



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VARIACIONES DIARIAS EN LA CONCENTRACIÓN
DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO (HSP70)
EN EL ACOCIL *P. CLARKII*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O
P R E S E N T A :

FERNANDO LÓPEZ RESTREPO



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL
CIUDAD DE MÉXICO, 2018



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurofisiología y Ritmos Biológicos de la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Elsa G Escamilla Chimal, gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN210913.

Agradezco al Dr. Salvador Leonardo Hernández López y a la M en C Gabina Arenas López del Laboratorio de Electrofisiología, Facultad de Medicina, UNAM en la implementación de la técnica de Western Blot.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Elsa Escamilla Chimal, cuya dirección y dedicación permitieron encaminar este trabajo.

A los compañeros del laboratorio de Neurofisiología y Ritmos Biológicos, por su ayuda y apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

A mis profesores de la carrera, cuya enseñanza me permitió expandir mis horizontes académicos y profesionales.

A mis sinodales, cuyas certeras observaciones aportaron a cada paso del proceso.

A mis padres, a mi hermano y a mi sobrina, que siempre estuvieron ahí para mí y me proporcionaron su amor y apoyo incondicional.

A mi novia, cuyo cariño y consejos ayudaron en los momentos más difíciles.

Índice

1. Resumen	5
2. Introducción	6
2.1. Ritmos biológicos	6
2.1.1. Luz, sincronizadora de los ritmos circadianos	7
2.1.2. Sistema circadiano y reloj molecular	8
2.1.3. Reloj molecular en invertebrados	9
2.2. <i>Procambarus clarkii</i> : generalidades	11
2.2.1. Ritmos en <i>Procambarus clarkii</i>	15
2.2.2. <i>Procambarus clarkii</i> y estrés ambiental	16
2.3. Proteínas de Choque Térmico (HSP70)	16
3. Planteamiento y justificación	20
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	21
6. Material y método	22
6.1. Organismos utilizados	22
6.2. Diseño experimental	22
6.3. Determinación de proteínas por método de Bradford	23
6.4. Cuantificación de HSP70 por Western Blot	24
Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).	24
Electrotransferencia	24
Incubación	25
Revelado	25
6.5. Análisis estadístico	26

7. Resultados	27
7.1. Análisis estadístico	31
7.2. Ritmicidad de HSP70	32
8. Discusión	33
9. Conclusión	37
10. Literatura citada	38

1. Resumen

La proteína de choque térmico HSP70 es una proteína muy conservada filogenéticamente, que protege a la célula de estresores ambientales, tales como la luz y la temperatura. Se han reportado ritmos diarios en la concentración de HSP70 en distintos organismos, pero no existe evidencia de ritmicidad circadiana o si solamente responde a estrés ambiental. Para determinar si existe un ritmo circadiano en la concentración de esta proteína, se midió HSP70 en acociles de la especie *Procambarus clarkii* expuestos a fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 y condiciones de oscuridad constante. Se extrajo el ganglio supraesofágico o cerebroide (uno de los tres marcapasos putativos de crustáceos) de tres acociles durante seis puntos a lo largo del día y se determinó la concentración de HSP70 por medio de Western Blot. Los resultados muestran un ritmo diario en la concentración de HSP70 de acociles expuestos a condiciones de luz-oscuridad 12:12; esto se reporta por primera vez para esta especie en el presente estudio. No obstante, después de tres días de oscuridad constante no fue posible detectar, mediante esta técnica, la presencia de HSP70 en el ganglio cerebroide de *P. clarkii*. En consecuencia, no se pudo confirmar la presencia del ritmo circadiano en la concentración de HSP70 en este organismo.

2. Introducción

2.1. Ritmos biológicos

Se conoce como ritmo biológico a la recurrencia de cualquier evento en determinado sistema biológico en intervalos regulares (Kalmus, 1935). Los ritmos biológicos son una adaptación que permite a los organismos sincronizar su fisiología y conducta con las señales externas de su ambiente (Golombek y Rosenstein, 2010). Han sido observados en todos los organismos estudiados, desde bacterias hasta eucariontes (Fanjul Moles, 2013). La oscilación (variación repetitiva de una variable o proceso) del ritmo biológico es definida por varios parámetros: el periodo, que es el tiempo que tarda un ciclo completo (determinado por el uso de dos puntos de referencia idénticos); la amplitud, definida como la diferencia entre los valores máximo y mínimo alcanzados por la variable biológica durante la oscilación; la acrofase, que es valor máximo de la oscilación; la batifase que es el valor mínimo de la oscilación; el mesor, un estimado de la tendencia central de la distribución de valores de la oscilación (Vega, 1993; Portaluppi et al., 2008).

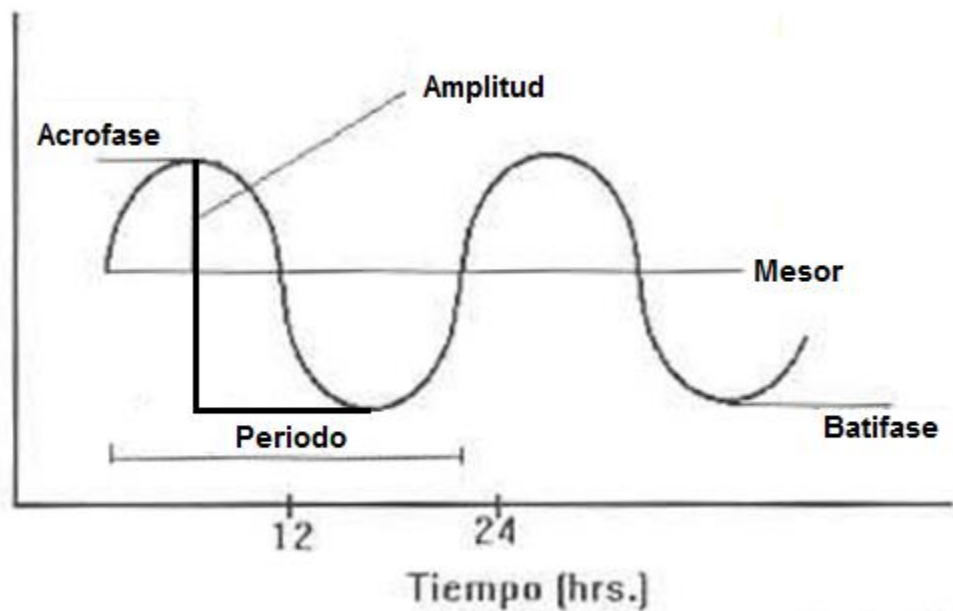


Figura 1. Parámetros de un ritmo biológico (modificado de Vega, 1993).

Los ritmos biológicos son clasificados para su estudio en tres categorías basadas en su frecuencia (el número de veces que se repiten en un determinado periodo): ritmos infradianos, que se presentan menos de una vez por día y tienen su periodo mayor a 28 horas; ritmos ultradianos, cuya frecuencia es mayor a un ciclo por día y tienen su periodo desde milisegundos hasta 20 horas; y los circadianos, cuyo periodo es cercano a las 24 horas y, por tanto, presentan cerca de un ciclo al día (Koukkari y Sothorn, 2006; Portaluppi et al., 2008).

Los ritmos circadianos presentan varias características que los diferencian de un ritmo diario (generado únicamente por el ambiente) y son comunes entre grupos taxonómicos (Gould et al., 2006; Aronson, 1994). 1) Son endógenos, es decir, generados en el propio organismo sin necesidad de estímulos ambientales. 2) Tienen la capacidad de sincronizarse, es decir, mantener su periodo igual al del sincronizador, que puede ser uno de los ciclos geofísicos a los que el organismo se ve expuesto, como el ciclo luz-oscuridad (Edmunds, 1988). 3) En ausencia de señales externas su periodo varía ligeramente de las 24 horas (Wever, 1986). Esta diferencia de periodo resulta en una divergencia con respecto al ritmo sincronizado, lo que es conocido como libre corrimiento. 4) Presentan compensación de la temperatura, es decir, poseen varios mecanismos que permiten que se conserve el periodo del ritmo a pesar de variaciones en la temperatura ambiental y fisiológica (Gould et al., 2006).

2.1.1. Luz, sincronizadora de los ritmos circadianos

La luz es uno de los sincronizadores más importantes a los que se ven expuestos los organismos, debido a la importancia del ciclo día-noche en distintas condiciones ambientales. Tanto la longitud de onda como la intensidad de la luz varían a lo largo del día, con efectos en la sincronización del reloj circadiano (Fanjul Moles et al., 2004). Para su estudio la luz puede ser medida de acuerdo con su intensidad (en unidades de potencia por unidad de área, por ejemplo, Megawatts por metro cuadrado o MW/m²) o de acuerdo con su longitud de onda (en nanómetros). Este segundo criterio de medición permite determinar el espectro de radiación electromagnética que está dividido en varias categorías, entre las que se encuentra la luz visible, que ocupa el rango de longitud de onda de 400 nm a 700 nm (Powles, 1984).

El efecto de la luz también permite a los animales nocturnos sincronizarse con el ciclo geofísico luz-oscuridad. Esto puede observarse experimentalmente al exponer al organismo a un pulso de luz (DeCoursey, 1986). Además, la luz constante induce

arritmia (pérdida de la ritmicidad en los procesos biológicos) al interrumpir la sincronía entre las células, aunque la ritmicidad siga presente dentro de las mismas células (Ohta et al., 2005).

Un factor lumínico que afecta notablemente los ritmos biológicos de los seres vivos es el fotoperiodo, es decir, la proporción de horas de luz (fotofase) y oscuridad (escotofase) a los que está expuesto un organismo; este puede influir en gran cantidad de procesos biológicos en diferentes organismos. Por ejemplo, en crustáceos puede afectar a la muda, el crecimiento, la reproducción (Armitage et al., 1973) y la maduración de las gónadas (Castañón Cervantes et al., 1995; Reynolds, 2002). Además, se ha observado que la reducción de la fotofase (periodo durante el que el organismo se ve expuesto a luz) incrementa el consumo de oxígeno en dos especies de cangrejo, *Hemigraspus nudus* y *Hemigraspus oregonensis* (Dehnel, 1958), mientras que la luz visible puede inducir el estado de estrés en el acocil *Procambarus clarkii* (Fanjul Moles et al., 1998). A pesar de los efectos que puede tener la luz en los ritmos biológicos, estos son generados de manera interna por el sistema circadiano.

2.1.2. Sistema circadiano y reloj molecular

El sistema circadiano está formado por tres elementos principales: la estructura biológica llamada reloj o marcapasos, que genera la oscilación, seguida de la vía sincronizadora por medio de la cual el reloj se ajusta al *Zeitgeber* (del alemán, significa “dador de tiempo”), y la vía de salida, (Figura 2) mediante la cual el reloj se conecta con los sistemas efectores y da origen a los ritmos manifiestos (Helfrich Förster et al., 1998; Edery, 2000).

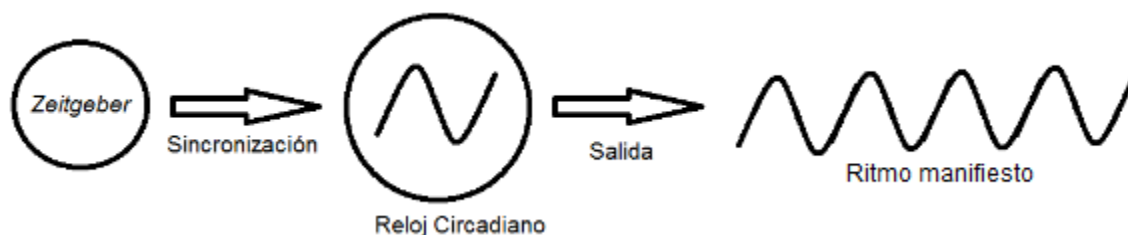


Figura 2. Esquema del sistema circadiano y sus componentes.

