

00322



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

65

FACULTAD DE CIENCIAS

## "ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DE LOS CRIPTOCROMOS EN EL RELOJ BIOLÓGICO DEL ACOCIL *Procambarus clarkii*"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :  
ANDREA GLORIA SORIA



DRA. MARÍA ESTHER SANJULIENA



MEXICO, D.F.

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

2003

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Estudio de la participación de los criptocromos en el reloj  
biológico del acocil Procambarus clarkii"  
realizado por Andrea Gloria Soria

con número de cuenta 9954969-1, quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Ma. Luisa Fanjul Peña

Propietario

Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario

Dra. Carolina Escobar Briones

Suplente

Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

Suplente

M.en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo

Consejo Departamental de

M.en C. ~~Juan Manuel Rodríguez Chávez~~

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Fanjul, por permitirme colaborar en su investigación, por orientarme y apoyarme en todo momento. Gracias por su confianza.

A Elsa y a Julio, por su apoyo académico y moral durante toda mi estancia en el laboratorio.

A la M. en C. Remedios J. Ramírez, por sus asesorías, su apoyo y su amistad.

Al Dr. Alfonso Torreblanco, por su orientación, apoyo y enseñanzas, además de su amistad.

Al Biol. Jorge Limón y a la Dra. Maria Eugenia Gonsebatt, por su ayuda para montar la técnica de Western Blot en el laboratorio de Neurofisiología comparada.

Al M. en C. José Luis Chávez y al Dr. Raúl Aguilar, por prestarme su equipo para que pudiera realizar mis experimentos.

A mis sinodales: Dra. Fanjul, Dra. Gonsebatt, Dra. Escobar, Dra. Escamilla y M. en C. Julio Prieto, por sus comentarios sobre esta tesis.

A Francisco Sour y a Sara Quiroz, por haber sido mis consejeros, pero sobre todo mis amigos desde que los conocí.

A la UNAM, por darme la posibilidad de ser parte de esta gran institución, por la educación recibida y por la oportunidad de asistir al intercambio académico que estoy segura me abrirá muchas puertas en un futuro.

A todas las chicas y chicos del laboratorio de Neurofisiología comparada, por su ayuda, paciencia, amistad y por todos los momentos divertidos que vivimos juntos.

A Poncho por todo el apoyo, cariño y comprensión que recibí durante esta etapa de mi vida.

A mis amigos de la natación, del triatlón y de Ciencias, por su gran cariño y amistad. Por hacerme sonreír, por escucharme y por tenerme paciencia. Sin todos ustedes no hubiera podido llegar hasta aquí.

A mis amigas del alma: Mariana, Susette, Claudia y Sabrina.

A mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermano, por estar conmigo en cada paso que he dado en mi vida. Por su amor y su apoyo. Por su paciencia y confianza. Por ser lo más importante en mi vida.

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA COMPARADA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO Y FINANCIADA POR PAPIIT IN-212901, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA.**

## 1. ÍNDICE

1. Índice	1
2. Resumen	2
3. Introducción	3
3.1 Generalidades de los ritmos circadianos	3
3.2 Bases genéticas y/o moleculares de los ritmos circadianos	9
3.3 Modelos moleculares	13
3.3.1 <i>Drosophila</i>	13
3.3.2 Mamíferos (ratón)	17
3.4 Los criptocromos y la fotorrecepción circadiana	19
3.4.1 <i>Drosophila</i>	23
3.4.2 Mamíferos	28
3.5 El acocil como modelo de ritmos circadianos	32
3.5.1 Ritmos biológicos en el acocil	33
4. Planteamiento del problema	35
5. Objetivos	36
6. Hipótesis	36
7. Materiales y métodos	36
7.1 Animales	36
7.2 Sacrificio y toma de muestras	37
7.3 Determinación de la concentración de proteínas (Método de Bradford)	37
7.3.1 Curva estándar	37
7.3.2 Determinación de proteínas	38
7.4 Electroforesis y Western Blot	39
7.5 Análisis	40
8. Resultados	40
8.1 Cerebro	40
8.2 Pedúnculos oculares	45
9. Discusión	48
10. Conclusiones	51
11. Literatura citada	52

## 2. RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue determinar si el criptocromo (CRY), fotorproteína propuesta como un gen del reloj o un fotorreceptor circadiano en otras especies, está presente en las estructuras marcapaso del acocil y si esta proteína presenta un ritmo circadiano endógeno. Para lo anterior se midieron los cambios en los niveles de CRY en los pedúnculos oculares y el cerebro de acociles adultos *Procambarus clarkii* después de 24 y 72 horas en oscilación espontánea (O:O), utilizando la técnica de Western Blot.

