, tanto en el tallo ocular como en el cerebro, no habían sido reportados antes. La distribución de los antígenos sugiere que estas tres proteínas interactúan unas con otras en los osciladores circadianos propuestos del acocil: la retina, el lóbulo óptico y el cerebro.

Los resultados indican que las células neurales localizadas en estas estructuras expresan tres proteínas reloj que son consideradas elementos pre y post transcripcionales las cuales forman el asa molecular del reloj. La presencia de estas proteínas reloj en el citoplasma y/o el núcleo en algunas células de las estructuras mencionadas depende de la hora del día, esto sugiere interacciones entre factores de transcripción positivos y negativos y de proteínas reloj similares a las que forman el asa de retroalimentación de los modelos canónicos propuestos para diferentes animales. Esto le da soporte a la hipótesis sobre la naturaleza multioscillatoria del sistema circadiano del acocil (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003).

## **2 El acocil como un modelo circadiano**

### **2.1 Descripción de la especie**

Los acociles son considerados como especies clave en las comunidades acuáticas. Son los invertebrados móviles de agua dulce más grandes, son de larga vida, actúan como omnívoros politróficos y alteran las redes tróficas de los hábitats que invaden (Momot, 1995). El acocil *Procambarus clarkii* es nativo del sur de los Estados Unidos de América y el norte de México, es el más ampliamente cultivado y distribuido en el mundo (Huner, 2002) pues este es considerado entre las especies comerciales más importantes de acociles, actualmente ha sido introducido en la mayoría de los continentes (Barbaresi y Gherardi, 2000) con excepción Oceanía y La Antártica, usualmente con consecuencias negativas (Hobbs et al, 1989). Múltiples características determinan la alta invasividad de *P. clarkii*: tiene una gran plasticidad ecológica, tolerancia a un amplio rango de condiciones físicas, químicas y biológicas. Además *P. clarkii* puede producir, dependiendo del tamaño de la hembra, más de 700 huevos (Gherardi, 2006; Aquiloni y Gherardi, 2008).

*P. clarkii* amenaza a las especies nativas de acociles por competencia directa o indirecta, y transmite a ellas el omicete *Aphanomyces astaci*, el agente etiológico de la plaga de los acociles (Gherardi, 2007), este reduce la biodiversidad nativa, altera las redes tróficas y los procesos del ecosistema (Gherardi y Acquistapace, 2007). Entre los crustáceos, los acociles de agua dulce son muchas veces invasores exitosos y *P. clarkii* provee un buen ejemplo de estas especies; estudios previos han sugerido que en presencia de un hábitat oportunista, esta especie puede alimentarse selectivamente de macrofitas y macroinvertebrados (Ilheu y Bernardo, 1993).

*Procambarus clarkii* puede vivir en una gran variedad de hábitats de agua dulce como ríos, lagos, lagunas, arroyos, canales y pantanos inundados estacionalmente. Es muy tolerante y adaptable a un amplio rango de variaciones químicas y físicas en condiciones acuáticas, como la salinidad moderada, niveles bajos de oxígeno, temperaturas extremas y la contaminación (Cruz y Rebelo, 2007).

## **2.2 Características cronobiológicas**

### **2.2.1 Ritmo de actividad locomotora**

La actividad circadiana en acociles adultos *P. clarkii* ha sido ampliamente estudiada (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003). *P. clarkii* muestra un ritmo de actividad locomotora que es capaz de sincronizarse a ciclos de luz-oscuridad, bajo este régimen presenta un patrón de actividad bimodal, con un pico de actividad aproximadamente a inicios de la fase de la oscuridad, y otro al inicio de la fase de luz (Page y Larimer, 1972, 1975).

Bajo condiciones de oscuridad constante *P. clarkii* expresa un ritmo de tipo unimodal; el cual se ha propuesto que muestra sólo el patrón de actividad que parece estar asociado al

apagado de la luz. Por esta razón, el pico que responde al encendido de la luz cuando este acocil se encuentra bajo un fotoperiodo, suele atribuirse a un factor exógeno (debido a que los animales carecen de este pico de actividad en oscuridad constante), es decir, se genera por medio de los fotorreceptores de la retina (Page y Larimer, 1972). Recientemente se ha demostrado que la sincronización de la locomoción en este organismo depende claramente de los fotorreceptores extraretineanos ubicados en el cerebro (Sullivan et al., 2009). El período circadiano de este tipo de actividad ha mostrado alteraciones después de la resección del cerebro, lo que demuestra que es regulado por el cerebro (Page y Larimer, 1976). La ubicación exacta y la identidad de los elementos celulares marcapasos responsable del ritmo circadiano de la actividad locomotora de *P. clarkii* aún no han sido completamente aclarada, pero el mecanismo propuesto se basa en una red de osciladores interconectados que pueden interactuar mediante péptidos (Strauss y Dirksen, 2010). Esta red no se limita a ajustar el ritmo usando un sólo reloj maestro central, sino que modula los parámetros circadianos de cada sistema de oscilación a través de una sincronización. En el caso de la sincronización fótica del ritmo de actividad, la reciente identificación de las vías y los mediadores de las estructuras protocerebrales (Strauss y Dirksen, 2010), que también expresan proteínas del reloj (Escamilla-Chimal et al., 2010), parece proporcionar pistas del marcapasos responsable de esta actividad endógena, siendo la retina, el complejo órgano x-glándula sinusadal, el cerebro y el sexto ganglio las principales estructuras orgánicas propuestas como osciladores fisiológicos o marcapasos (Strauss y Dirksen, 2010). Aunque el proceso de sincronización por luz del ritmo de actividad locomotora en este acocil ha sido ampliamente estudiado y aclarado, el proceso de sincronización por temperatura es desconocido.

### **3 Planteamiento del problema**

La sincronización de los ritmos endógenos con las señales ambientales es una clara característica adaptativa, en este sentido, la adaptación temporal es fundamental para la supervivencia de las especies que necesitan sincronizar su fisiología y conducta y ajustarlas a señales externas (Golombek y Rosestein, 2010), por ejemplo, la actividad y el reposo, la producción de hormonas, secreciones digestivas, entre otros. Aunque se ha estudiado ampliamente la conducta circadiana del acocil *P. Clarkii* bajo condiciones de luz y temperatura constante y los efectos de la luz en la sincronización del mismo, se desconoce si es capaz de sincronizar ante señales de temperatura; este es un factor importante, pues al ser animales que no regulan su temperatura, es decir, son animales poiquilotermos, la temperatura puede actuar de manera directa en la fisiología y por lo tanto en la conducta de este animal, de manera que podría tener efectos sobre su sistema circadiano, tomando en cuenta que este organismo suele estar sometido a grandes variaciones estacionales de temperatura, pues éste habita lugares en latitudes norte que sobrepasan el trópico de cáncer.