Si bien el marcapasos organiza la expresión de los ritmos biológicos, la oscilación circadiana es generada a nivel intracelular por las interacciones entre genes denominados genes reloj. Estos genes forman asas de retroalimentación transcripcional-traducciona (Fanjul Moles, 2013). Los genes reloj tienden a variar entre diferentes grupos taxonómicos, pero existe analogía en la función de los genes de modo que el funcionamiento de las asas de retroalimentación es el mismo: algunos componentes codifican para elementos positivos o activadores (es decir, que se unen al gen blanco para iniciar su transcripción, tal como kaiA en la cianobacteria *Synechococcus*, WHITE COLLAR-1 y 2 en *Neurospora*, CLOCK y BMAL1 en mamíferos) y otros codifican para elementos negativos (que interrumpen la transcripción del gen blanco, como kaiC en *Synechococcus*, FREQUENCY en *Neurospora*, PER1, 2 y 3 en mamíferos) que interrumpen el funcionamiento de los activadores (Fanjul Moles, 2013; Dunlap et al., 1999). Otros componentes (quinasas y fosfatasas) regulan la velocidad del reloj al interferir con la actividad de los elementos activadores (Vanselow y Kramer, 2010). Las diferencias observadas en términos de los distintos componentes de los relojes moleculares de distintos organismos parecen corresponderse con la historia evolutiva de los grupos taxonómicos (Dunlap, 1999). No obstante, las similitudes se mantienen en el reloj circadiano de organismos distintos, entre los cuales ha sido objeto de estudio el de los invertebrados.

2.1.3. Reloj molecular en invertebrados

El reloj molecular de los invertebrados ha sido más estudiado en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En este organismo los genes responsables de la generación del ritmo son los elementos positivos *clock* (Clk, cuya activación es inducida por PDP1; Cyran et al., 2003) y *cycle* (Cyc), que traducen las proteínas dCLK dCYC, que heterodimerizan en el exterior del núcleo celular; este heterodímero se une al promotor de los genes *period* (*Per*) y *timeless* (*Tim*). Una vez que se ha dado la transcripción, el mRNA de estos genes se acumula en el citoplasma y se traduce en las proteínas dPER y dTIM, cuyo heterodímero entra al núcleo, donde durante la noche y en ausencia de luz (la cual es captada por el criptocromo o CRY; Fanjul Moles et al., 2004) TIM es degradado. Esto desestabiliza a PER y permite que este se una al complejo CLK/CYC, lo que detiene su actividad transcripcional (Cyran et al., 2003). PER es degradado al inicio de la fase luminosa y se reanuda la transcripción de Clk y Cyc, como se puede ver en la figura 3.

Las proteínas que constituyen el reloj molecular de un organismo regulan de manera directa o indirecta la transcripción de genes de salida, y tienen como productos de expresión el transcriptoma y proteoma circadiano presente en cada tejido.

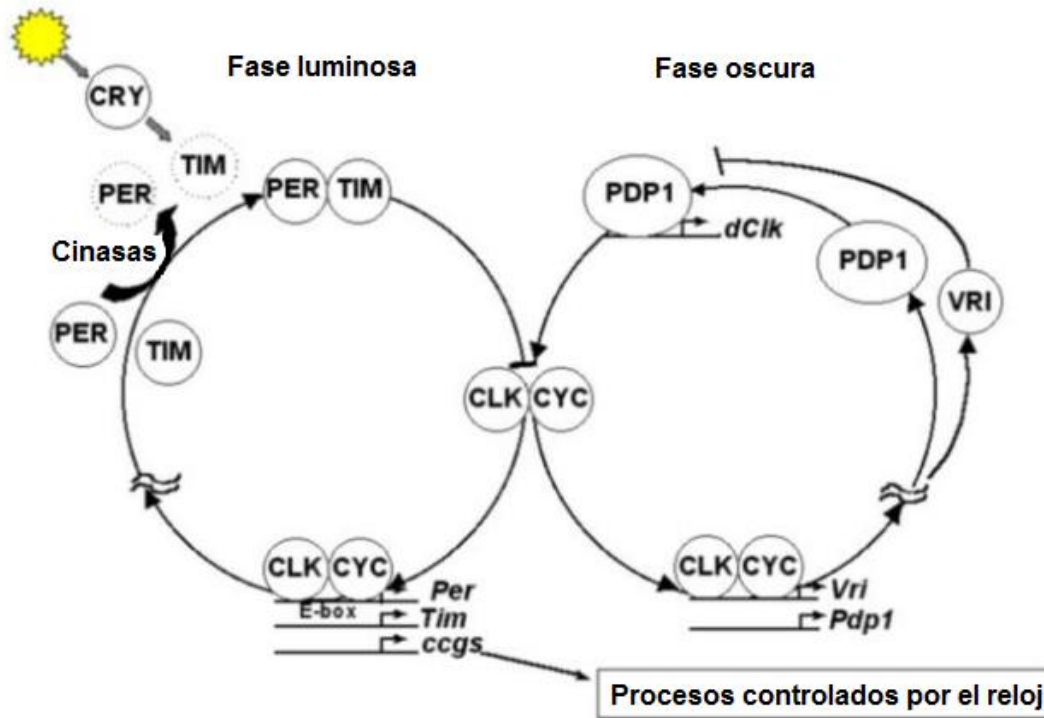


Figura 3. Modelo propuesto para el reloj molecular de *Drosophila melanogaster* (modificado de Paranjpe y Sharma, 2005).

Como puede observarse en la figura 3, las asas de retroalimentación del reloj molecular se ven afectadas por la entrada de la luz que permite la sincronización del reloj con un ciclo externo. Se ha reportado un funcionamiento y elementos de reloj similares en una variedad de organismos invertebrados, entre los que se encuentran los acociles (Escamilla Chimal et al., 2010).

2.2. *Procambarus clarkii*: generalidades

El acocil *Procambarus clarkii* (familia Cambaridae, orden Decapoda) es un crustáceo decápodo de agua dulce originario del sur de Estados Unidos (Liang et al., 2013). En condiciones naturales, *P. clarkii* habita en el interior de túneles a la orilla de cuerpos de agua dulce. Es de hábitos nocturnos y el fotoperiodo al que se encuentra expuesto varía estacionalmente de 13:11 a 16:8 horas de luz-oscuridad (LO), cuya intensidad de luz varía entre 0.13 mM/sec.m² durante el crepúsculo y 39.5 mM/sec.m² al mediodía (Fanjul Moles et al., 1998). Se desarrollan de forma óptima en ambientes con niveles de oxígeno superiores a 2 partes por millón (Huner y Barr, 1984).

Los principales órganos fotorreceptores de *P. clarkii* son dos ojos compuestos formados por subunidades llamadas omatidias, las cuales aumentan en tamaño y cantidad durante el desarrollo del organismo. Cada una de estas subunidades tiene cuatro elementos ópticos: el aparato dióptrico, cuya córnea está formada de cutícula transparente y cono cristalino que guía la luz hacia la retina, formado de cuatro células y rodeado de otras células que contienen el pigmento distal (Vogt, 2002); la retina, formada de ocho células retinulares, siete de las cuales presentan capas de microvellosidades orientadas hacia el interior de la omatidia, con lo que forman el rabdomo (la estructura que absorbe la luz); en estas microvellosidades se encuentran los pigmentos fotosensibles. La octava célula retinular se encuentra entre el cono cristalino y la parte superior del rabdomo; esta célula tiene su propio rabdomo (Hafner y Tokarski, 1998). El tercer elemento de la omatidia son las células tapetales, localizadas entre las células retinulares sobre la membrana basal; y el cuarto son los pigmentos distal y proximal, localizados en dos células que rodean el cono cristalino y en las células retinulares, respectivamente (Figura 4). Estos pigmentos aíslan a las omatidias al estar el acocil expuesto a luz de alta intensidad (Vogt, 2002). Los tallos oculares están unidos al ganglio supraesofágico por el lóbulo óptico, formado de *lámina ganglionaris*, *medulla externa*, *medulla interna*, *medulla terminalis*, el cuerpo hemielipsoidal y el nervio óptico (Fanjul Moles et al., 2004), como puede observarse en la figura 6. En el tallo ocular también se encuentra el complejo órgano X-glándula sinusal, la glándula principal del sistema endócrino del acocil. El órgano X es la estructura encargada de la síntesis de una variedad de hormonas, tales como la inhibidora de la muda, la hiperglucemiante de crustáceos, o la inhibidora de gónada o vitelogénesis (Vogt, 2002).

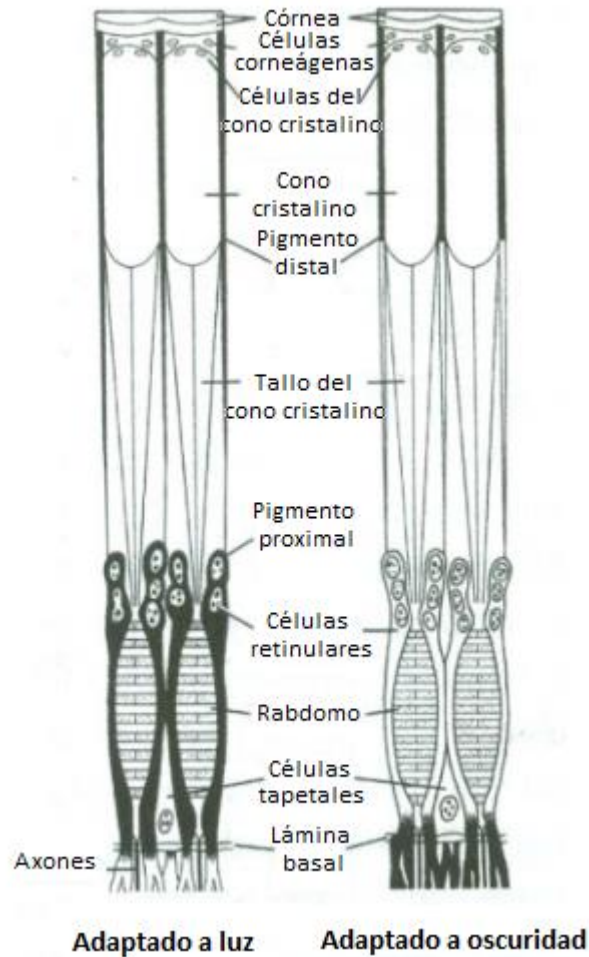


Figura 4. Corte longitudinal de omatidias del acocil *Astacus astacus* (modificado de Vogt, 2002).

El sistema nervioso de P. clarkii es ganglionar (Figura 5), de distribución idéntica al de todas las especies de acociles: seis ganglios abdominales, cinco torácicos, un ganglio subesofágico y uno supraesofágico, comúnmente llamado ganglio cerebroide (Figura 6). Los ganglios están unidos entre sí por conectores longitudinales y cubiertos por el perineuro, compuesto de fibras de colágeno (Vogt, 2002). Cada uno de estos ganglios está formado por dos elementos fusionados en una sola unidad; sólo pueden distinguirse como subunidades en cortes histológicos.