Esta investigación encontró que CRY está presente en los pedúnculos oculares y en el cerebro de *P. clarkii*. La proteína CRY muestra una oscilación circadiana endógena en el cerebro, mientras que en los pedúnculos oculares la oscilación no es significativa después de tres días en O:O. Los resultados sugieren que CRY podría estar participando como un componente central del mecanismo del reloj circadiano en el cerebro del acocil y como un fotorreceptor circadiano en los pedúnculos oculares de este organismo.



### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Generalidades de los ritmos circadianos

La mayoría de las especies que habitan el planeta Tierra han desarrollado la capacidad de cambiar su comportamiento a lo largo del día (Aschoff, 1981), cuando cambian los factores biológicos y físicos del ambiente debido al movimiento de rotación terrestre (Horton, 2001). Sin embargo, los cambios que sufre un organismo diariamente no son sólo respuestas a los cambios físicos del ambiente. A través de millones de años, la evolución ha seleccionado ciertas oscilaciones de los sistemas biológicos para que funcionen como relojes internos del organismo (Moore-Ede et al., 1982), así, el sistema interno de medición temporal está integrado por ciclos de aproximadamente 24 h generados endógenamente por el organismo: los ritmos circadianos (del latín *circa*: alrededor y *dies*: día) (Halberg, 1959).

La presencia de distintas formas de ritmicidad circadiana en organismos unicelulares, tanto procariontes como eucariontes, sugiere que la capacidad de los organismos vivos para expresar ritmos circadianos existe desde muy temprano en la historia de la vida en la Tierra (Turek y Takahashi, 2001). Las investigaciones señalan que en diversas especies existen similitudes entre las propiedades de los ritmos circadianos y la estructura molecular de sus marcapiasos (Horton, 2001).

En 1993, Pittendrigh propuso la teoría del “escape de la luz” como un modelo para explicar la forma en que evolucionaron los relojes circadianos. Pittendrigh destaca que muchos de los componentes celulares son capaces de absorber luz y que dicha radiación puede llegar a afectarlos negativamente. Pittendrigh propuso que, ya sea directa o indirectamente, una presión de selección pudo haber favorecido la aparición de los ritmos circadianos; por ejemplo: la capacidad de reducir y/o reparar el ADN dañado por la luz UV que se presenta durante el día (Pittendrigh, 1993).

Los ritmos circadianos se caracterizan por:

- a) Ser endógenos.
- b) Tener un periodo determinado genéticamente.

- c) Mantener un periodo estable a pesar de los cambios de temperatura (Pittendrigh, 1993).
- d) Ser plásticos, lo que les permite sincronizarse a los ciclos ambientales con periodos cercanos a 24 horas, siempre dentro de ciertos límites de frecuencia. (Horton, 2001).
- e) Modificar su periodo cuando el organismo se encuentra aislado de las claves temporales, alargándolo en los animales diurnos y acortándolo en los nocturnos (regla de Aschoff) (Aguilar-Roblero, 1993).
- f) Generalmente desaparecen al someterse a altas intensidades de luz de manera constante (regla de Aschoff) (Aguilar-Roblero, 1993).

Se dice que un ritmo circadiano está en oscilación espontánea cuando se expresa en ausencia de señales provenientes del ambiente externo (Turek y Takahashi, 2001). Bajo condiciones constantes de luz, temperatura, alimentación y sonido, el periodo del ritmo ( $\tau$ ) se expresa libremente, dejando de ser igual a 24 h, pero manteniéndose cercano a ellas (Turek y Takahashi, 2001) de manera estable, independientemente de las variaciones estacionales del fotoperiodo (Horton, 2001). Las variaciones de  $\tau$  con respecto al periodo de los ciclos ambientales, que se modifican anualmente como resultado de las fluctuaciones del eje terrestre con respecto al sol, traen como consecuencia diferencias entre el periodo del ciclo externo y el interno. Lo anterior hace necesario que el sistema del reloj biológico que regula los ritmos se sincronice con el ambiente que lo rodea (Turek y Takahashi, 2001). Los relojes circadianos son reiniciados día a día por señales ambientales, eliminando los errores del periodo con respecto a los ciclos ambientales que predicen y evitando que se acumulen (Moore-Ede et al., 1982). Por medio de la sincronización se controla la fase del ritmo (Turek y Takahashi, 2001) y se ajusta la frecuencia de oscilación a la de los ciclos de la rotación terrestre (Daan y Aschoff, 2001). Cuando se sincroniza el ritmo, se establece una fase estable con los ciclos externos, alargando o acortando su periodo, e igualándolo al del ciclo ambiental (Horton, 2001).