**4 Hipótesis:** La temperatura ambiental varía de manera diaria, si el sistema circadiano del acocil *P. clarkii* es capaz de sincronizarse a este tipo de estímulo, entonces los pulsos de temperatura podrían generar cambios de fase en horas de alta sensibilidad del reloj circadiano.

**5.1 Objetivo general:** Determinar si la temperatura baja puede inducir cambios de fase en la actividad locomotora del acocil *Procambarus clarkii*

**5.2 Objetivo particular:** Medir los posibles cambios de fase mediante pulsos de temperatura baja (5° C) a tres horas claves circadianas, TC 10, TC 13, TC 23.

## **6 Materiales y método**

### **6.1 Animales y aclimatación**

Los experimentos se realizaron utilizando acociles adultos *Procambarus clarkii* (n=48) en etapa de intermuda con un peso de entre 25-30 g. Los animales se obtuvieron del Rio Conchos, ubicado en Delicias Chihuahua. Todos los organismos se mantuvieron en el laboratorio en tanques aireados (6 mg O<sub>2</sub>/l) con una temperatura de 20±1° C. Cada tanque contenía de 5 a 10 organismos, los cuales se alimentaron con vegetales dos veces por semana. Todos los animales fueron mantenidos bajo un fotoperiodo de luz-oscuridad (LO) 12:12, es decir, 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

### **6.2 Registro de actividad locomotora y procedimientos experimentales**

Los organismos fueron colocados de manera individual en acuarios de registro formados por dos compartimentos comunicados entre sí y fabricados con plástico acrílico. Uno de los compartimentos consistió en un túnel oscuro simulando una madriguera (Fanjul-Moles et al, 1996), el otro compartimento consistió en una cámara amplia y translúcida que permitía el paso de la luz como se muestra en la figura 4. La luz fue provista por una lámpara de neón cuya intensidad fue de 300 lx, la lámpara fue colocada a una distancia de 30 cm a partir de base de la cámara y controlada por un temporizador programable. La temperatura se mantuvo a 20±1° C. Los movimientos del organismo fueron detectados por un arreglo de emisores y sensores de luz infrarroja distribuidos a lo largo de la base del acuario, los cuales se colocaron en cada uno de los dos compartimentos antes mencionados (Fig 4). La longitud de onda de la emisión infrarroja fue de 900 nm, que va más allá de la sensibilidad visual de los acociles (Kennedy y Bruno, 1961). La interferencia del haz de luz causada por



los movimientos del animal fue traducida de manera electrónica a un pulso de voltaje por medio de un circuito electrónico analógico-digital y transferida a una computadora en bits de información capturados cada 1 minuto para su posterior análisis. Todos los animales fueron alimentados una vez a la semana, variando el día y la hora de la alimentación.

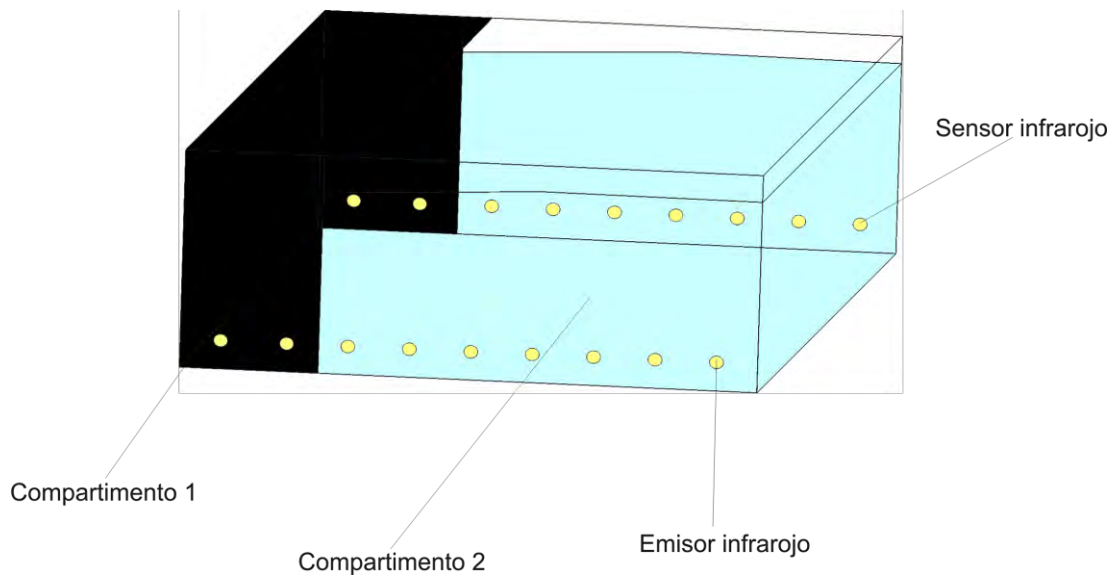


Fig 4. Esquema del sistema de registro utilizado para sondear el ritmo de actividad locomotora del acocil. El sistema cuenta con dos compartimentos, emisores y sensores de luz infrarroja. Los detalles del sistema se describen en el texto.

Se realizaron dos tipos de experimentos con controles adicionales. En el primer tipo de experimento, se registraron tres grupos de acociles (ocho organismos por grupo) bajo ciclos LO 12:12 por al menos 5 días. En el sexto día de la prueba, los animales fueron puestos en oscuridad constante (OO); cada grupo de animales fue estimulado con un pulso de luz de 1.2 kilolux (klx) durante 30 minutos a diferentes tiempos circadianos: TC 10, TC 13 o TC 23. Siete días o más después de la aplicación del pulso, el registro fue terminado y los datos