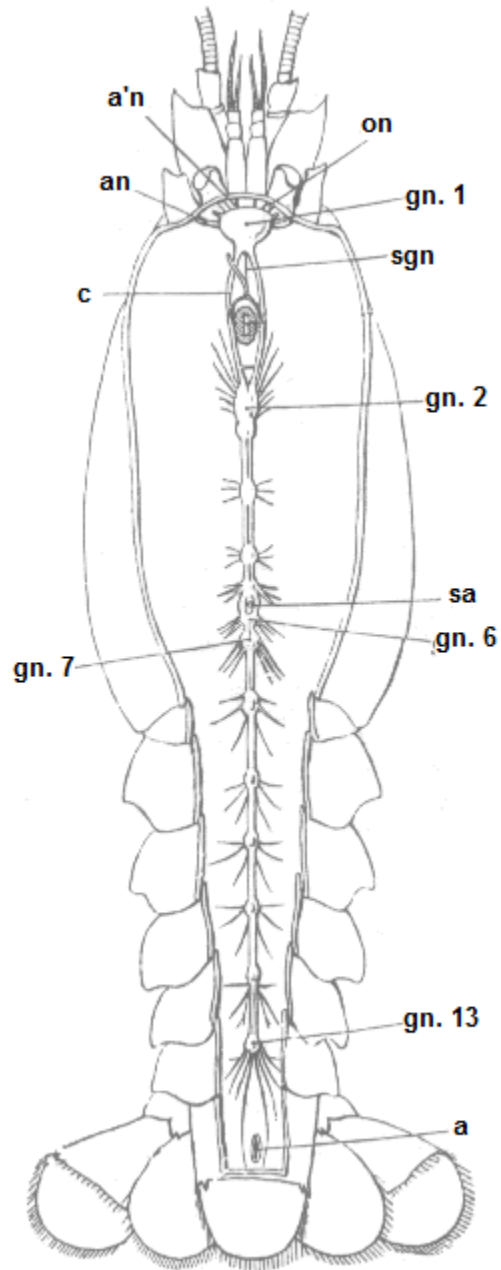


Figura 5. Vista dorsal del sistema nervioso del acocil *Astacus fluviatilis* (*Astacus astacus*); a, orificio caudal; an, nervio antenal; a'n, nervio antenalar; c, comisuras circumesofágicas; gn. 1, ganglio supraesofágico; gn. 2, ganglio subesofágico; gn. 6, quinto ganglio torácico; gn. 7, último ganglio torácico; gn. 13, último ganglio abdominal; on, nervio óptico; sa, arteria externa en sección transversal; sgn, nervio estomatogástrico (modificado de Huxley, 1880).

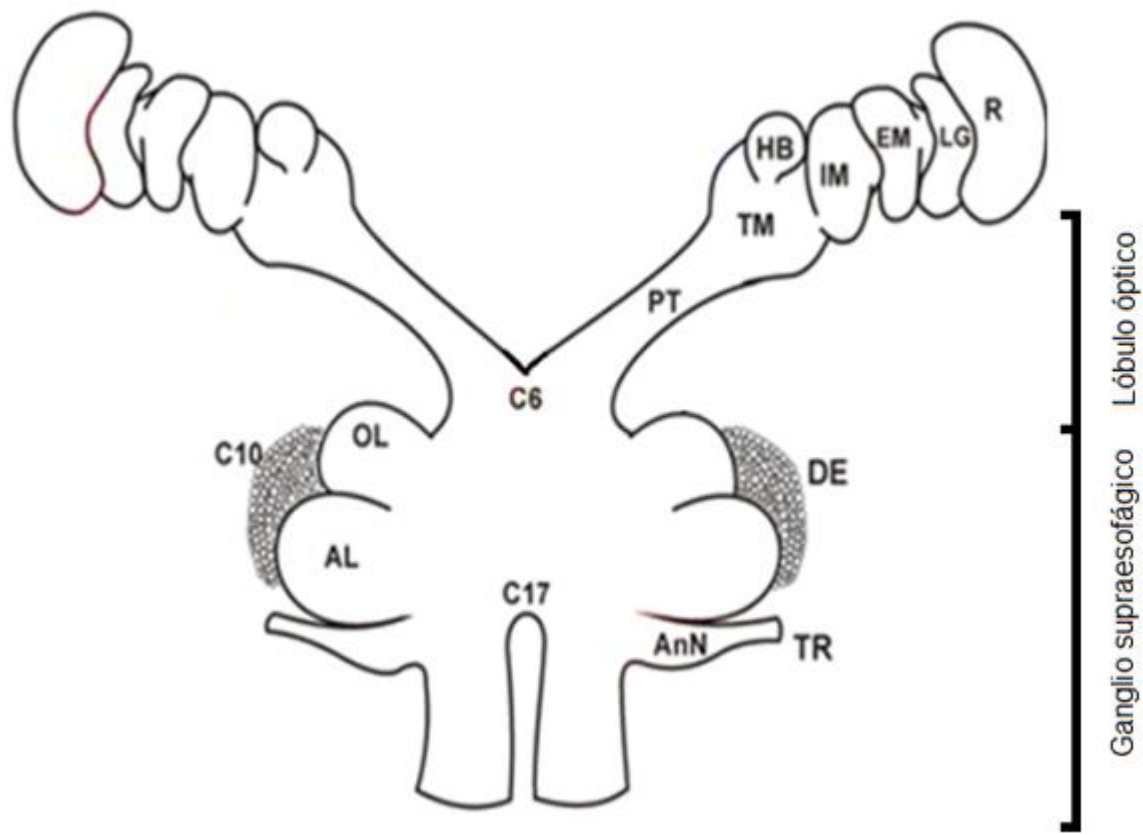


Figura 6. Esquema del ganglio supraesofágico y lóbulo óptico de *P. clarkii*. Se observa el tracto protocerebral (PT), cuerpo hemielipsoidal (HB), retina (R), médula terminal (TM), médula interna (IM), médula externa (EM), lámina ganglionaris (LG), deutocerebro (DE), lóbulo olfativo (OL), lóbulo accesorio (AL), tritocerebro (TR), neurópilo antenal (AnN), clústeres celulares 6 (C6), 10 (C10) y 17 (C17) (modificado de Escamilla Chimal et al., 2010).

El ganglio cerebroide o supraesofágico está dividido en tres secciones, el protocerebro, encargado del procesamiento de la información visual, de donde parten los nervios ópticos y que contiene los ganglios ópticos; el deutocerebro, que procesa la información sensorial de las antenas y presenta los lóbulos olfativo y accesorio y los neurópilos antenulares; y el tritocerebro, que integra la información recibida de los ganglios posteriores, con los que se conecta, y es donde se encuentran los neurópilos antenales (Homberg et al., 1989; Sandeman et al., 1992; Vogt, 2002; Meier et al., 2006). En contraste con otros decápodos, el lóbulo accesorio es la estructura de mayor tamaño en el ganglio cerebroide de los acociles. Los lóbulos olfatorio y accesorio están relacionados con el procesamiento e integración de la información sensorial (Schmidt, 1997), por lo que se ha relacionado

el tamaño del lóbulo accesorio con el cronotipo del acocil, dados sus hábitos nocturnos.

2.2.1. Ritmos en *Procambarus clarkii*

Se han descrito varios ritmos circadianos controlados por la función periódica del sistema nervioso en *Procambarus clarkii*, tales como la amplitud del electroretinograma en acociles (Fanjul Moles et al., 1992), la concentración de la proteína CRY (un pigmento que absorbe la luz azul y está ligado con la fotorrecepción del reloj molecular (Fanjul Moles, 2004) y de la actividad locomotora (Fanjul Moles et al., 1996). El estudio de estos ritmos biológicos ha permitido la determinación de distintas estructuras que, potencialmente, podrían actuar como los marcapasos del acocil (dado que no se ha comprobado su papel en la generación de ritmos, se les denomina marcapasos putativos), entre las que se encuentran el ganglio supraesofágico y el lóbulo óptico.

El aislamiento por extracción del ganglio supraesofágico genera comportamiento aperiódico (es decir, sin un periodo estable) en los ritmos del organismo (Page y Larimer, 1975); además, los fotorreceptores extrarretinales que participan en la sincronización se encuentran en esta estructura (Page y Larimer 1976). La ablación del tracto óptico produce pérdida de ritmicidad (Larimer y Smith, 1980). También se ha identificado tejido neuronal que contiene distintos relojes circadianos con interacciones complejas entre sí, que resultan en la generación de ritmicidad. Se ha observado actividad circadiana de las proteínas de reloj (traducidas a partir de los genes reloj) en el citoplasma y núcleo de células encontradas dentro del ganglio supraesofágico, la retina y el lóbulo óptico. El hecho de que la presencia de estas proteínas sea dependiente del tiempo sugiere interacciones entre elementos positivos y negativos del reloj molecular similares a las establecidas en otros seres vivos (Escamilla Chimal et al., 2010) y reguladas por las condiciones particulares en que habita el organismo, dado que el funcionamiento del reloj molecular está muy conservado en todos los organismos estudiados. Otro motivo de interés en el estudio de este organismo es su alta resistencia al estrés ambiental, potencialmente relacionada con factores cronobiológicos.

2.2.2. *Procambarus clarkii* y estrés ambiental

Estudios que comparan a *P. clarkii* con especies filogenéticamente cercanas de acociles, muestran tolerancia y tasa de supervivencia mucho más elevada ante el estrés ambiental (Liang et al., 2013). Esta tolerancia, además de factores como su rápida maduración y alta tasa reproductiva (Lindqvist y Huner, 1999), le permite invadir ecosistemas tanto aerobios como anaerobios y reemplazar a especies endémicas. Se ha observado que, ante condiciones ambientales poco favorables (tales como fotoperiodos extremos y alta temperatura ambiental en que habita este organismo), *P. clarkii* entra en estado de quiescencia, esto es, la reducción del movimiento general. Este proceso incluye el decremento en la actividad de los escafnatitos, estructuras con forma de pala que oscilan en canales conectados a las cámaras branquiales. La oscilación de los escafnatitos conduce el agua desde las cámaras branquiales hacia el exterior, de modo que crean baja presión en la cámara branquial que hace entrar al agua hacia las branquias, lo que permite el intercambio gaseoso (McMahon, 2002), por lo que la reducción en su actividad conlleva el decremento en el consumo de oxígeno; este mecanismo hace que el acocil presente estado interno de hipoxia (Fanjul Moles et al., 1998). En este estado, la hormona hiperglucemiante de crustáceos (*crustacean hyperglycemic hormone*, CHH, por sus siglas en inglés) libera glucosa que actúa como sustrato para la glicólisis y la síntesis de lactato; el resultado es que el organismo cambia su metabolismo aeróbico por anaeróbico. Esto fue observado en la langosta *Homarus americanus*, en la que el funcionamiento de la hormona es similar (Chang et al., 1998). Otro elemento involucrado en la resistencia del organismo a las condiciones cambiantes del medio ambiente son las proteínas de choque térmico.

2.3. Proteínas de Choque Térmico (HSP70)

Las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*; HSP, por sus siglas en inglés) son una familia de proteínas monoméricas conservadas evolutivamente cuyo papel en la respuesta molecular del organismo al estrés es de gran importancia (Shaner y Morano, 2007). Estas proteínas actúan en el citosol (Multhoff, 2007) como chaperonas moleculares, donde asisten en la síntesis y plegamiento de otras proteínas, así como en la degradación de proteínas inestables o mal plegadas. Las proteínas de choque térmico se agrupan por su peso molecular en 6 familias, la familia de HSP70 (de entre 66 a 78 kDa de peso) es una de las más abundantes y mejor conservadas (Liang et al., 2013), las HSP70s de procariontes y eucariontes

son estructuralmente homólogas (Sharma y Masison, 2009) y presentan al menos 50% de identidad de aminoácidos (Kampinga y Craig, 2010).