Se considera a los ciclos de luz-obscuridad (L:O) como los principales agentes sincronizadores para la mayoría de las especies (Turek y Takahashi, 2001) animales y vegetales, ya que proporcionan la señal ambiental más precisa y constante en casi la totalidad de los ambientes. Para que la sincronización ocurra, se requiere de la sensibilidad

de los osciladores endógenos a una señal ambiental en particular, y de su insensibilidad a otro tipo de señales (Daan y Aschoff, 2001). Otras señales ambientales capaces de producir una sincronización son: los ciclos de temperatura y presión, la disponibilidad del alimento, las actividades sociales, las sustancias químicas, etc. (Daan y Aschoff, 2001). Sin embargo, la sensibilidad a la luz ha sido, y continúa siendo, la señal ambiental más utilizada en el estudio de la fisiología de los sistemas circadianos.

La presencia de un oscilador endógeno permite al organismo reconocer el tiempo local, lo que resulta en la sincronía entre sus actividades y los ciclos del ambiente (Horton, 2001).

El reloj biológico, responsable del surgimiento de los ritmos circadianos, es un sistema de osciladores orgánicos capaces de generar e imponer un orden temporal a los procesos fisiológicos del organismo. Una estructura biológica se considera reloj biológico cuando:

- A) Es capaz de medir el paso del tiempo independientemente de cualquier entrada periódica del ambiente, es decir, posee una ritmicidad endógena.
- B) Puede convertir fuentes no periódicas de energía en salidas periódicas autosostenibles;
- C) Se utiliza para imponer el tiempo a ciertos eventos biológicos;
- D) Posee resolución, es decir, la habilidad de detectar el orden temporal de dos eventos cercanos en tiempo;
- E) Es capaz de mostrar una frecuencia de oscilación ( $f = 1/\text{periodo}$ ) regular, o bien, con poca variabilidad;
- F) Posee mecanismos de compensación de temperatura;
- G) Es capaz de detectar señales periódicas externas y de sincronizarse a ellas.

(Moore-Ede et al., 1982)

El sistema del reloj circadiano comprende mecanismos de entrada (aférentes), marcapasos y mecanismos de salida (eferentes) (Horton, 2001), (Figura 1). Los mecanismos aférentes incluyen a los receptores capaces de detectar y transducir las señales ambientales que son enviadas al marcapaso (Dunlap y Loros, 2001). Los marcapasos circadianos son estructuras que regulan las propiedades de medición de tiempo de un ritmo circadiano, en particular, la

fase y el periodo. Los marcapasos son los osciladores primarios que contienen a los elementos que participan en el asa de retroalimentación que genera el tiempo en ausencia de señales periódicas externas, sincronizando al sistema como un todo (Dunlap y Loros, 2001). Además, puede estar integrado por una red de elementos, capaces o no de medir intervalos de tiempo cercanos a 24 h, pero que acoplados a través de una retroalimentación mutua, pueden hacerlo (Moore-Ede et al., 1982). Los elementos eferentes son aquellos que resultan del procesamiento de la información temporal generada por el reloj circadiano y que transmiten la ritmicidad a los osciladores o efectores con el fin de provocar cambios conductuales, metabólicos o fisiológicos en el organismo (Dunlap y Loros, 2001).

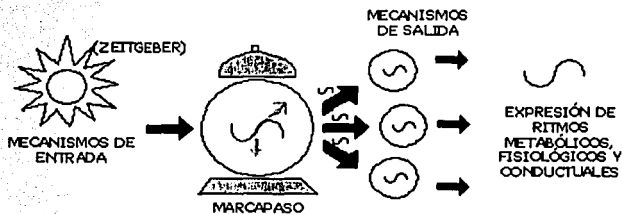


Figura 1. El sistema del reloj circadiano comprende mecanismos de entrada (aférentes), que detectan las señales ambientales y las transmiten al marcapaso, los marcapasos responsables de la generación endógena del tiempo, y los mecanismos de salida (eferentes) que provocan cambios rítmicos en la conducta y metabolismo del organismo.