obtenidos fueron analizados. Los tiempos circadianos 12, 13 y 23 (TC 10, TC 13 o TC 23) corresponden a los períodos de baja, media y alta sensibilidad a la luz, según lo reportado por la curva de respuesta de fase (CRF) a la luz construida para el ritmo de actividad locomotora del acocil *Procambarus digueti* (Viccon-Pale y Fuentes-Pardo, 1994), la forma del registro de actividad locomotora para *P. digueti* es diferente a la utilizada en esta tesis; en el caso de *P. digueti*, los animales se encuentran fijos a un corcho y no se pueden mover libremente, el registro de actividad locomotora es cuantificado mediante hilos atados a las extremidades de cada animal y medido por medio de un transductor de fuerza, no obstante, es el reporte más cercano para una CRF de actividad locomotora en acociles. En el segundo tipo de experimento se registraron tres grupos de acociles de manera similar al experimento anterior, hasta el sexto día, en el cual las luces no se encendieron y los animales permanecieron en oscuridad constante (OO); entonces, en lugar de pulsos de luz se aplicaron pulsos de temperatura baja (5° C) con una duración de 30 minutos a las mismas horas circadianas que en el experimento anterior (TC 10, TC 13 o TC 23) según el grupo, de manera que cada grupo recibiera sólo un pulso; la temperatura del pulso se eligió en base a las bajas temperaturas del agua de los lugares donde habita este organismo alcanzadas durante el invierno. El pulso de temperatura consistió en un cambio rápido del agua del acuario mediante un sistema de bombas, se extrajo el agua del tanque y este se volvió a llenar con agua aireada fría. Al final del pulso, el agua del acuario fue devuelta y mantenida a 20° C; el cambio rápido del agua (completado en menos de 2 minutos) impidió que el animal experimentara hipoxia. Después del pulso de temperatura, los animales fueron mantenidos en oscuridad constante, y la temperatura se mantuvo a 20° C hasta siete días

después, donde se dio por finalizado el registro. En los experimentos control, los acociles se mantuvieron en las mismas condiciones, salvo sin el estímulo térmico o luminoso.

### **6.3 Análisis de datos**

La actividad durante períodos de 24 horas fue presentada convencionalmente como actogramas a doble gráfica (ver figuras 5, 6 y 7). El análisis de la actividad locomotora se basó en la presencia de patrones rítmicos robustos o bien definidos. Un pico de actividad se definió como el nivel de actividad locomotora superior a la actividad media por día +1 desviación estándar, discriminando así los pequeños movimientos como los de las antenas. El ritmo de actividad locomotora del acocil no es muy preciso y a veces está ausente (Fanjul-Moles et al, 1996); por lo tanto, se utilizaron métodos cuantitativos estadísticos para detectar el ritmo y se estimaron sus parámetros. Para determinar objetivamente la presencia o ausencia de un patrón rítmico, los datos de 7 días o más originalmente muestreados cada minuto, se agruparon con una frecuencia de 10 min y se analizaron de acuerdo a un periodograma ji cuadrada o  $X^2$  (Sokolove y Bushnell, 1978) con un rango de 15 a 30 horas, estimado mediante un software de análisis que será mencionado más adelante. Todos los animales con periodogramas significativos, es decir, que presentaran picos por encima de un intervalo de confianza de  $p < 0,01$ , se consideraron como rítmicos. Para medir los posibles cambios de fase producidos por la luz o la temperatura, el estímulo se aplicó en el primer ciclo de corrimiento libre en la etapa de oscuridad constante. Este enfoque supone que la fase del ritmo está bajo el control del ciclo LO previo (Aschoff, 1965; Moore-Ede, 1982).

El efecto de los estímulos de luz en la fase de las oscilaciones de la actividad se determinó en el séptimo día después de la estimulación. El tiempo circadiano (TC) se calculó por la

normalización de cada ciclo con respecto al período de 24 horas, el punto de la fase de referencia fue el inicio de la actividad (TC 12); para estimar este punto de referencia, el inicio de actividad se calculó a partir del ritmo estimado en el período de 24 horas cuando el ritmo estaba estabilizado. Este valor se proyectó al primer día de registro en oscuridad constante (OO) con una línea de regresión obtenida por mínimos cuadrados, en la que el día de la secuencia fue la variable dependiente, y el inicio de actividad fue la variable independiente (Enright, 1981). La pendiente de la recta de regresión se utilizó para verificar el valor del periodo. Todos los registros se analizaron mediante periodogramas  $X^2$  obtenidos mediante el software SPAD9 (OMNI-ALVA, México) y TAU (Mini Mitter, EE.UU.) para la determinación de los cambios de fase inducidos por temperatura baja y luz.

## 7 Resultados

Todos los animales sincronizaron al ciclo LO 12:12 y mostraron un ritmo de corrimiento libre bajo condiciones de oscuridad constante. El promedio del periodo circadiano de todos los animales estudiados fue  $\tau = 25.43 \pm 0.65$  h. El pulso fótico produjo retrasos en la noche subjetiva temprana ( $\Delta\phi \bar{X} = -9 \pm 1.2$ h) y avances en la noche subjetiva tardía ( $\Delta\phi \bar{X} = 4.2 \pm 0.9$ h) como se espera para una curva de respuesta de fase para luz. La figura 5 (A y B) muestra un registro representativo de dos acociles en donde se presenta el efecto de pulsos de luz blanca en la actividad locomotora de animales estimulados a TC 13 y TC 23. Los actogramas y sus periodogramas correspondientes muestran  $\tau = 26.7$  h con un cambio de fase de  $\Delta\phi = -11.3$  h y  $\tau = 23.4$  h con un cambio de fase de  $\Delta\phi = 3$  h, respectivamente. El pulso a TC 10 produjo pequeños retrasos ( $\Delta\phi \bar{X} = -0.125 \pm 0.24$ h).