Las proteínas de la familia de HSP70 no sólo se encuentran en el citosol, sino en casi todos los compartimentos celulares. La proteína HSP70 está compuesta de dos dominios funcionales, el primero de los cuales es el NBD o dominio de unión al nucleótido (nucleotide binding domain; también llamado ABD o ATP-binding domain; Flaherty et al., 1991), con peso aproximado de 44 kDa; este dominio está encargado de unir e hidrolizar ATP. El segundo es conocido como dominio de unión al sustrato (*substrate binding domain*, SBD, por sus siglas en inglés), que tiene un peso de 28 kDa y cumple la función de unir a polipéptidos (Zhu et al., 1996).

Además de las funciones comunes a todas las HSP, las proteínas de la familia de HSP70 defienden a la célula de forma independiente a su actividad de chaperonas. Las HSP70s suprimen la actividad de las quinasas c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal kinases*, JNK, por sus siglas en inglés; Gabai et al., 1998), un grupo de kinasas que responden a condiciones de estrés y están involucradas en la cadena apoptótica (Gabai et al., 1997). Si bien se ha observado que al incrementarse la concentración de HSP70 debido a estrés se evita la muerte celular en mayor medida, se desconoce si la expresión de esta proteína varía en respuesta a la activación de la cadena apoptótica.

Estudios realizados en *P. clarkii* han permitido determinar que el estado de hipoxia inducido por condiciones poco favorables en el ambiente del acocil es acompañado por la expresión del factor inducible de hipoxia 1 (*hypoxia inducible factor 1*, HIF-1, por sus siglas en inglés; Velázquez Amado et al., 2012). Este factor está compuesto por dos subunidades, alfa y beta; mientras que la subunidad beta es constitutiva, la subunidad alfa sólo puede mantenerse y unirse a la subunidad beta en condiciones de hipoxia (Wang et al., 1995). Una vez que las dos subunidades han dimerizado, HIF-1 regula de forma positiva la transcripción de HSF (Baird et al., 2006). HSP70 puede entonces unirse a HIF-1 y HSP40; este complejo es responsable de reclutar al CHIP (carboxilo terminal de la proteína que interactúa con HSP70), que promueve la poliubiquitinación del HIF-1 α para que sea degradada (Velázquez Amado et al., 2012). Se ha propuesto que HIF-1 podría actuar como vínculo entre la concentración de oxígeno en el medio celular y el reloj molecular (Adamovich et al., 2016), por lo que podría ser esta asa la que permite que HSP70 responda al estrés ambiental. El asa de retroalimentación formada por HSP70 y HIF-1 se muestra en la figura 7.

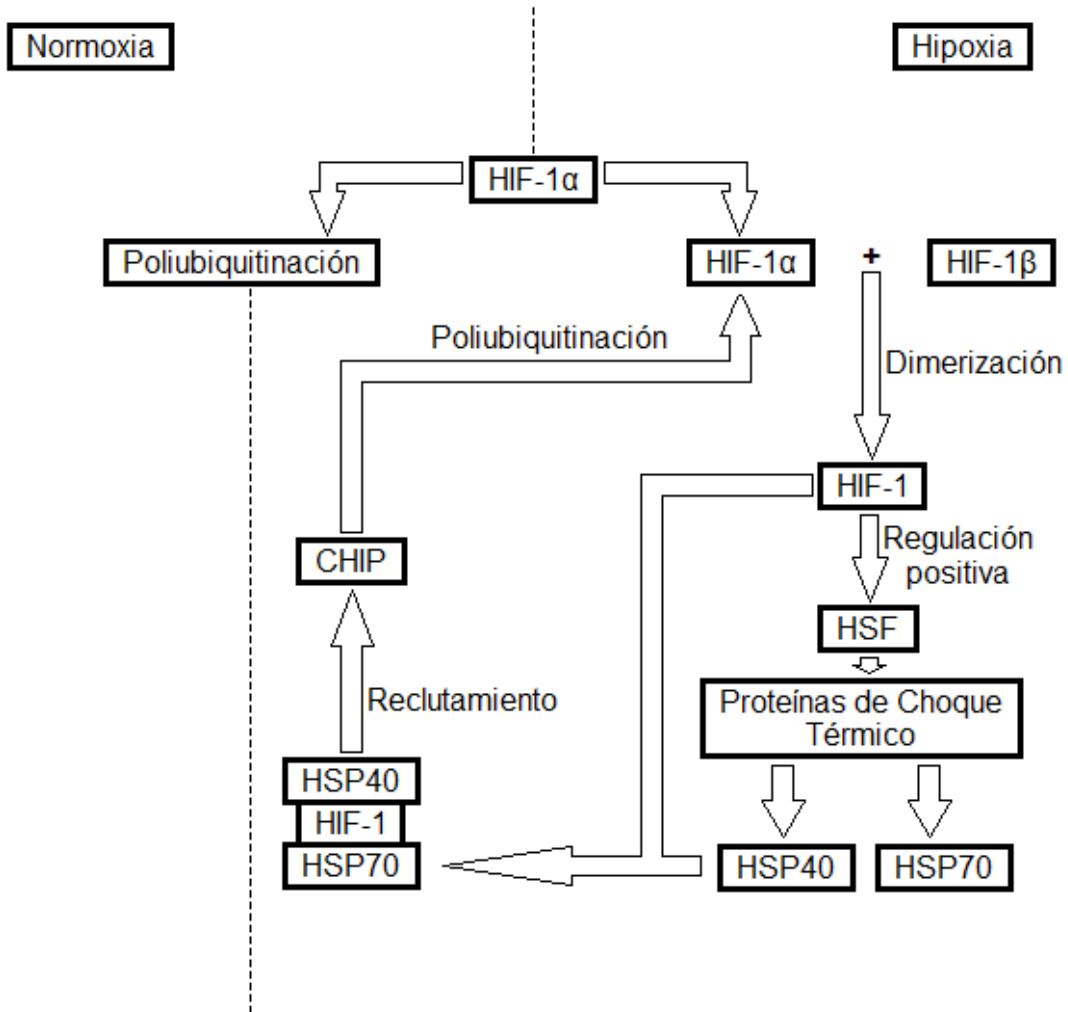


Figura 7. Asa de retroalimentación negativa de HSP70 y HIF-1 en condiciones de normoxia (izquierda) e hipoxia (derecha).

Dada la conservación tanto en estructura como función de HSP70, es posible obtener resultados representativos de su funcionamiento en una variedad de organismos. La existencia de ritmicidad diaria de HSP70 ya ha sido observada en el molusco poliplacóforo *Acanthopleura granulata*, pero no se ha comprobado que este ritmo sea de carácter endógeno (Schill et al., 2002). Además, se ha visto ritmicidad circadiana notable en la unión al DNA del Factor de Choque Térmico 1 (*heat shock factor*, HSF1, por sus siglas en inglés) en ratones, donde HSF1 inicia la expresión de proteínas de choque térmico al llegar la noche, que es cuando inicia el periodo de actividad de estos organismos. Para comprobar esto, se comparó el periodo de actividad en libre corrimiento de ratones *wild type* con el de ratones deficientes en HSF1; el periodo de los ratones deficientes en HSF1 fue mayor al

observado en ratones *wild type*, por lo que se sugirió que HSF1 participa en la conservación de los ritmos circadianos de este animal (Reinke et al., 2008). La conservación de HSP70 significa que los resultados obtenidos en estos organismos es representativa del funcionamiento de esta proteína. Los resultados de estos estudios señalan la posibilidad de ritmicidad en la actividad de HSP70, así como una posible relación entre los hábitos diurnos o nocturnos del animal con la expresión de esta proteína y un posible vínculo entre esta proteína y el reloj molecular del organismo.

3. Planteamiento y justificación

A pesar de los estudios que se han realizado referentes a HSP70 (Gabai et al., 1997; Gabai et al., 1998; Kim et al., 2003; Sharma y Masison, 2009; Kampinga y Craig, 2010; Liang et al., 2013), aún quedan por explorar aspectos relacionados con la ritmicidad de esta proteína. Al ser HSP70 una proteína que responde al estrés ambiental (Gabai et al., 1997), la ritmicidad circadiana en su concentración otorgaría ventaja adaptativa al organismo. Los resultados obtenidos en *A. granulata* indican la existencia de un ritmo diario en la concentración de HSP70 (Schill et al., 2002), pero no se ha comprobado la presencia de este ritmo en *P. clarkii*, así como tampoco se ha comprobado el carácter endógeno del ritmo de esta proteína. Dado que *P. clarkii* es un organismo particularmente resistente al estrés ambiental (Liang et al., 2013), es tema de interés el determinar los mecanismos que dan origen a esta resistencia. Si las variaciones en la concentración de HSP70 son, en efecto, derivadas de un ritmo circadiano y se presentan en una estructura considerada como marcapasos putativo, podría entonces estudiarse el papel propuesto de HSP70 en la conservación y mantenimiento de la ritmicidad circadiana en *P. clarkii* (Velázquez Amado et al., 2012).

4. Hipótesis

Si las variaciones en la concentración de la proteína HSP70 en el ganglio supraesofágico de *P. clarkii* presentan un ciclo aproximado de 24 horas y estas se mantienen en condiciones constantes, entonces podrá considerarse que esta proteína presenta un ritmo circadiano.

5. Objetivos

Objetivo general:

Determinar si la concentración de HSP70 en el ganglio supraesofágico de *P. clarkii* presenta variaciones circadianas en el acicil *P. clarkii*.

Objetivos particulares:

Determinar si las variaciones diarias en la concentración de HSP70 presentan periodos cercanos a las 24 horas.

Determinar si los cambios diarios de HSP70 son de carácter endógeno o si se trata de un ritmo diario.

6. Material y Método

6.1. Organismos utilizados

Se utilizaron 36 ejemplares adultos de acociles *Procambarus clarkii* de un año de edad y en etapa de intermuda colectados en Río Conchos, Chihuahua; no se hizo distinción entre sexos, dado que no se han realizado estudios que busquen diferencias entre sexos en la expresión de HSP70. Los organismos fueron colocados en condiciones de laboratorio en acuarios de 69 por 36.5 cm (cada uno de los cuáles puede contener 11 acociles a la vez) con sustrato de piedra y con temperatura de 20 ± 1 °C (similar a la que se ven expuestos en su medio ambiente), alimentados *ad libitum* con camaronina tres veces por semana. Se utilizó luz de intensidad equivalente a la que se presenta en condiciones naturales, esto es, 2 MW/m². Cada acuario contó con tubos de PVC para proveer refugio a los acociles y agua hasta una altura de 5 cm sobre el sustrato. La aireación fue proporcionada por una bomba de aire.

6.2. Diseño experimental

Los acociles fueron separados en 2 grupos experimentales y mantenidos en acuarios con ciclos de 12 horas de luz (L) y 12 horas de oscuridad (O) (LO 12:12). El grupo de acociles sometidos al primer tratamiento (fotoperiodo LO 12:12) estuvieron 15 días en estas condiciones, mientras que los acociles del segundo tratamiento se colocaron en condiciones de oscuridad constante por 72 horas al término de los 15 días iniciales. El periodo de oscuridad constante permite determinar si hay ritmicidad independiente de un sincronizador externo (la luz) sin presentar un efecto negativo en la maquinaria celular del organismo, a diferencia de condiciones de luz constante. Posterior a cada tratamiento, se eligieron aleatoriamente 3 individuos por cada punto temporal: tiempo del *zeitgeber* (*zeitgeber time*, ZT, por sus siglas en inglés) 0, 4, 8, 12, 16 y 20 (para las condiciones LO) o tiempo circadiano (*circadian time*, CT, por sus siglas en inglés; dado por la ritmicidad interna del organismo en ausencia de sincronizador externo) para los organismos en oscuridad constante, como se observa en la figura 8. El horario de encendido de las luces (ZT0) fue a las 7:00 am; se eligieron 3 individuos en los mismos horarios que en el tratamiento de LO 12:12. Los individuos seleccionados fueron anestesiados en frío durante 30 minutos y sacrificados por decapitación para

extraer el ganglio supraesofágico, que fue homogeneizado con 100 μ l de PBS ajustado a pH 7.4. El homogenado fue después centrifugado a 15,000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se almacenó el sobrenadante en nitrógeno líquido; se desechó el botón. Se realizó la determinación de proteínas por el método de Bradford (1976) para obtener los microlitros (μ l) de muestra que se necesita utilizar para tener 40 μ g de proteínas totales, que fueron utilizados para realizar la técnica de Western Blot.