El reloj biológico sincroniza al organismo con el ambiente permitiéndole predecir los cambios físicos ambientales asociados al día y la noche y prepararse para recibirlos (Turek y Takahashi, 2001). A la señal externa que sincroniza una oscilación circadiana, se le denomina Zeitgeber, del alemán *Zeit*: tiempo y *Geber*: donador (Sancar, 2000). Cuando ocurre la sincronización, el sistema adopta una relación de fase específica con el Zeitgeber (Daan y Aschoff, 2001). Además de la sincronización con el ambiente, el reloj circadiano confiere al organismo una organización temporal interna, es decir, mantiene una "sincronía interna" entre los distintos sistemas bioquímicos y fisiológicos del cuerpo (Pittendrigh, 1993) y les impone un orden temporal. Este proceso se realiza mediante mecanismos humorales y neurales dirigidos a los diferentes efectores (músculos, glándulas, etc.) que

expresan la ritmicidad y acoplan a los diferentes osciladores del organismo para lograr un funcionamiento coordinado (Granados et al., 1995). El resultado de esta sincronización es la adaptación conductual y fisiológica del organismo al medio (Turek y Takahashi, 2001), pues los individuos que tienden a minimizar el consumo de energía y la exposición a los depredadores u otros estresores incrementan su probabilidad de supervivencia y reproducción (Horton, 2001). Existen también otras ventajas adaptativas para aquellos organismos capaces de detectar los cambios estacionales a través de las variaciones en la longitud del día (Moore-Ede et al., 1982).

Las conductas controladas de forma circadiana incluyen al comportamiento sexual, el ciclo sueño-vigilia, la conidiación, el torpor, la alimentación, la bioluminiscencia, la fotosíntesis, la mitosis, los ciclos de sensibilidad visual, la actividad locomotora, los ritmos de eclosión y varios ritmos que dan paso al desarrollo del individuo (Horton, 2001).

Por lo general, los ritmos circadianos que son autosostenibles persisten por un largo periodo de tiempo en ausencia de señales ambientales (Moore-Ede et al., 1982). Sin embargo hay que tener en cuenta que medir la uniformidad del ritmo circadiano no equivale a medir la uniformidad del reloj circadiano que lo dirige ya que, incluso si el o los marcapasos emitieran señales perfectamente regulares, los procesos de transmisión fisiológica que acoplan al ritmo observado con el reloj pueden presentar un retraso de duración variable (Moore-Ede et al., 1982).

El sistema nervioso ha sido el blanco principal de los estudios enfocados a la localización del marcapaso circadiano. En los artrópodos se ha demostrado que el cerebro es un órgano fundamental en la generación de las señales circadianas. En los insectos, las oscilaciones circadianas surgen de estructuras ubicadas fuera del sistema nervioso (Page, 2001). Los artrópodos muestran procesos fisiológicos y conductuales rítmicos. En ellos se han estudiado ritmos de actividad locomotora, de eclosión y de sensibilidad retiniana. Los marcapasos circadianos que regulan a estos ritmos se han localizado en el ganglio supraesofágico. En este grupo, la ablación de los lóbulos ópticos o su aislamiento del cerebro altera los ritmos locomotores, lo que indica que estas estructuras son necesarias para la expresión del ritmo y el control de su fase y periodo. Los lóbulos ópticos cumplen la

función de hacer llegar las señales ambientales al mecanismo del reloj y se considera que (con excepción de las cucarachas, grillos y escarabajos) el marcapaso reside en el cerebro (Page, 2001).

Los osciladores circadianos se han detectado en ojos, cerebro, sistema endocrino, órganos reproductivos y epidermis. En general, se considera que un marcapaso circadiano está asociado a estructuras fotorreceptoras que median la sincronización a la luz (Page, 2001).

En la actualidad se dispone de evidencia que sugiere que el sistema circadiano es multioscilariorio. Se propone que cada uno de los osciladores que lo componen es capaz de generar ritmos circadianos autosostenibles y que está sincronizado a ciclos ambientales específicos. Los osciladores independientes deben estar acoplados internamente mediante mecanismos que les permitan mantener la sincronía (Moore-Ede et al., 1982).

En los vertebrados no mamíferos, como las aves y los reptiles, se ha demostrado la existencia de un sistema circadiano multioscilariorio provisto de múltiples vías de entrada de la luz (Underwood, 2001). En las aves, la glándula pineal y el núcleo supraquiasmático (NSQ) son considerados marcapasos circadianos cuyas lesiones afectan la expresión del ritmo locomotor (Menaker et al., 1978). Sin embargo, en los mamíferos parece ser que existe un oscilador maestro que gobierna la ritmicidad y que reside en el NSQ. Aunque quizá éste no es el único marcapaso, su papel es predominante en la adaptación de la mayoría de las funciones del organismo. Su lesión afecta profundamente a una gran variedad de ritmos como los del sueño-vigilia, la ingestión de agua y alimentos, la locomoción, etc. (Moore y Leak, 2001). El NSQ se ubica en la parte anterior del hipotálamo y consiste en un grupo compacto de pequeñas neuronas que se localizan dorsales al quiasma óptico. Las neuronas del NSQ constituyen osciladores individuales que se acoplan, a través de conexiones neurales, para formar un marcapaso. El NSQ es innervado por el tracto retinohipotalámico y es un elemento del sistema visual de los mamíferos que media la sincronización fótica que se inicia en la retina. El NSQ provee una organización temporal de las variables neuroendocrinas y fisiológicas durante el día y de mecanismos que elevan la eficiencia de las conductas adaptativas. En los animales de reproducción