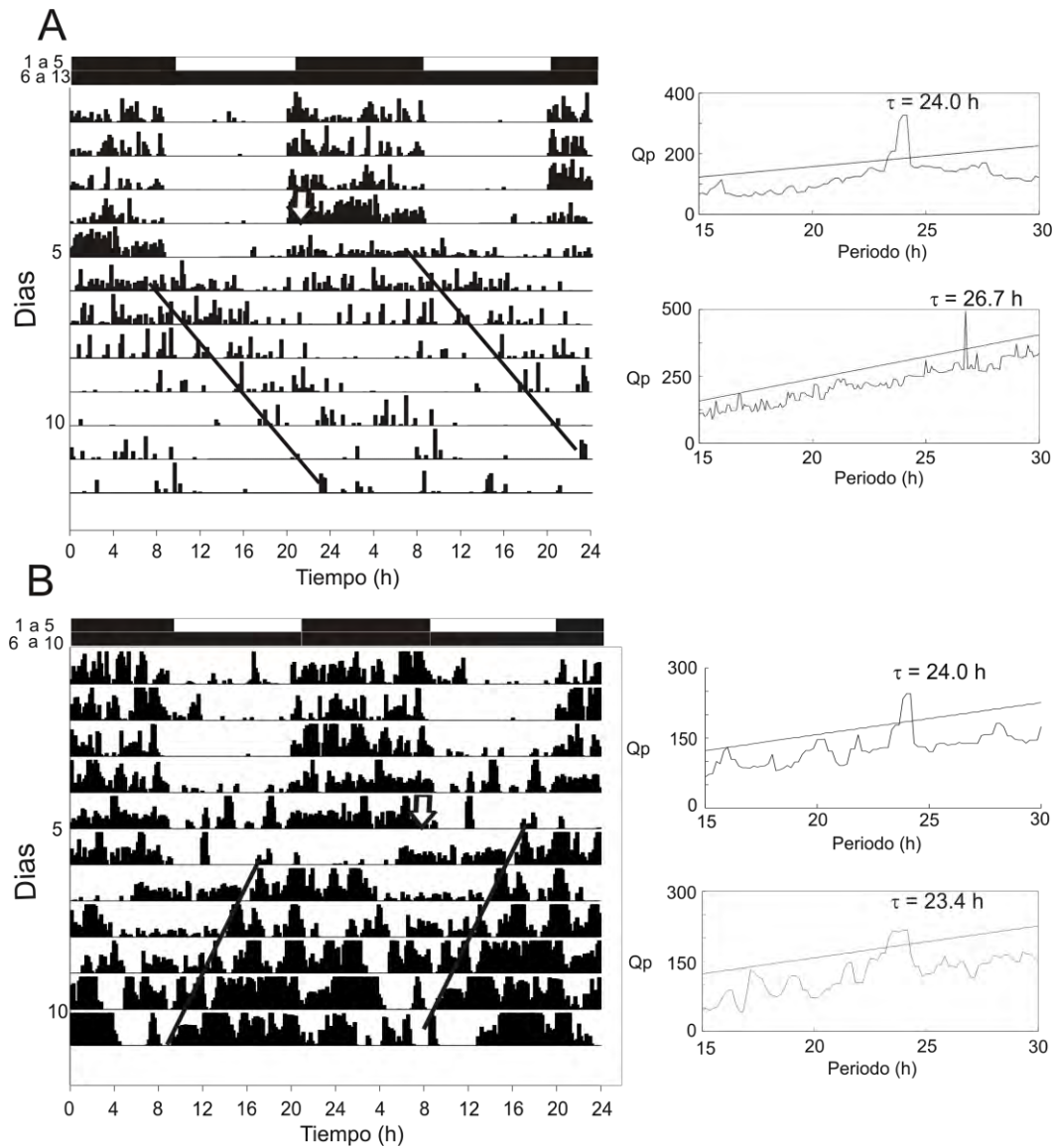


Fig 5. Actogramas a doble gráfica y sus periodogramas  $X^2$ , muestran cambios de fase inducidos por luz en la actividad motora del acocil. (A) pulso de luz a TC 13 produce un retraso  $\Delta\phi = -11.3$  h, el ritmo estable de corrimiento libre muestra  $\tau = 26.7$ h. (B) pulso a TC 23 produce un adelanto  $\Delta\phi = 3$ h, su ritmo estable de corrimiento libre después del pulso muestra  $\tau = 23.4$ h. Las flechas indican el momento del estímulo.

Los pulsos de temperatura baja cambiaron la fase del periodo del ritmo estable de actividad de 24 horas. El periodo presentó avances o retrasos de acuerdo con el tiempo circadiano,

siempre mostrando un cambio de fase en dirección opuesta a los cambios de fase producidos por la luz.

Durante la noche subjetiva temprana TC 13 el pulso de temperatura baja produjo adelantos ( $\Delta\phi \bar{X}=4.7 \pm 1.2h$ ). La figura 6 muestra dos registros representativos que muestran cambios en el ritmo producidos por pulsos de temperatura baja aplicados a TC13 y TC23 ( $\tau= 27.4 h$ ,  $\Delta\phi= 11 h$  y  $\tau= 28.2$ ,  $\Delta\phi= -6 h$ , respectivamente). Durante el primer día después de la aplicación del estímulo térmico (Fig. 6 A), el acocil mostró un decremento de actividad, el cual fue recuperado al segundo día después de la entrada a las condiciones de oscuridad constante. En este día el ritmo de actividad del acocil experimental mostró un avance de 11 horas. Tanto la línea de regresión como el periodograma mostraron un ritmo de corrimiento libre con un periodo de  $\tau= 26 h$  bajo condiciones constantes durante todos los días siguientes. Los acociles que recibieron los pulsos de temperatura baja durante la noche subjetiva temprana (TC 23) mostraron retrasos de fase ( $\Delta\phi \bar{X}= -7.2 \pm 1.15h$ ). Uno de los registros demuestra este fenómeno (Fig. 6 B) mostrando un ritmo de corrimiento libre mayor a 24 horas después de recibir el pulso. Los animales que recibieron el pulso al final del día subjetivo (TC 10) mostraron un promedio de cambio de fase de menos de una hora ( $\Delta\phi \bar{X}= 0.5 \pm 0.5h$ ). Los animales control no mostraron cambios de fase (Fig. 7)

La figura 8 muestra los cambios de fase obtenidos mediante la aplicación de pulsos de temperatura de 5° C durante 30 minutos al acocil a los tres tiempos circadianos anteriormente mencionados. El resultado obtenido muestra insensibilidad durante el día subjetivo (TC 10). Los avances ocurrieron al tiempo esperado para la noche subjetiva temprana (TC 13), y los retrasos ocurrieron aproximadamente al tiempo esperado para la noche subjetiva tardía (TC 23).