Figura 8. Protocolo del experimento. Se indican los dos grupos experimentales, representados por medio de barras con horas de luz (rectángulos blancos) y oscuridad (rectángulos negros). El horario de los sacrificios está representado por rectángulos rayados.

6.3. Determinación de Proteínas por método de Bradford

La curva estándar (volumen final de 15 μ l por pozo) se realizó en microplaca de poliestireno de 96 pozos con NaCl 0.15 M y BSA 1mg/ml ajustado a absorbancia de 0.333. Se colocaron 0.5 μ l de muestra y 14.5 μ l de NaCl 0.15 M en cada uno de los pozos y se agregaron 200 μ l de reactivo de Bradford (marca BioRad) diluido 1:4 a cada pozo. Se incubó la placa durante 25 minutos en agitación y se midió la absorbancia de las muestras en lector de placas con longitud de onda de 595 nm (modelo ELx800 de la marca BioTek), que fue comparada con la curva estándar. Por medio de la densidad óptica obtenida y la cantidad de μ l de muestra utilizados se calcularon las proteínas totales de la muestra. En los casos en que la densidad óptica de la muestra quedó fuera de la curva estándar, se calculó la proteína total a partir de 0.3 μ l de muestra (promedio de lo utilizado en otras muestras).

6.4. Cuantificación de HSP70 por Western Blot

La técnica del Western Blot utiliza anticuerpos para identificar y cuantificar proteínas específicas contenidas en cada muestra, separadas en bandas por su peso molecular. El protocolo seguido se detalla a continuación.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Para separar las proteínas contenidas en la muestra se preparó un gel de poliacrilamida al 10%; el gel está dividido en dos secciones de diferente pH, la superior donde la muestra es compactada y el inferior, donde finalmente se separa por su peso molecular. En este gel se cargaron los μl requeridos para cada muestra (calculados a partir de los resultados de la cuantificación de proteínas) con amortiguador de muestra en proporción 1:1 en cada pozo del gel (formados por medio de un peine, con un total de 10 dientes que forman el pozo durante la polimerización del gel), además de 5 μl de un marcador de peso molecular (Prestained Protein Marker, NIPPON Genetics) en el primer carril. Se aplicó al gel corriente de 80 voltios (mediante cámara ENDURO de Labnet International Inc.) durante aproximadamente 20 minutos para permitir que la muestra se desplace verticalmente hacia el gel inferior. En este momento se aumentó el voltaje a 100 voltios (V) durante una hora, hasta que las bandas del marcador de peso molecular fueron claramente distinguibles en el gel (como puede observarse en la figura 9).

Electrotransferencia

Para permitir la identificación y cuantificación de la proteína de interés fue necesario transferir las proteínas de la muestra a un medio en el que fuera posible la interacción de dicha proteína con anticuerpo específico; en este caso se utilizó una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). El gel y la membrana de PVDF (sumergida previamente en metanol para activarla y permitir la unión de proteínas a su superficie) se humedecieron en amortiguador de transferencia para facilitar la elución de proteínas del gel y su adhesión a la membrana de PVDF. Estos fueron colocados cuidadosamente uno sobre otro entre dos esponjas, las cuales fueron humedecidas previamente con el mismo amortiguador y aplanadas con un rodillo para quitar las burbujas; al colocar el gel y la membrana juntos y aplicar corriente eléctrica se permite la transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana. Se colocaron en una cámara de transferencia semi-seca (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, de BioRad) con el gel posicionado hacia el cátodo y se

dejaron correr las proteínas por treinta y cinco minutos a 30 V.

Una vez terminada la electrotransferencia la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau (marca BioRad) para confirmar la presencia de proteínas en ésta, al mismo tiempo que se tiñó el gel con azul de Coomassie para confirmar que no quedaban restos de las bandas de proteína en éste. La membrana se lavó con PBS para desteñirla y se bloqueó con albúmina y BSA diluidos al 3% en PBS (pH 7.4) durante 18 horas a 1° C, para evitar la unión inespecífica de proteínas.

Incubación

Después del bloqueo, la membrana se colocó en un recipiente con PBS-Tween 0.05% en el cual se diluyó el anticuerpo primario (cabra anti-HSP70, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) en una dilución 1:1000. Se incubó en agitación por una hora para permitir la unión del anticuerpo a la proteína de interés, se realizaron tres lavados con PBS (pH 7.4) de diez minutos cada uno. A continuación, se realizó la incubación del anticuerpo secundario (burro anti-cabra conjugado con HRP, Abcam, Cambridge, MA) en dilución 1:10000 en Albúmina 1% con Tween 0.05%, seguida de dos lavados en PBS-Tween 0.05% de 15 minutos cada uno. Se usaron estos anticuerpos debido a que su utilidad en sujetos de estudio invertebrados ya había sido observada en Velázquez Amado et al., 2012, y debido a que en nuestro laboratorio se realizaron pruebas con péptido control para confirmar su efectividad y especificidad.

Paralelo a la detección de HSP70 se realizó el mismo proceso para Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH, una enzima de expresión constitutiva involucrada en la glucólisis, usada como control de carga. Esto se realizó con anticuerpo anti-GAPDH generado en conejo (Abcam, Cambridge, MA) diluido 1:1000 y anticuerpo secundario cabra anti-conejo (conjugado con HRP) diluido 1:10000.

Revelado

Para revelar y fotografiar la señal dada por los anticuerpos unidos a la proteína de interés se humedeció la membrana con sustrato de peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés; Luminata Crescendo Western HRP substrate, de Millipore) y se colocó la membrana en un cassette para evitar su exposición a la luz durante su transporte a un fotodocumentador Universal Hood III de BioRad, en el cual se capturaron las imágenes utilizadas. La imagen obtenida fue procesada con el software ImageJ para cuantificar la densidad de las bandas en cada carril. En total

se procesaron 6 muestras por cada ZT para LO; en los acociles sometidos a 72 horas de oscuridad constante, en ninguno de los experimentos realizados fue posible detectar HSP70. Para el análisis estadístico siguiente se utilizó la abundancia relativa de HSP70, es decir, la concentración de HSP70 fue normalizada a partir de la concentración de la proteína de control, GAPDH.

6.5. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los resultados se utilizó el promedio de la abundancia relativa de HSP70 de las seis réplicas obtenidas para cada punto temporal. Se utilizó ANOVA de una vía para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los puntos temporales. Para determinar qué puntos temporales presentaban diferencias, se usó la prueba *post hoc* de Tukey, ya que permite comparar todos los grupos entre sí para encontrar cuáles son los que presentan las diferencias significativas señaladas en el ANOVA. Esto se realizó por medio del software SPSS Statistics y los resultados fueron graficados en SigmaPlot. Para determinar si existían variaciones diarias en la concentración de HSP70 se utilizó el programa de Cosinor (Vega, 1993).

7. Resultados

El control realizado sobre la membrana de PVDF (figura 9) revela la presencia de proteína en ésta, por lo que se considera que el protocolo de transferencia de proteínas es adecuado. En la figura 10 se observa el resultado de la incubación realizada de anticuerpos para HSP70; este resultado confirma el correcto funcionamiento de los anticuerpos utilizados. La gráfica generada a partir de los resultados de cada punto temporal se muestra en la figura 13.

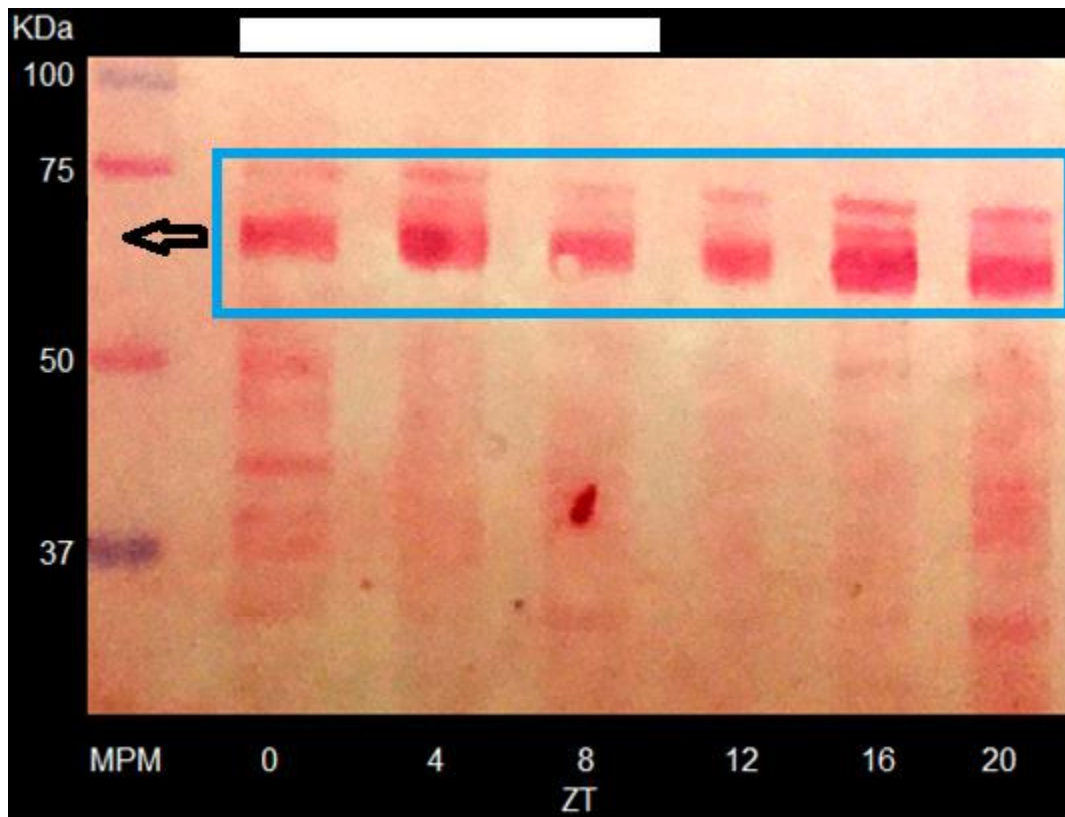


Figura 9. Membrana de PVDF con muestras de ganglio supraesofágico de acociles expuestos al ciclo de luz-oscuridad 12:12, teñida con rojo de Ponceau. Se observan los carriles correspondientes a cada uno de los puntos temporales analizados (ZT0 – ZT20) y al marcador de peso molecular (MPM). Se indican las bandas de proteína con el peso de HSP70, 70 kDa (recuadro azul). La flecha negra marca la posición de los 70 kDa en el marcador. En la parte superior de la figura se representan las horas de luz (rectángulos blancos) y oscuridad (rectángulos negros) a los que se expuso a *P. clarkii*.