estacional, el NSQ controla la producción de la melatonina pineal, que constituye la señal fotoperiódica de la reproducción (Moore y Leak, 2001).

Con el fin de descubrir los mecanismos que guían al sistema del reloj circadiano y su importancia en los organismos, se ha estudiado a una amplia gama de especies (*Neurospora*, *Drosophila*, *Arabidopsis*, ratón, etc.) que han permitido acceder al problema desde distintas perspectivas. La comprensión de la estructura y función del reloj circadiano ayudará a entender la forma en que los organismos han evolucionado para lidiar con los ciclos diarios de luz y oscuridad que se presentan en el planeta Tierra (Turek y Takahashi, 2001).

### **3.2 Bases genéticas y/o moleculares de los ritmos circadianos**

En 1935, Erwin Bunning sugirió que la contribución de las influencias ambientales a las propiedades del reloj y a la generación de los ritmos circadianos es mínima comparada con aquella de las determinantes genéticas (Moore-Ede et al., 1982). Años más tarde, Konopka y Benzer (1971) descubrieron que el periodo del ritmo locomotor y de eclosión de *Drosophila* era afectado por una mutación genética y denominaron al gen *per* (periodo) (Young, 1998). Este hallazgo confirmó la naturaleza genética de los ritmos circadianos y a partir de entonces se han utilizado las perturbaciones genéticas y farmacológicas a nivel de los diferentes componentes del sistema circadiano para trazar el camino desde las vías aferentes y eferentes del reloj hasta el oscilador maestro con el fin de descubrir y entender el mecanismo molecular de los relojes circadianos (Johnson y Kondo, 2001).

La célula se considera la unidad básica de medición de tiempo (Dunlap y Loros, 2001) y ha sido una herramienta importante entender el mecanismo básico del reloj circadiano, así como a sus componentes moleculares (Hastings, 2001). Todas las preguntas referentes a los sistemas circadianos se han tratado de contestar a nivel molecular: proteínas, ARN, genes y otras pequeñas moléculas.

En el estudio de los ritmos, la importancia de los modelos biológicos radica en que no sólo muestran de manera concreta la forma en que trabajan los sistemas más complejos, sino que

también nos permiten modelar dichos sistemas. Los sistemas microbianos, y aquellos susceptibles a análisis genéticos, permiten realizar aproximaciones a la comprensión del mecanismo del reloj y a la forma en que éste actúa para regular al metabolismo y el comportamiento celular (Dunlap y Loros, 2001).

A nivel molecular, los relojes circadianos están constituidos por asas de retroalimentación negativa integradas por los denominados genes del reloj y sus productos proteicos. Los genes del reloj son aquellos que al alterarse, alteran los ritmos circadianos. Los transcritos de estos genes, por lo general, se expresan rítmicamente, es decir, presentan oscilaciones circadianas (Emery et al., 1998 y Allada et al., 2001). Las proteínas que codifican estos genes son capaces de inhibir su propia transcripción (Allada et al., 2001). Entre la activación y la inhibición de los genes del reloj, o bien, entre su transcripción y la producción o disponibilidad de la proteína inhibitoria, debe existir un retraso que genere las oscilaciones autosostenibles (Sancar, 2000 y Allada et al., 2001). Para que una oscilación se mantenga debe ser regulada tanto por elementos positivos como negativos que evitarán que el sistema se vuelva estable (Dunlap, 1999) (Figura 2).

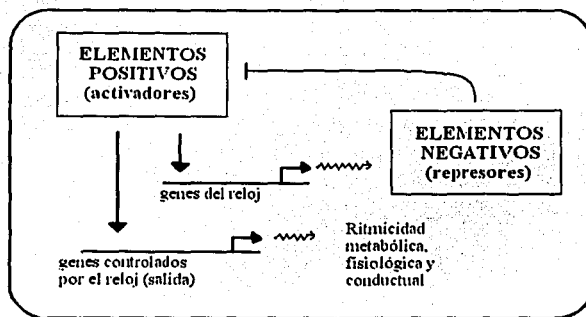


Figura 2. Asa de retroalimentación característica de los relojes circadianos. Contiene elementos reguladores positivos y negativos que mantienen las oscilaciones. El asa se cierra dentro de la misma célula. (Dunlap, 1999)



Una característica conservada de los osciladores circadianos es el hecho de que todas las asas moleculares de retroalimentación se cierran dentro de una misma célula (Figura 2), es decir, no requieren de la interacción con otras células (Dunlap, 1999).