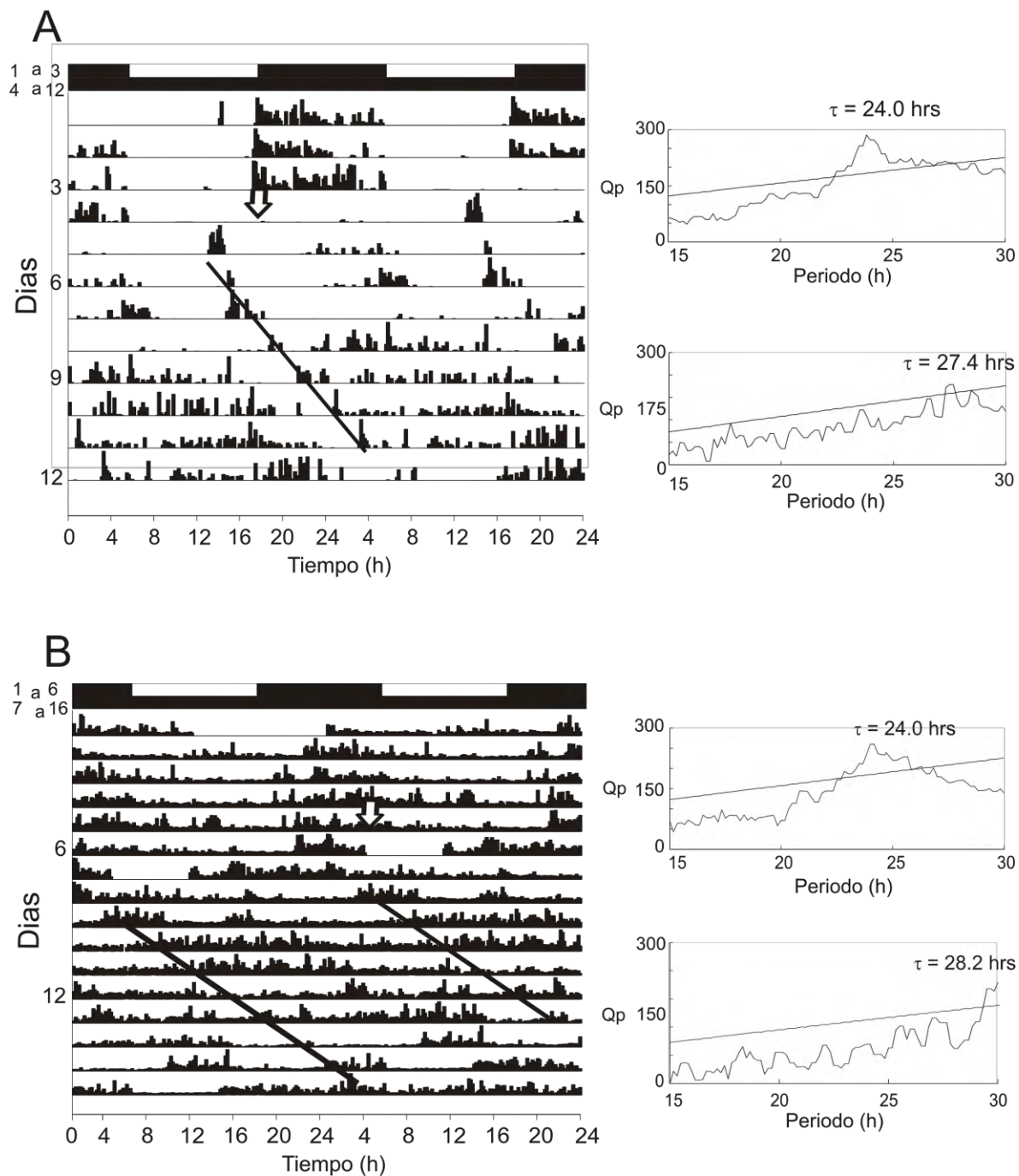


Figura 6. Actogramas a doble gráfica y sus periodogramas  $X^2$ , muestran cambios de fase inducidos por temperatura baja en la actividad motora del acocil. (A) pulso de temperatura baja a TC 13 produce un adelanto  $\Delta\phi = 11$  h, el ritmo estable de corrimiento libre muestra  $\tau = 27.4$  h. (B) pulso a TC 23 produce un retraso  $\Delta\phi = -6$ h, su ritmo estable de corrimiento libre después del pulso muestra  $\tau = 28.2$  h. Las flechas indican el momento del estímulo.

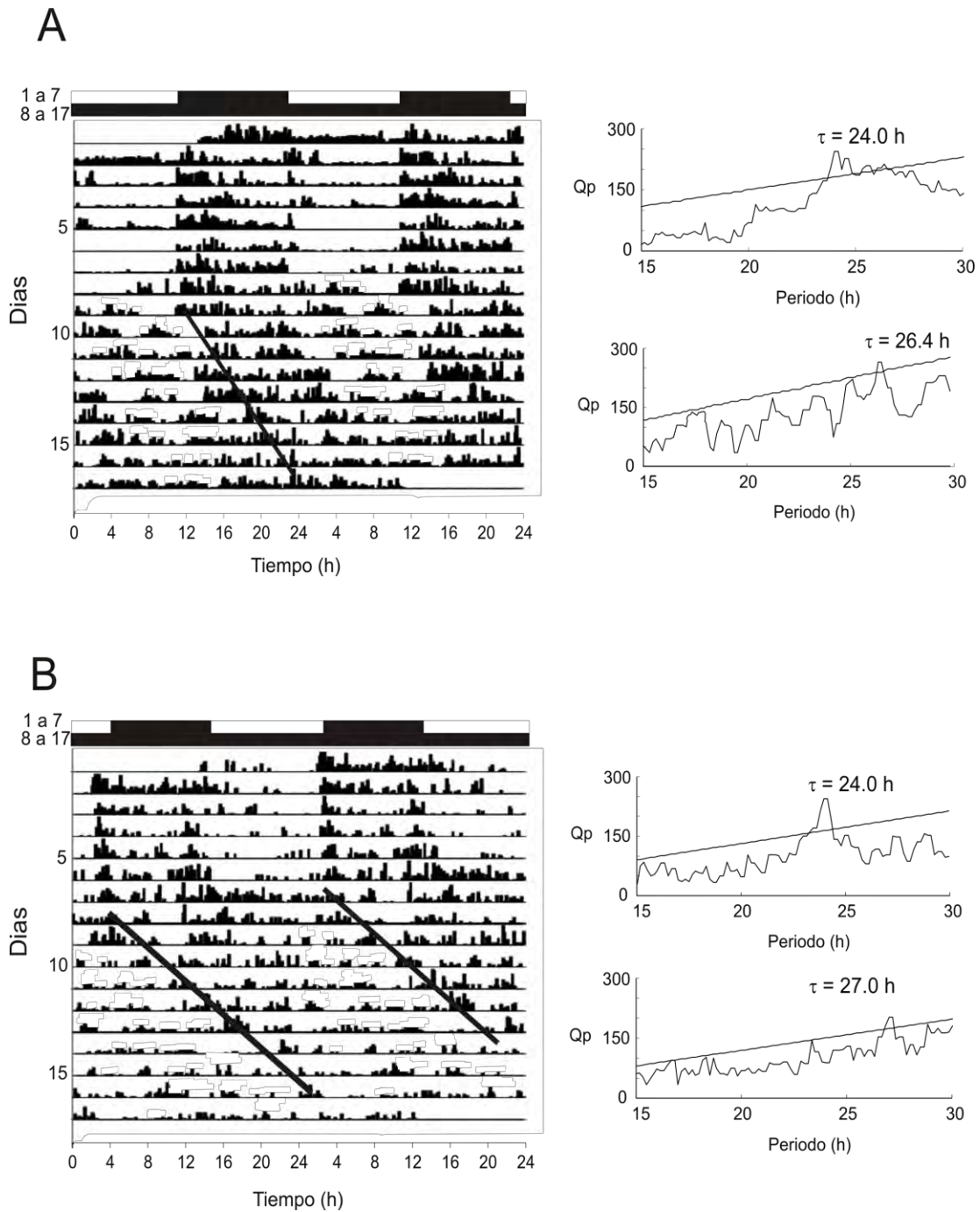


Figura 7. Actogramas a doble gráfica y sus periodogramas  $X^2$  de dos animales control representativos, los animales no muestran cambios de fase en la actividad motora. (A) animal control para TC 13, el ritmo estable de corrimiento libre muestra  $\tau=26.4$  h. (B) animal control para TC 23, el ritmo estable de corrimiento libre muestra  $\tau= 27.0$  h.