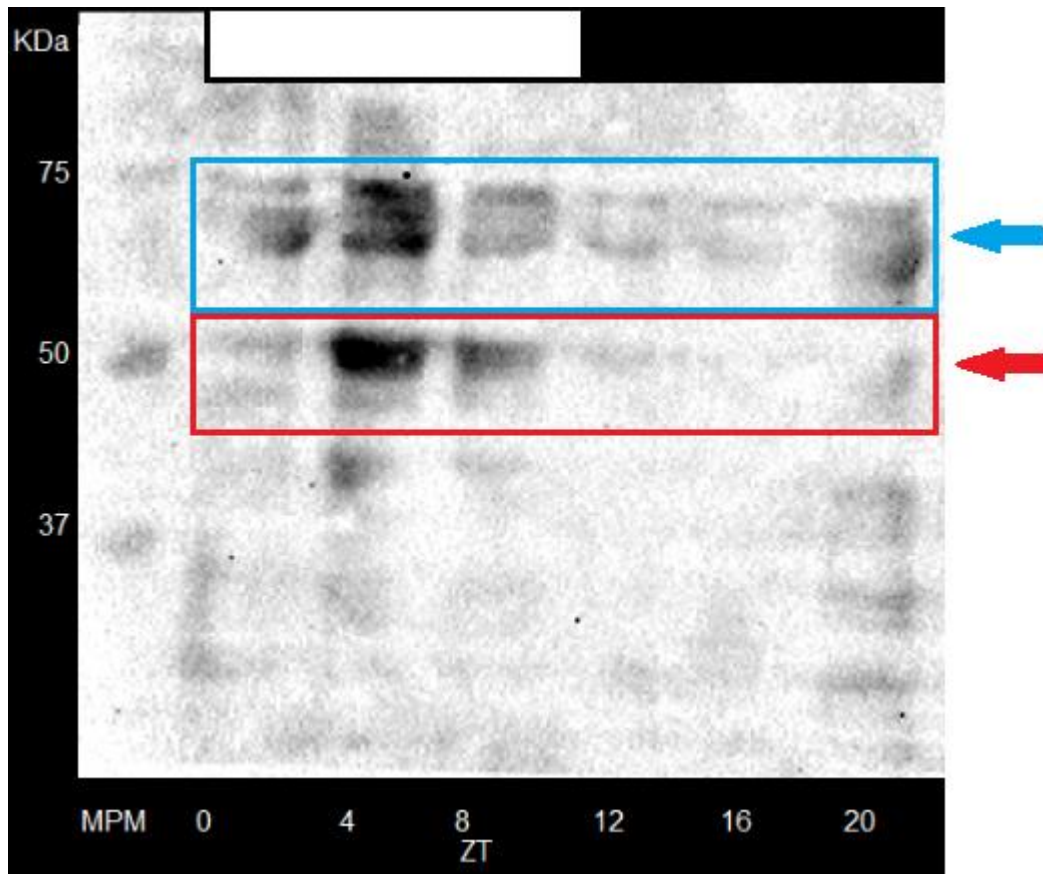


Figura 10. Membrana obtenida a partir de muestras de ganglio supraesofágico de acociles expuestos a un ciclo de luz-oscuridad 12:12, incubada con anticuerpo anti-HSP70. Se observan los carriles correspondientes a cada uno de los puntos temporales analizados (ZT0 – ZT20) y al marcador de peso molecular (MPM). En la figura se señalan las bandas de HSP70 (recuadro azul) y las bandas de GAPDH (recuadro rojo). En la parte superior de la figura se representan las horas de luz (rectángulos blancos) y oscuridad (rectángulos negros) a los que se expuso a *P. clarkii*.

Se detectó la presencia tanto de HSP70 (con un peso de 70 kDa) como de GAPDH (peso reportado de 37 kDa, en contraste con lo observado en nuestras membranas) en las muestras obtenidas durante el tratamiento de luz-oscuridad 12:12, por lo que se pudo determinar la concentración relativa de HSP70 (comprada con la proteína de control GAPDH). En las muestras de animales expuestos a tres días de oscuridad no fue posible obtener bandas de HSP70, pero sí de GAPDH (figura 11). Debido a que se realizaron controles durante el proceso para confirmar la presencia de proteína total (es decir, contenido de todas las proteínas presentes en la muestra; figura 12), esto muestra que en los organismos sometidos a tres días de oscuridad constante se inhibió la síntesis de HSP70 lo suficiente para no dar señal detectable por el método utilizado.

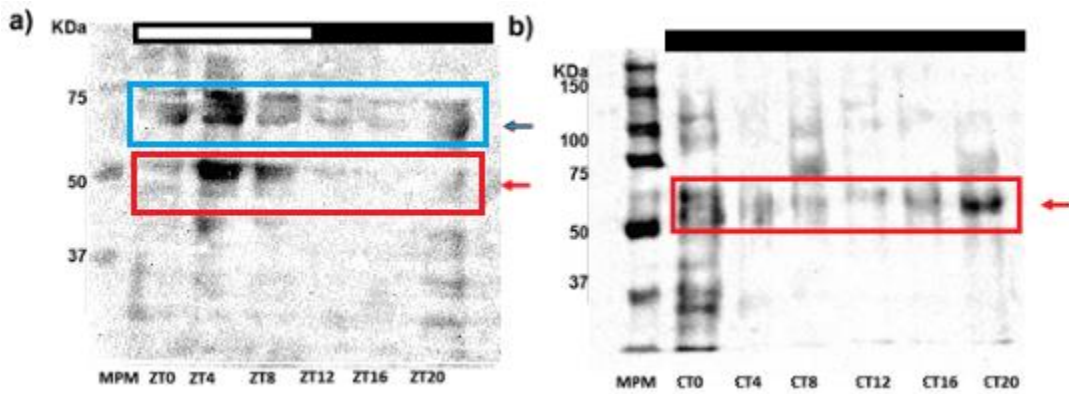


Figura 11. Imágenes obtenidas de las membranas reveladas para muestras de ganglio supraesofágico en LO 12:12 (a) y oscuridad constante (b). Las membranas mostradas fueron incubadas con anticuerpo primario y secundario para HSP70 y GAPDH. En la figura se señalan en las bandas de HSP70 (recuadro azul) y las bandas de GAPDH (recuadro rojo). En la parte superior de la figura se representan las horas de luz (rectángulos blancos) y oscuridad (rectángulos negros) a los que se expuso a *P. clarkii*.

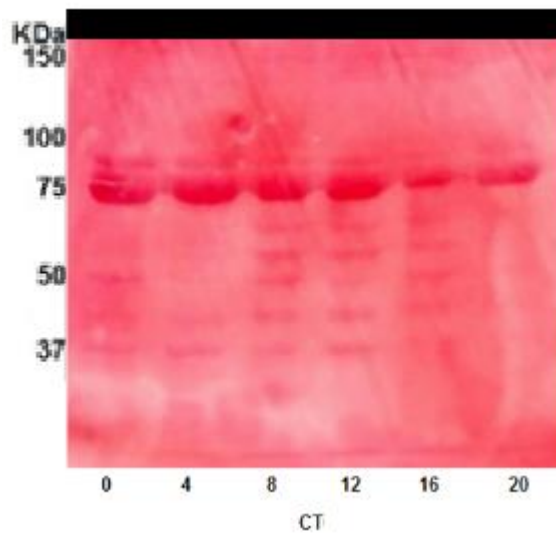


Figura 12. Membrana de PVDF con muestras correspondientes a cada CT, sometida a tinción con Rojo de Ponceau. En la parte superior de la figura se representan las horas de oscuridad (rectángulo negro) a que se expuso a *P. clarkii*.

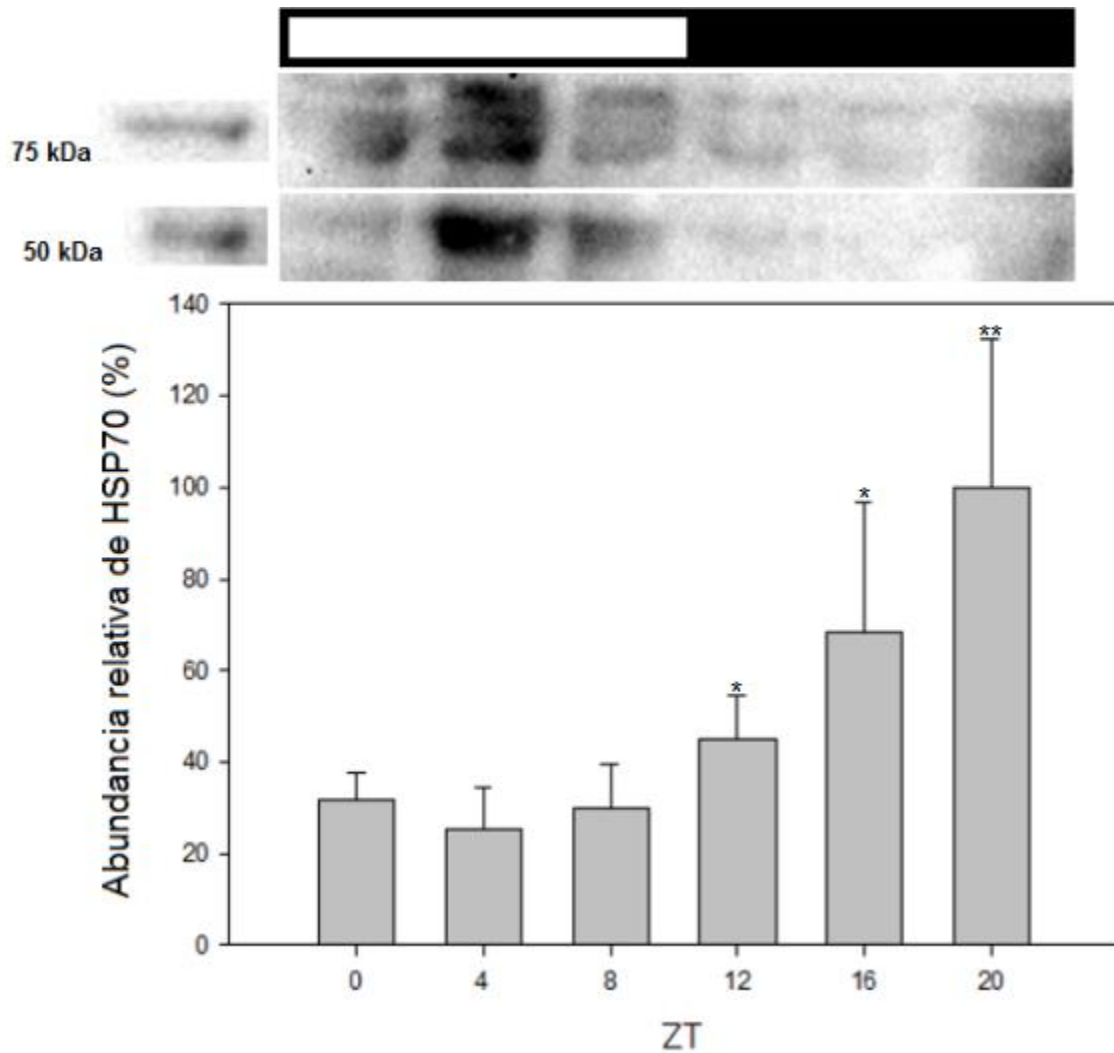


Figura 13. Gráfica que muestra el promedio (número de membranas n=6) de la concentración relativa de HSP70 en porcentaje en las muestras obtenidas en ganglio supraesofágico en ciclo LO 12:12. El eje X se corresponde con el ZT o punto temporal en que se tomó la muestra; el eje Y representa la densidad de las bandas en píxeles por unidad de área. En la parte superior se muestran las bandas obtenidas del Western Blot para HSP70 (arriba) y GAPDH (abajo; proteína de control) en ganglio supraesofágico, cada una junto a la banda correspondiente a 75 kDa y 50 kDa en el Marcador de Peso Molecular. Los datos muestran el promedio con la desviación estándar. En la parte superior de la figura se representan las horas de luz (rectángulos blancos) y oscuridad (rectángulos negros) a los que se expuso a *P. clarkii*. Los asteriscos indican los grupos que presentan diferencias significativas con respecto a los demás, determinado por medio de prueba de Tukey.