Las células experimentan variaciones diarias en los niveles de los transcritos de los genes del reloj y de sus productos proteicos, que se reflejan en las diferentes fases de un ciclo diario. Las células responden a estas variaciones diarias, en parte, con cambios en los patrones de los genes que expresan, que a su vez, afectan su bioquímica y resultan en los ritmos que son expresados (Dunlap, 1999). Sin embargo, sólo un pequeño número de genes de salida están directamente regulados por los componentes del reloj central (Panda et al., 2002b), el resto es controlado indirectamente a través de cascadas regulatorias desencadenadas a partir de los primeros (Allada et al., 2001).

A nivel molecular, un estímulo sincronizador como la luz o la temperatura, provoca alteraciones rápidas en la abundancia de un componente del reloj (transcrito o proteína), que conduce a un desplazamiento del oscilador maestro hacia la nueva hora del día (Miyamoto y Sancar, 1999). La magnitud del cambio en la concentración del componente del reloj determinará la magnitud del desplazamiento de la fase (Devlin y Kay, 2001). La sincronización ocurre gracias a las interacciones moleculares que se producen entre proteínas, o entre genes y proteínas a través de dominios específicos. La proteína PER (codificada por *per*) forma parte de una familia de proteínas que contienen un dominio PAS cuya función es promover la heterodimerización entre proteínas que lo contienen, además de participar en la formación de complejos con proteínas que carecen de él. Así, el dominio PAS juega un papel tanto en las asociaciones proteicas heterotípicas, como en las homotípicas. Aunque no se ha demostrado que PER pueda unirse al ADN, la mayoría de las proteínas PAS incluyen a la secuencia de unión a ADN denominada bHLH (de las siglas en inglés: *base helix-loop-helix*) y funcionan como factores de transcripción al unirse a secuencias promotoras dentro de los genes blanco. Una de las secuencias activadoras a las que se unen los dominios bHLH es la secuencia de la caja-E (revisión en Young, 1998).

Los dominios PAS se han identificado en proteínas de fotorrespuesta bacterianas, fitocromos fotorreceptores de plantas y factores de transcripción de insectos y mamíferos (e.g. AHR, SIM y CLOCK), lo que sugiere un origen evolutivo de la bioquímica que

condujo a lo que sería actualmente un oscilador circadiano (Dunlap y Loros, 2001). La semejanza de la región PAS de las proteínas PER, CLOCK y WC es el primer ejemplo de similitud en las secuencias entre proteínas asociadas al reloj. Dadas las distancias evolutivas que existen entre la mosca, el ratón y el hongo, se sugiere que otros componentes del reloj podrían ser identificados mediante esta característica (Crossthwaite et al., 1997 en Dunlap y Loros, 2001).

Aunque la estructura básica del reloj circadiano se conserva a través del proceso evolutivo, los componentes que desempeñan cada función cambian (Devlin y Kay, 2001). Esto hace suponer que los relojes surgieron al menos cuatro veces en la historia de manera independiente (Van Gelder et al., 2003), hipótesis que no puede ser comprobada debido a que los genes del reloj poseen una rápida tasa de evolución debido a su interacción con el ambiente, quien cambia de manera rápida y constante. La evolución acelerada de los genes del reloj dificulta el uso de las filogenias moleculares para establecer el origen del reloj biológico (Dunlap, 1999). No obstante, es posible detectar una creciente complejidad en la sincronización de los ritmos, ya que conforme se incrementa la complejidad del sistema nervioso, también aumenta la dependencia de los ritmos circadianos periféricos a los mecanismos de acoplamiento central. Un ejemplo de lo anterior es el hecho de que en las plantas, donde no existe un sistema nervioso, el reloj parece correr de manera independiente en cada órgano sin existir un acoplamiento entre ellos; mientras que en las moscas, que presentan sistemas nerviosos simples, las neuronas laterales se sincronizan por medio de las entradas de luz a las diferentes vías de fotorrecepción (visuales y extrarretinianas) y los tejidos periféricos pueden ser sincronizados a ciclos L:O de forma independiente del sistema nervioso central (SNC). Finalmente en los mamíferos, que cuentan con un sistema nervioso complejo, la sincronización depende por completo de la entrada de la luz por la vía visual al NSQ y los ritmos periféricos no pueden ser sincronizados de manera directa (Devlin y Kay, 2001).