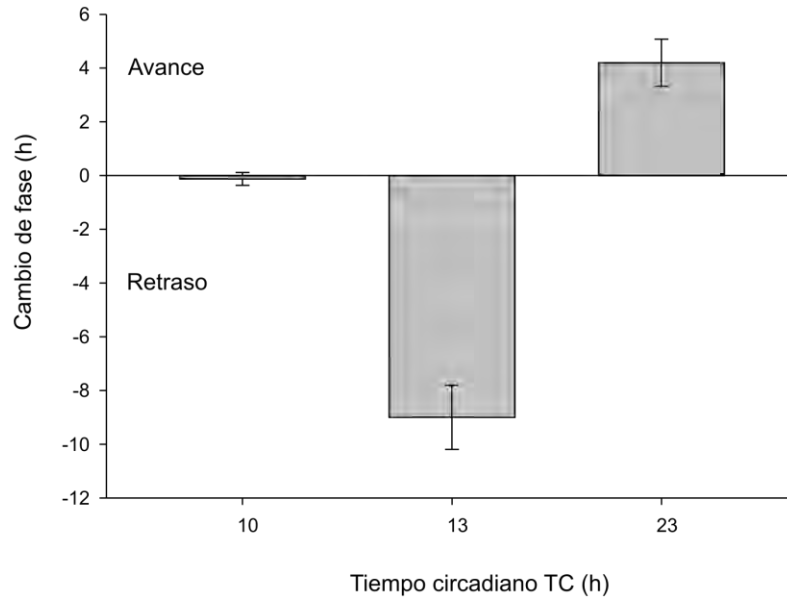
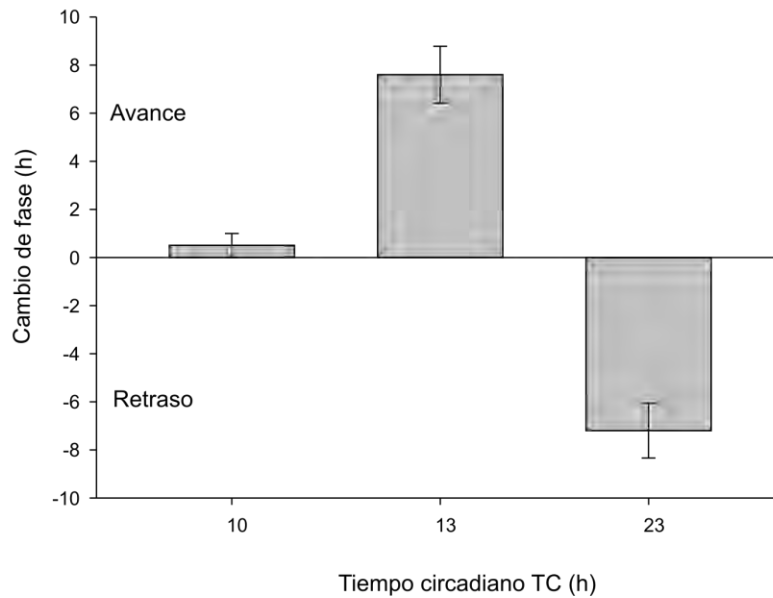
**A****B**

Fig 8. Cambios de fase para *P. clarkii* usando pulsos de luz de 30 minutos (A) o pulsos de temperatura baja (5° C) de 30 minutos (B). Para los dos grupos de acociles (n=24 para cada grupo, 8 animales por punto) los pulsos se aplicaron a tres horas circadianas claves: día subjetivo tardío, noche subjetiva temprana y noche subjetiva tardía(a TC10, TC13 y TC23, respectivamente).

## 8 Discusión

Los resultados muestran que la temperatura baja induce cambios de fase en el ritmo de actividad locomotora del acocil *Procambarus clarkii*. Este estímulo ambiental parece ser un sincronizador o zeitgeber eficaz para el acocil experimental. Se generaron cambios de fase ( $\Delta\phi$ ) estables cuando los pulsos de temperatura fueron dados en tiempos clave de las oscilaciones circadianas de la actividad de los animales.

En esta tesis, se determinaron los efectos de la luz y la temperatura en tres tiempos circadianos con el protocolo tipo 2 propuesto por Aschoff (1965). En este protocolo, el estímulo se aplica cuando el animal se encuentra en corrimiento libre pero con el control de fase del ciclo LO previo (se aplicó el estímulo en el primer día después de la liberación del ciclo LO). Este método es efectivo para estimar tanto el tiempo circadiano ( $\tau / T$ ) como los cambios de fase (asumiendo que el ritmo está controlado por el zeitgeber previo) así como su sincronización. Además, poco después de la liberación de la sincronización, una curva de respuesta de fase tiene mejor definida su topología a diferencia de su elaboración después de una larga exposición a las condiciones de corrimiento libre (Johnson, 1992). Sin embargo, para estimar la fase, tuvimos que considerar dos posibles post efectos: cambios de fase después del estímulo y los posibles ciclos transitorios (Johnson, 1992). Para evitar estos artefactos se extrapolo nuestra fase de referencia varios ciclos antes hasta el día del estímulo y se calculó una línea de regresión por mínimos cuadrados para los animales control y los animales experimentales.

Los animales utilizados en este estudio fueron colectados en el norte de México (Delicias, Chihuahua), donde la temperatura del agua cae a un mínimo de 2° C. Los canales de agua de vez en cuando se congelan y causan que *P. clarkii* tienda a esconderse en sus madrigueras. Por lo tanto, el estímulo de la temperatura utilizada tiene validez ecológica. Los resultados muestran que la baja temperatura y la luz producen efectos opuestos en la dirección del cambio de fase en el ritmo de actividad. Este resultado sugiere la presencia de un reloj que responde a los cambios de temperatura, sin embargo, la integración de la información térmica al sistema circadiano podría ser diferente a la de la luz. Los avances y los retrasos producidos por las bajas temperaturas al anochecer y al amanecer pueden proteger al acocil de las bajas temperaturas desfavorables dependiendo de la estación anual. En respuesta a estos cambios de temperatura, el acocil podría moverse dentro y fuera de su madriguera según la temperatura que sea menos o más favorable. Este patrón de comportamiento se ha observado en otros animales, como serpientes (Heckrotte, 1962) y sugiere que los ritmos de comportamiento puede variar en función de la temperatura (Sweeney y Hastings, 1960). Majercak et al. (1999) reportaron un aumento temprano de las concentraciones de PER en respuesta a una disminución de la temperatura en la mosca *Drosophila melanogaster*. De esta forma podemos sugerir que un mecanismo similar podría estar actuando en el acocil. Esta hipótesis se basa en reportes recientes que proponen que el patrón de comportamiento de la maquinaria molecular de *P. clarkii* podría ser similar a la de *Drosophila* (Escamilla-Chimal et al., 2010). Es posible que en el acocil, como en la mosca (Weber et al. 2011), un pulso de temperatura baja durante la noche subjetiva temprana pueda inducir mayores niveles de PER y acelerar la formación de heterodímeros PER-TIM, recordemos pues que la formación de estos heterodímeros tienen lugar a partir