7.1. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el programa SPSS Statistics muestran significancia mayor a 0.05. Esto permite rechazar la hipótesis nula (es decir, que no existen diferencias significativas en la varianza de los grupos), por lo que se considera que existen diferencias significativas entre los promedios de los valores obtenidos en cada ZT. La prueba de Tukey indica tres subconjuntos, el primero formado por los ZT 0, 4, 8 y 12, el segundo por los ZT 12 y 24 y el tercero por el ZT 20 (figura 14). Estos tres subconjuntos presentan diferencias significativas entre ellos.

ANOVA

Proteína					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1562458.557	5	312491.711	2.315	.068
Dentro de grupos	4049083.953	30	134969.465		
Total	5611542.510	35			

HSD Tukey^a

ZT	N	Subconjunto para alfa = .95		
		1	2	3
4	6	199.7156		
8	6	233.6979		
0	6	249.0166		
12	6	354.4773	354.4773	
16	6		535.7677	
20	6			786.7972
Sig.		.977	.954	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

Figura 14. Tablas de resultados de ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey.

7.2. Ritmicidad de HSP70

Para los datos de LO, por medio de Cosinor se pudo detectar un ritmo en la concentración de HSP70 con $p=0.020474$, periodo de 26.0 horas y robustez del 92.3%. La acrofase del ritmo ocurre a los -182° , es decir, alrededor de 11.87 horas después del inicio de la fotofase.

No se obtuvieron resultados para las condiciones de oscuridad constante. No obstante, los resultados en fotoperiodo LO 12:12 confirman la presencia de un ritmo diario.

8. Discusión

A partir de los datos obtenidos de 6 puntos temporales a lo largo del día se determinó la presencia de variaciones diarias en la concentración de la proteína HSP70 en el ganglio supraesofágico de *P. clarkii* en un ciclo de luz-oscuridad 12:12, con incremento en la concentración de esta proteína durante la escotofase (fase de oscuridad del fotoperiodo), la fase en que el animal se encuentra activo. Como puede observarse en la figura 13, hay una mayor concentración de HSP70 en el ZT20, cercano al final de la noche; la menor concentración de proteína se encontró durante el ZT8, cercano al final de la fotofase, es decir, en el ZT12. En contraste con los resultados de estudios previos reportados por Velázquez Amado y colaboradores (Velázquez-Amado et al., 2012) donde las bandas de GAPDH presentaron peso molecular de 37 kDa, nuestras membranas presentaron señal para el anticuerpo anti-GAPDH cerca de los 50 kDa de forma consistente (figuras 10 y 11). Esto pudo deberse a que la densidad del gel utilizado no permitió una correcta separación de las distintas bandas de proteína para el tamaño de cassette utilizado en la electroforesis.

Los resultados concuerdan con los obtenidos por Schill et al. (2002) y Velázquez Amado et al., (2012), dado que aquí reportamos mayor concentración de HSP70 en ZT20 con respecto a ZT8 en el ganglio supraesofágico; la concentración de HSP70 no ha sido medida previamente en esta estructura por separado. Estos resultados reflejan la actividad de HSF1, que regula positivamente las proteínas de choque térmico al inicio de la fase de actividad del animal, ya que el estrés oxidativo (medido por especies reactivas de oxígeno) se ve aumentado en esa fase (Velázquez Amado et al., 2012). Los resultados del presente estudio muestran el mismo incremento en la concentración de HSP70 en los puntos temporales durante la fase de actividad del organismo. Así mismo, los resultados también se asemejan a los niveles absolutos de HSP70 obtenidos en el tracto intestinal de *A. granulata* (Schill et al., 2002), que se elevan durante la escotofase; esto podría indicar una conservación de la posible actividad cíclica de esta proteína. En el estudio mencionado anteriormente, así como en los resultados de este estudio, la elevación en la concentración de HSP70 se corresponde con el horario de alimentación del organismo; esto sugiere un posible papel de la actividad del organismo en la concentración de HSP70.

Por medio del análisis de Cosinor se determinó que las variaciones detectadas en la concentración de HSP70 presentan ritmicidad. Esto concuerda con estudios previos donde se ha observado ritmicidad diaria en los niveles de esta proteína en *A. granulata* (Schill et al., 2002). En cambio, los resultados de Western Blot de

muestras obtenidas de animales expuestos a oscuridad constante por 72 horas no presentaron bandas de HSP70 detectables con el protocolo utilizado, por lo que se plantea que los cambios en la concentración de HSP70 se deben o a un ritmo endógeno sino a la respuesta a factores ambientales.

Debido a que la presencia de proteínas en las muestras de oscuridad constante fue comprobada en dos puntos distintos del proceso (por medio de tinción del gel con azul de Coomassie y tinción de la membrana con rojo de Ponceau (mostrado en la figura 12), además de la presencia de GAPDH como control en las membranas ya reveladas, consideramos que la ausencia de HSP70 se debe al tratamiento de oscuridad constante al que fueron expuestos los animales. Los resultados obtenidos parecen indicar que la concentración de HSP70 se redujo de forma muy marcada en condiciones de oscuridad constante, al punto en que no fue posible detectarla por medio del mismo método que con las muestras expuestas al ciclo de luz-oscuridad. La reducción observada en la concentración de HSP70 es similar, si bien más marcada, a los resultados en hojas de *Spinacia oleracea* (Li y Guy, 2001), en este estudio se observó una reducción en la concentración de HSP70 en condiciones de oscuridad, y se propone que HSP70 es regulada por la luz independientemente del reloj circadiano, con lo que su concentración respondería únicamente a estresores ambientales.

Con los resultados mostrados en las figuras 9, 10, 11 y 13, además de la ausencia de resultados en condiciones de oscuridad constante, parecen indicar que el ritmo detectado en la concentración de HSP70 en el ganglio supraesofágico de *P. clarkii* no se trata de un ritmo circadiano, sino de uno diario. El estudio realizado en *A. granulata* (Schill et al., 2002) muestra la presencia de un ritmo diario, pero un ritmo circadiano nunca ha sido detectado para HSP70 hasta ahora. Debido a la alta conservación de esta proteína, es posible que esta falta de ritmicidad circadiana se encuentre presente en otros organismos, dada la elevada similitud en la estructura de HSP70 en distintos organismos (Shaner y Morano, 2007; Liang et al., 2013), lo que indica que la concentración de esta proteína puede variar principalmente en función del estrés al que se encuentra expuesto un organismo, así como factores conductuales. Es posible que el ritmo reportado en *A. granulata* (Schill et al., 2002) se trate de una consecuencia de la unión marcadamente rítmica del factor HSF1 al DNA, tal como se ha observado en ratones (Reinke et al., 2008), por lo que sería esta la responsable de la actividad rítmica observada en HSP70. Esta ritmicidad podría también ser resultado del asa de retroalimentación entre HIF-1 y HSP70, dado que HIF-1 parece actuar como vínculo entre la concentración de oxígeno y el reloj molecular (Adamovich et al., 2016); esta hipótesis puede ser el objetivo de un estudio futuro si se encuentra un ritmo biológico en la actividad de HIF-1.

Por otro lado, el aumento de la concentración de HSP70 durante el inicio de la escotofase puede deberse al efecto de la luz visible, un fenómeno que ya ha sido observado en otras condiciones de estrés ambiental (Gabai et al., 1997). La estimulación fótica (se utilizaron lámparas de 11,000 luxes, o aproximadamente 0.00161 watts/cm²) aplicada por tan solo 6 horas a ratones después de 12 horas de oscuridad constante aumentó la concentración de HSP70 (Kim et al., 2003). En otros estudios se ha observado el efecto del estrés ambiental en la expresión de HSP70, particularmente en el caso del estrés inducido por temperatura. El estrés provocado por choque térmico agudo (35° C por 2 horas) induce aumento de 3.5 veces el valor normal en los niveles de RNA transcrito de HSP70 en *P. clarkii* (Liang et al., 2013), mientras que un estudio realizado en el mejillón de California (*Mytilus californianus*) mostró incrementos en la expresión de esta misma proteína al elevarse la temperatura corporal de este organismo (Gracey et al., 2008); estos resultados demuestran que la activación de HSP70 puede ser aumentada por la exposición a un estrés ambiental. Asimismo, se ha reportado el aumento en la concentración de la proteína HSP60 en condiciones de luz de alta intensidad (Chow et al., 2009). Esta proteína tiene funciones similares a HSP70 en lo que se refiere al papel de chaperona en el plegamiento de otras proteínas y se ha visto que coopera con HSP70 para cumplir sus funciones (Hartl, 1996; Brocchieri y Karlin, 2000) y, dado el elevado grado de conservación de HSP70, estos resultados son potencialmente representativos de *P. clarkii*. De ser este el caso, se confirmaría la variación de la expresión de las proteínas de choque térmico principalmente en función del estrés ambiental.

En contraste, un estudio realizado con la proteína HSP72 (perteneciente a la familia de las HSP70 y, por tanto, comparten la misma función) en humanos no encontró ritmicidad circadiana en la concentración de HSP70 (Fortes y Whitham, 2009); si se tiene en cuenta nuevamente el alto grado de concentración de esta familia de proteínas, estos resultados podrían reflejar la situación de HSP70 en *P. clarkii*. Los resultados de los estudios mencionados anteriormente muestran que las condiciones de oscuridad constante reducen la concentración de HSP70, posiblemente debido a que su expresión se ve reducida debido a la ausencia de un estresor (la luz); una concentración de esta proteína inferior a la que es posible detectar por medio del método utilizado explica el que no se hayan detectado bandas de HSP70 en las muestras de animales mantenidos en oscuridad constante en el presente estudio.

Los resultados de los estudios que se han mencionado anteriormente, junto a los del experimento realizado, parecen indicar que el incremento en la concentración de HSP70 podría ser solamente el resultado de la exposición a una fuente de estrés ambiental (luz en este caso), en este caso de naturaleza fótica, en vez de ser de

naturaleza endógena. Ante la incapacidad del estudio actual de encontrar bandas de HSP70 y por lo tanto de demostrar la ritmicidad de esta proteína en condiciones de oscuridad constante, el ritmo diario en la concentración de HSP70 en el acocil *P. clarkii* no puede ser considerado un ritmo circadiano.

9. Conclusión

Se detectaron variaciones estadísticamente significativas en la concentración de la proteína HSP70 en ganglio supraesofágico de *P. clarkii*, y el análisis de cosinor de dichas variaciones muestra que estas constituyen un ritmo con un periodo de 26.0 horas. No obstante, no se obtuvieron resultados en acociles expuestos a oscuridad constante, por lo que se considera a este como un ritmo diario.

10. Literatura Citada

Adamovich, Y; Ladeux, B; Golik, M; Koeners, M P; Asher, G. (2016). Rhythmic Oxygen Levels Reset Circadian Clocks through HIF1 α . *Cell Metabolism*. 25, 1-9.

Armitage, K B; Buikema, A L Jr; Willems, N J. (1973). The effect of photoperiod in organic constituents and molting of the crayfish *Orconectes nais* (Faxon). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 44 (A), 431-456.