### 3.3 Modelos moleculares

#### 3.3.1. *Drosophila*

La genética de los ritmos circadianos en las moscas ha llevado al descubrimiento de los principios del funcionamiento del reloj central y ha aportado evidencias de la razón por la que se conserva su mecanismo en los mamíferos y otros organismos. Esta es la causa por la que *Drosophila* se emplea como modelo para entender la regulación del comportamiento del reloj biológico a nivel molecular (Panda et al., 2002a).

*Drosophila* es un insecto de comportamiento diurno. Las moscas adultas poseen un ritmo de emergencia de la pupación que presenta altos niveles de eclosión por la mañana, cuando el clima es frío y húmedo, minimizando así el riesgo de desecación (Pittendrigh, 1967 en Panda et al., 2002a). *Drosophila* también presenta ritmos de actividad locomotora, con una actividad elevada durante el día y baja durante la noche. Ambos ritmos persisten con una periodicidad circadiana en obscuridad constante, indicando su carácter endógeno y por lo tanto la existencia de un marcapaso.

Con las investigaciones de Konopka y Benzer en 1971 se estableció la existencia de genes que juegan un papel importante en el control de los ritmos conductuales. Hoy en día, se sabe que las oscilaciones del marcapaso de *Drosophila* requieren de 5 genes para llevarse a cabo: *period (per)*, *timeless (tim)*, *clock (clk)*, *cycle (cyc)* y *double-time (dbl)* (revisión en Young, 1998) (Figura 3).

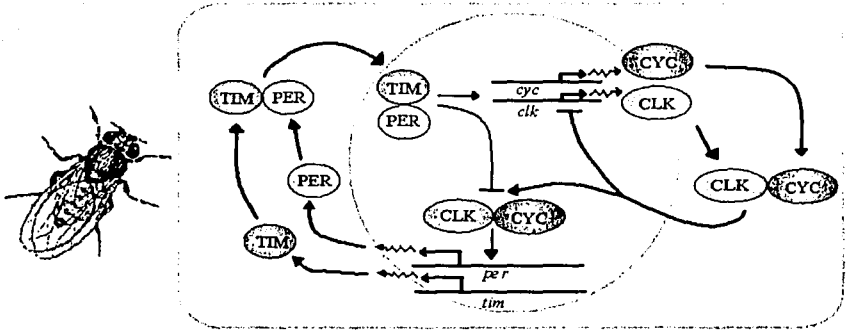


Figura 3. El reloj molecular circadiano de *Drosophila* está compuesto por dos asas de retroalimentación que se entrelazan. Los elementos positivos (activadores) de una de las asas actúan como inhibidores (represores) en la otra. Los elementos principales de estas asas de retroalimentación negativa son: *per*, *tim*, *clk* y *cyc*.

Estos autores sugirieron que el gen *per* podía codificar para un componente del oscilador circadiano. La proteína y el ARNm de *per* exhiben cambios rítmicos circadianos en su abundancia y se expresan en el cerebro, mismo sitio donde se localiza al marcapaso circadiano en otros insectos y en vertebrados (revisión en Young, 1998). En 1992, Ewer y cols. localizaron dos grupos de 20 a 30 neuronas laterales en el cerebro de *Drosophila*. Estas neuronas son las responsables del control de la ritmicidad conductual (Panda et al., 2002a) y son probablemente esenciales para el comportamiento locomotor, pues cuando son eliminadas, las moscas se vuelven arrítmicas en oscuridad constante (Emery et al., 2000).

La proteína PER se expresa en una gran variedad de tipos celulares en *Drosophila*. PER se produce en los ojos, en los ocelos y en el cerebro. La proteína PER se acumula en el núcleo celular siguiendo un ritmo circadiano, alcanzando su nivel máximo durante la noche tardía. Los ritmos de las neuronas del marcapaso en el cerebro central son capaces de ser sincronizados por ciclos de luz, incluso en ausencia de ojos y ocelos (revisión en Young, 1998). Otras estructuras fuera de la cabeza expresan PER en el núcleo celular. Actualmente

se sabe que existen marcapasos circadianos autónomos y sincronizables fuera de la cabeza, en cada parte del cuerpo (Dunlap, 1999). Los relojes periféricos son capaces de responder y sincronizarse a la luz, pero tras un tiempo en obscuridad constante, las oscilaciones se amortiguan, quizá debido a la pérdida intrínseca de la ritmicidad celular, o bien por el desacoplamiento de los osciladores (Allada et al., 2001).