de la noche subjetiva temprana. El aumento temprano de la concentración de estos heterodímeros en el núcleo podría inhibir el complejo CLOCK-CYC, cerrando de esta forma el asa de retroalimentación antes de lo esperado, produciendo un avance de fase. En contraste, durante la noche subjetiva tardía, la baja temperatura que actúan sobre PER, podría facilitar nuevamente la formación del heterodímero PER-TIM para permitir la permanencia de altas concentraciones de este en la célula, pues en condiciones normales, los niveles de concentración del heterodímero disminuyen una vez que han alcanzado su pico máximo, por esta razón, la permanencia de su concentración promovería la entrada del heterodímero al núcleo y de esta forma podría prolongar la acción inhibitoria del complejo CLOCK-CYC, que ya se estaría llevando a cabo, lo que nos da como resultado un retraso en el mecanismo del reloj.

Con esta tesis se demuestra que un estímulo de baja temperatura puede cambiar la fase del ritmo de actividad locomotora del acocil, sin embargo, el mecanismo por el cual la temperatura sincroniza el sistema circadiano de los acociles no está claro. Actualmente aún no han sido identificados termorreceptores específicos de los crustáceos; no obstante, se ha propuesto un papel secundario para otro tipo de receptores sensoriales que cumplirían como transductores de la temperatura (para revisión ver Lagerspetz y Vainio, 2006). Algunos avances en la investigación de la temperatura y la sincronización de los sistemas circadianos en los invertebrados han sugerido la existencia de receptores periféricos involucrados en la transducción térmica en *Drosophila*, además de la participación de genes específicos para la integración de la temperatura en el mecanismo del reloj (Glaser y Stanewsky, 2005). Se ha propuesto a los órganos cordotonales como posibles transductores de temperatura (Sehadova et al., 2009). Debido a que este tipo de propioceptor está

presente en los crustáceos (Lowe y Mill, 1972), sugiere al órgano cordotonal como un receptor térmico que podría participar en la sincronización circadiana. Investigaciones futuras deberían centrarse en determinar si este mecanismo de transducción de estímulos térmicos para el control circadiano está presente en los crustáceos decápodos como los acociles.

En una curva de respuesta de fase la dirección del cambio de fase es una respuesta especie específica puesto que en algunos insectos, una CRF experimental generada por pulsos de baja temperatura tiende a tener la misma dirección que la curva de respuesta de fase generada por pulsos de luz (Saunders y Hong 2000). Es interesante notar que una revisión del atlas de curvas de respuesta de fase (Johnson, 1990) muestra que la mayoría de las curvas de respuesta de fase de temperatura de diversos invertebrados, incluyendo algunos crustáceos, no tienen una topología igual a la producida por efectos de la luz. En los insectos por ejemplo, la mayoría de las CRF parecen no tener una zona muerta. Además, algunas CRF de los insectos sólo muestran retrasos (para una revisión, ver Rensing y Ruoff, 2002). Saunders y Hong (2000) observaron que la CRF producida por pulsos de temperatura alta y baja se comporta de manera especular, por lo que sería interesante para complementar este estudio, probar la sensibilidad del reloj circadiano del acocil a diferentes horas, en base a pulsos de temperatura alta.

## **9 Conclusión**

La participación de la temperatura en los sistemas circadianos de los crustáceos ha sido muy poco estudiada; esta tesis ha demostrado que la temperatura baja puede inducir cambios de fase en el ritmo de actividad locomotora del acocil *P. clarkii*, lo cual puede dar

pauta al estudio a fondo de los componentes de entrada, osciladores y salidas de los ritmos controlados por la temperatura, esto es importante puesto que nos da herramientas para el entendimiento de las estrategias que presentan estos organismos ante las variaciones temporales de temperatura en el ambiente desde un punto de vista cronobiológico y por lo tanto adaptativo.

## 10 Referencias

Allada R, Chung B. 2010. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol*. 72:605-624.

Aquiloni L, Gherardi F. 2008. Extended mother-offspring relationships in crayfish: the return behaviour of juvenile *Procambarus clarkii*. *Ethology* 114:946–954.

Aschoff J. 1965. Response curves in circadian periodicity En: Aschoff J, editor. *Circadian clocks*. Amsterdam: North-Holland. pp. 95–111.

Aschoff J. 1981. *Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms*. Vol. 4. New York: Plenum. pp.3

Barbaresi S, Gherardi F. 2000. The invasion of the alien crayfish *Procambarus clarkii* in Europe, with particular reference to Italy, *Biological invasions* 2:259-264.

Bodenstein C, Heiland I, Schuster S. 2011. Calculating activation energies for temperature compensation in circadian rhythms *Phys Biol*. 8:056007.

Brady J. 1979. *Biological clocks*. Edward Arnold Publishers UK p5.

Cruz MJ, Rebelo R. 2007. Colonization of freshwater habitats by an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, in Southwest Iberian Peninsula. *Hydrobiologia*. 575:191-201.

Daan S. 1982. Circadian rhythms in animal and plants. En: *Biological timekeeping*. Brady J, editor. Cambridge University Press. p23.

Daan S. 2009. A history of chronobiological concepts. En: Albrecht U. editor. *Protein Reviews: The circadian clock*, Springer Vol. 12 p9.