Aronson, B D; Johnson, K A; Dunlap, J C. (1994). Circadian clock locus frequency: Protein encoded by a single open reading frame defines period length and temperature compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91, 7683-7687.

Baird, N A; Turnbull, D W; Johnson, E A. (2006). Induction of the Heat Shock Pathway during Hypoxia Requires Regulation of Heat Shock Factor by Hypoxia-inducible Factor-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 281, 38675-38681.

Bradford, M M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2), 248-254.

Brocchieri L; Karlin S. (2000). Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. *Protein Science*. 9, 476-486.

Castañón Cervantes, O; Lugo, C; Aguilar, M; González Moran, G; Fanjul Moles, M L. (1995). Photoperiodic induction on the growth rate and gonads maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* during ontogeny. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 110A (2), 139-146.

Chang, E, S; Keller, R; Chang, S A. (1998). Quantification of Crustacean Hyperglycemic Hormone by ELISA in Hemolymph of the Lobster, *Homarus americanus*, Following Various Stresses. *General and Comparative Endocrinology*. 111, 359-366.

Chow, A M; Ferrier-Pagés, C; Khalouei, S; Reynaud, S; Brown, I R. (2009). Increased light intensity induces heat shock protein Hsp60 in coral species. *Cell Stress and Chaperones*. 14, 469-476.

Cyran, S A; Buchsbaum, A M; Reddy, K L; Lin, M; Glossop, N R J; Hardin, P, E; Young, M W; Storti, R V; Blau, J. (2003). *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* Form a Second Feedback Loop in the *Drosophila* Circadian Clock. *Cell*. 112, 329-341.

- DeCoursey, P J. (1986). Light-sampling behavior in photoentrainment of a rodent circadian rhythm. *Journal of comparative Physiology. A* (159), 161-169.
- Dehnel, P A. (1958). Effect of Photoperiod on the Oxygen Consumption of Two Species of Intertidal Crabs. *Nature*. 181, 1415-1417.
- Dunlap, J C. (1999). Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell*. 96 (2), 271-290.
- Dunlap, J C; Loros, J J; Liu, Y; Crosthwaite, S K. (1999). Eukaryotic circadian systems: cycles in common. *Genes to Cells*. 4 (1), 1-10.
- Ederly, I. (2000). Circadian rhythms in a nutshell. *Physiological Genomics*. 3 (2), 59-74.
- Edmunds, L E Jr. (1988). *Cellular and Molecular Bases of Biological Clocks*. Springer. New York, USA. 497.
- Escamilla Chimal, E G; Velázquez Amado, R M; Fiordelisis, T; Fanjul Moles, M L. (2010). Putative pacemakers of crayfish show clock proteins interlocked with circadian oscillations. *The Journal of Experimental Biology*. 213, 3723-3733.
- Fanjul Moles, M L. (2013). ROS signaling pathways and biological rhythms: perspectives in crustaceans. *Frontiers in Bioscience, Landmark*. 18, 665-675.
- Fanjul Moles, M L; Bosques Tisler, T; Prieto Sagredo, J; Castañón Cervantes, O; Fernández Rivera Río, L. (1998). Effect of Variation in Photoperiod and Light Intensity on Oxygen Consumption, Lactate Concentration and Behavior in Crayfish *Procambarus clarkii* and *Procambarus digueti*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 119A (1), 263-269.
- Fanjul Moles, M L; Escamilla Chimal, E G; Gloria Soria, A; Hernández Herrera, G (2004). The crayfish *Procambarus clarkii* CRY shows daily and circadian variation. *The Journal of Experimental Biology*. 207, 1453-1460.
- Fanjul Moles, M L; Miranda Anaya, M; Fuentes Pardo, B. (1992). Effect of monochromatic light upon the ERG Circadian rhythm during ontogeny in crayfish (*Procambarus clarkii*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 102A (1), 99-106.
- Fanjul Moles, M L; Miranda Anaya, M; Prieto, J. (1996). Circadian Locomotor Activity Rhythm During Ontogeny in Crayfish *Procambarus clarkii*. *Chronobiology International: The Journal of Biological and Medical Rhythm Research*. 13 (1), 15-26.

- Flaherty, K M; McKay, D B; Kabsch, W; Holmes, K C. (1991). Similarity of the three-dimensional structure of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 (11), 5041-5045.
- Fortes, M B; Whitham, M. (2009). No endogenous circadian rhythm in resting plasma Hsp72 concentration in humans. *Cell Stress and Chaperones*. 14 (3), 273-280.
- Gabai, V L; Meriin, A B; Mosser, D D; Caron, A W; Rits, S; Shifrin, V I; Sherman, M Y. (1997). Hsp70 prevents activation of Stress Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (29), 18033-18037.
- Gabai, V L; Meriin, A B; Yaglom, J A; Volloch, V Z; Sherman, M Y. (1998). Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 438, 1-4.
- Golombeck, D A; Rosenstein, R E. (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiological Reviews*. 90, 1063-1102.
- Gould, P D; Locke, J C W; Larue, C; Southern, M M; Davis, S J; Hanano, S; Moyle, R; Milich, R; Putterill, J; Millar, A. J; Hall, A. (2006). The Molecular Basis of Temperature Compensation in the Arabidopsis Circadian Clock. *The Plant Cell*. 18, 1177-1187.
- Gracey, A Y; Chaney, M L; Boomhower, J P; Tiburczy, W R; Connor, K; Somero, G N. (2008). Rhythms of Gene Expression in a Fluctuating Intertidal Environment. *Current Biology*. 18 (19), 1501-1507.
- Hafner, G S; Tokarski, T R. (1998). Morphogenesis and pattern formation in the retina of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Cell Tissue Research*. 293, 535-550.
- Hartl, F U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381 (6583), 571-580.
- Helfrich Förster, C; Stengl, M; Homberg, U. (1998). Organization of the circadian system in insects. *Chronobiology International*. 15 (6), 567-594.
- Homberg, U; Christensen, T A; Hildebrand, J G. (1989). Structure and function of the deutocerebrum in insects. *Annual Review of Entomology*. 34 (1), 477-501.
- Huner, J V; Barr, J E. (1984). Red swamp crayfish: biology and exploitation. Louisiana Sea Grant College Program, Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana.

Huxley, T H. (1880). The crayfish, an introduction to the study of zoology. D. Appleton and company, New York. 371.

Kalmus, H. (1935). Periodizität und Autochronie (= Ideochronie) als zeitregelnde Eigenschaften der Organismen. *Biologia Generalis*. 11, 93-114.

Kampinga, H H; Craig, E A. (2010). The Hsp70 chaperone machinery: J-proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11 (8), 570-192.

Kim, J H; Yu, Y S; Chung, H; Heo, J W; Seo, J S. (2003). Effect of the Absence of Heat Shock Protein 70.1 (*hsp70.1*) on Retinal Photoc Injury. *Korean Journal of Ophthalmology*. 17, 7-13.

Koukkari, W J; 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. Springer. 655.

Larimer, J L; Smith, J T F. (1980) Circadian Rhythm of Retinal Sensitivity in Crayfish: Modulation by the Cerebral and Optic Ganglia. *Journal of Comparative Physiology*. 136, 313-326.

Li, Q B; Guy, C L. (2001). Evidence for Non-Circadian Light/Dark Regulated Expression of Hsp70s in Spinach Leaves. *Plant Physiology*. 125 (4), 1633-1642.

Liang, S; Xu, S; Wood, D E; Jolly, E R. (2013). Hsp70 and Hsp90 are differentially expressed in crayfish muscle and neurons after heat stress. *Research and Reports in Biology*. 4, 41-50.

Lindqvist, O V; Huner, J V. Life history characteristics of crayfish: What makes some of them good colonizers?, en Gherardi, F.; Holdich, D M, (1999). Crayfish in Europe as alien species: How to make the best of a bad situation? Balkema. Rotterdam, Netherlands. 23-30.

McMahon, B R; Physiological Adaptation to Environment, en Holdich, D M, (2002). *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science. Iowa, USA. 327-376.

Meier, S; Sprecher, S G; Reichert, H; Hirth, F. (2006). *ventral veins lacking* is required for specification of the tritocerebrum in embryonic brain development of *Drosophila*. *Mechanisms of Development*. 123 (1), 76-83.

Multhoff, G. (2007). Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance. *Methods*. 43, 229-237.

Ohta, H; Yamazaki, S; McMahon, D G. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*. 8 (3), 267-269.

Page, T L; Larimer, J L. (1975). Neural Control of Circadian Rhythmicity in the Crayfish: I. The Locomotor Activity Rhythm. *Journal of Comparative Physiology*. 97, 59-80.

Page, T L; Larimer, J L. (1976). Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms. *Photochemistry and Photobiology*. 23 (4), 245-251.

Paranjpe, D A; Sharma, V K. (2005). Evolution of temporal order in living organisms. *Journal of Circadian Rhythms*. 3 (7), 1-13.

Portaluppi, F; Touitou, Y; Smolensky, M H. (2008). Ethical and methodological standards for laboratory and medical biological rhythm research. *Chronobiology International*. 25 (6), 999-1016.

Powles, S B. (1984). Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Physiology*. 35, 15-44.

Reinke, H; Saini, C; Fleury-Olela, F; Dibner, C; Benjamin, J, I; Schibler, U. (2008). Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes & Development*. 22, 331-345.

Reynolds, J D; Growth and Reproduction, en Holdich, D M, (2002). *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science. Iowa, USA. 152-191.

Sandeman, D; Sandeman, R; Derby, C; Schmidt, M. (1992). Morphology of the Brain of Crayfish, Crabs, and Spiny Lobsters: A Common Nomenclature for Homologous Structures. *The Biological Bulletin*. 183, 304-325.

Schill, R O; Gayle, P M H; Köhler, H R. (2002). Daily stress protein (HSP70) cycle in chitons (*Acanthopleura granulata* Gmelin, 1971) which inhabit the rocky intertidal shoreline in a tropical ecosystem. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C 131, 253-258.

Shaner, L; Morano, K A. (2007). All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity. *Cell Stress Chaperones*. 12 (1), 1-8.

Sharma, D; Masison, D C. (2009). Hsp70 Structure, Function, Regulation and Influence on Yeast Prions. *Protein & Peptide Letters*. 16 (6), 571-581.

Schmidt, M. (1997). Distribution of centrifugal neurons targeting the soma clusters of the olfactory midbrain among decapod crustaceans. *Brain Research*. 752, 15-25.

Vanselow, J T; Kramer, A. (2010). Posttranslational Regulation of Circadian Clocks. *Protein Reviews*. 12, 79-104.

Vega, A. (1993). Análisis estadístico en cronobiología. *Psiquis*. 2 (6), 139-149.

Velázquez Amado, R M; Escamilla Chimal, E G; Fanjul Moles, M L. (2012). Daily Light-Dark Cycles Influence Hypoxia-Inducible Factor 1 and Heat Shock Protein Levels in the Pacemakers of Crayfish. *Photochemistry and Photobiology*. 88, 81-89.

Vogt, G; Functional Anatomy, en Holdich, D M, (2002). *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science. Iowa, USA. 53-151.

Wang, G L; Jiang, B H; Rue, E A; Semenza, G L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 5510-5514.

Wever, R A. (1986). Characteristics of Circadian rhythms in human functions. *Journal of Neural Transmission, Supplementum*. 21, 323-373.

Zhu, X; Zhao, X; Burkholder, W F; Gragerov, A; Ogata, C M; Gottesman, M E; Hendrickson, W A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*. 272 (5268), 1606-1614.