- Enright JT. 1981. Data analysis. En: Aschoff J, editor. Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms. New York: Plenum. Vol. 4. pp21-40.
- Escamilla-Chimal EG, Velázquez-Amado RM, Fiordelisio T, Fanjul-Moles ML. 2010. Putative pacemakers of crayfish show clock proteins interlocked with circadian oscillations. *J Exp Biol.* 213:3723–3733.
- Fanjul-Moles ML, Miranda-Anaya M, Prieto J. 1996. Circadian locomotor activity rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Chronobiol Int.* 13:15–26.
- Fanjul-Moles ML, Prieto-Sagredo J. 2003. The circadian system of crayfish: a developmental approach. *Microsc Res Tech.* 60:291–301.
- Gherardi F. 2006. Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Mar Freshw Behav Physiol* 39:175–191.
- Gherardi F, Acquistapace P. 2007. Invasive crayfish in Europe: the impact of *Procambarus clarkii* on the littoral community of a Mediterranean lake. *Freshwater Biol* 52: 1249-1259.
- Gherardi F. 2007. Understanding the impact of invasive crayfish. En: Gherardi F. editor, Biological invaders in inland waters: profiles, distribution, and threats. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 507-542.
- Glaser FT, Stanewsky R. 2005. Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. *Curr Biol.* 15:1352–1363.
- Golombek DA, Rosestein RE. 2010. The physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90: 1063–1110.
- Hardin P.E. 2005. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15: 714-722.
- Heckrotte C. 1962. The effect of the environmental factors in the locomotory activity of the plains garter snake (*Thamnophis radix radix*). *Anim Behav.* 10:193–207.
- Hobbs HI, Jass JP, Huner JV. 1989. A Review of Global Crayfish Introductions with Particular Emphasis on Two North American Species (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana* 56: 299-316.
- Hong C. I.y Tyson J.J. 1997. A proposal for temperature compensation of the circadian rhythm in *Drosophila* based on dimerization of the Per protein, *Chronobiol Int.* 14:521-529.
- Huner JV. 2002. *Procambarus*. En: Holdich DM editor Biology of Freshwater Crayfish. Blackwell Scientific Press , Oxford , pp 541–574.

Ilheu M, Bernardo JM .1993. Experimental evaluation of food preference of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: vegetal versus animal. *Freshwater Crayfish* 9: 359–364.

Johnson CH. 1990. An atlas of phase responses curves for circadian and circatidal rhythms [Internet]. Nashville, USA: Department of Biology, Vanderbilt University [citado 2011 Nov14]. Disponible en <http://www.cas.vanderbilt.edu/johnsonlab/prcatlas/>

Johnson CH. 1992. Phase response curves: What can they tell us about circadian clocks? En: Hiroshige T, Honma K. editores *Circadian clocks from cell to human*. Sapporo: Hokkaido University Press. pp 209–249.

Johnson CH, Elliot J, Foster R, Honma K, Kronaver R. 2004. Fundamental proprieties of circadian rhythms En: Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ editores. *Chronobiology: Biological Timekeeping*. USA. Sinauer Associates. pp67, 68, 72, 75, 76.

Kennedy D, Bruno MS. 1961 . The spectral sensitivity of crayfish and lobster vision. *J Gen Physiol*. 44 :1089-1102.

Koukkari W. L., Sothorn R. B. 2006. *Introducing biological rhythms: A Primer on the Temporal Organization of Life, with Implications for Health, Society, Reproduction, and the Natural Environment*. USA Springer Science. pp 1, 21, 25, 26, 29, 41.

Lagerspetz KYH, Vainio LA. 2006. Thermal behavior of crustaceans. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 81:237–258.

Lowe DA, Mill PJ. 1972. An analysis of the types of sensory unit present in the PD proprioceptor of decapod crustaceans. *J Exp Biol*. 56:509–525.

Majercak J, Sidote D, Hardin PE, Edery I. 1999. How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature feature. *Neuron*. 24:219–230.

Momot WT, 1995. Redefining the Role of Crayfish in Aquatic Ecosystems. *Reviews in Fisheries Science* 3: 33–63.

Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. 1982. *The clock that time us*. Cambridge: Harvard University Press. p 448.

Nitabatch M, Taghert P. 2008. Organization of the *Drosophila* circadian control circuit. *Curr Biol*. 18: 84-93.

Page TL, Larimer JL. 1972. Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. The role of the eyes and caudal photoreceptor. *J Comp Physiol. A*. 78:107–120.

Page TL, Larimer JL. 1975. Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish – I. The locomotor activity rhythm. *J Comp Physiol. A*. 97:59–80.



Page TL, Larimer JL. 1976. Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms. *Photophysiology*. 23:245–251.

Pittendrigh CS. 1981. Circadian systems: entrainment. En: Aschoff J editor *Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms*. New York: Plenum. Vol. 4 pp21–40.

Rensing L, Ruoff P. 2002. Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol Int*. 19:807–864.

Saunders DS, Hong SF. 2000. Effects of temperature and temperature-steps on circadian locomotor rhythmicity in the blow fly *Calliphora vicina*. *J Insect Physiol*. 46:289–295.

Sehadova H, Glaser FT, Gentile C, Simoni A, Giesecke A, Albert JT, Stanewsky R. 2009. Temperature entrainment of *Drosophila*'s circadian clock involves the gene *nocte* and signaling from peripheral sensory tissues to the brain. *Neuron*. 64:251–266.

Sokolove PG, Bushell WN. 1978. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol*. 72:131–160.

Strauss J, Dirksen H. 2010. Circadian clocks in crustaceans: identified neuronal and cellular systems. *Front Biosci*. 15:1040–1074.

Sullivan JM, Genco MC, Marlow ED, Benton JL, Beltz BS, Sandeman DC. 2009. Brainphotoreceptor pathways contributing to circadian rhythmicity in crayfish. *Chronobiol Int*. 26:1136–1168.

Sweeney BM, Hastings JW. 1960. Effects of temperature upon diurnal rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY: Long Island Biological Association. pp87–104.

Takahashi J S, Turek F W. 2001. Introduction to circadian rhythms. En: Takahashi J S, Turek F W, Moore R Y editores. *Handbook of behavioral neurobiology, Circadian clocks* Kluner Academic / Plenum Publishers, NY USA. Vol. 12 pp3-4.

Viccon-Pale JA, Fuentes-Pardo B. 1994. Synchronization by light of the circadian rhythms of motor activity in crayfish. *Biol. Rhythm Res*. 25:267–276.

Weber F, Zorn D, Rademacher C, Hung HC. 2011. Post-translational timing mechanisms of the *Drosophila circadian clock*. *FEBS Lett*. 585:1443–1449.

Winfrey, A. T. 1970. The temporal morphology of a biological clock. En: M. Gerstenhaber ed *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*. Providence, R.I.: American Mathematical Society. Vol. 2 pp 110-115.

**Esta tesis fue realizada gracias al apoyo de PAPIIT IN 218811**

**Agradezco mucho el tiempo de la Doctora María Luisa Fanjul Peña, del M. en C. Julio Prieto Sagredo, así como el de todos los integrantes del Laboratorio de Neurofisiología Comparada y a mis sinodales.**