La concentración de PER en diferentes puntos del ciclo molecular de 24 h sirve como referencia para dar información sobre la hora de día. Sin embargo, para poder detectar si las concentraciones intermedias van en aumento o disminuyen, PER debe de asociarse físicamente con otra molécula a través de su dominio PAS. Este dominio le permite a PER funcionar como un represor transcripcional de un par heterodimérico bHLH-PAS (Allada et al., 2001). El gen *tim* posee las características de ser un componente del reloj circadiano. Este gen interactúa con *per* y su proteína (TIM) es necesaria para la acumulación y localización nuclear de PER. En el citoplasma, TIM se requiere para estabilizar a PER (revisión en Young, 1998; Rosato et al., 2001).

La generación del ritmo circadiano está basada en la regulación de estos dos genes (*per* y *tim*) por un asa de retroalimentación negativa (Lucas y Foster, 1999). Los transcritos de *per* y *tim* ciclan cada 24 horas y sus proteínas aparecen unas horas más tarde (Ceriani et al., 1999). Tras incrementarse los niveles de ARNm, el nivel de las proteínas PER y TIM se eleva (Devlin y Kay, 2001), acumulándose durante el día en el citoplasma donde forman dímeros que se translocan al núcleo por la tarde. En el núcleo, los dímeros PER/TIM regulan negativamente su propia transcripción al inhibir al activador transcripcional formado por el dímero CLK/CYC que actúa sobre las cajas E de sus promotores (Lucas y Foster, 1999 y Dunlap, 1999) (Figura 3). La inhibición provoca el decaimiento del ARNm de *per* y *tim*, y por lo tanto de los niveles de sus proteínas, haciendo que la represión del activador desaparezca y permitiendo que el ciclo comience de nuevo. Tanto PER como TIM se fosforilan progresivamente, lo que conduce a su eventual degradación en la noche tardía. La proteína encargada de fosforilar a PER es DBL. La fosforilación afecta la movilidad de las proteínas y es la responsable de que exista un retraso en la

retroalimentación de PER que evita que se alcance el equilibrio y desaparezca la ritmicidad (Allada et al., 2001).

Los genes *per* y *tim* están sujetos a dos asas de retroalimentación que se entrelazan, una autoregulatoria y otra de regulación recíproca (Allada et al., 2001). En la segunda asa de retroalimentación, CLK reprime su propia transcripción al formar un dímero con CYC, mientras que el complejo PER/TIM funciona como un antirepresor que activa su síntesis (Allada et al., 2001) y en consecuencia hace oscilar los niveles de CLK (Figura 3). A diferencia de CLK, CYC se expresa constitutivamente en la mosca (Dunlap, 1999).

El complejo PER/TIM promueve su translocación nuclear y solo puede ensamblarse en el citoplasma, lo que tiene consecuencias importantes para la sincronización, pues ciertas condiciones de sincronización eliminan a TIM de los complejos nucleares PER/TIM. Como la translocación nuclear de ambas proteínas requiere de la heterodimerización, cuando ocurre la disociación del complejo dentro del núcleo su función solo puede ser reinstalada importando heterodímeros recién sintetizados desde el citoplasma. De esta forma, un estímulo sincronizador detiene la progresión del marcapaso, que vuelve a ponerse en marcha de acuerdo con los tamaños de los almacenes citoplasmáticos de PER y TIM (Egan et al., 1999 y Devlin y Kay, 2001).

Los componentes del reloj molecular de *Drosophila* tienen su pico y son activos en la noche. El recambio es inducido por la luz que llega a través del ojo y las vías extraoculares (Stanewsky et al., 1998) causando una rápida degradación de TIM, que al desaparecer provoca que PER se desestabilice y sea también degradado (Dunlap, 1999).

La proteína TIM funciona como un sensor de luz que acopla al marcapasos con el ambiente externo. El reinicio de fase del marcapasos en *Drosophila* ocurre segundos o minutos después de que ha sido expuesto a la luz. TIM presenta una sensibilidad a la luz tanto dentro de los complejos PER/TIM, como en su forma monomérica.

Las salidas del reloj circadiano ocurren a través de los denominados genes controlados por el reloj (Dunlap, 1999).

### 3.3.2 Mamíferos (ratón)

Los relojes de los mamíferos son ensambles de células de marcapaso que se comunican unas con otras y reciben información sobre el ambiente vía mecanismos intracelulares comunes.

El sistema del reloj circadiano en los mamíferos es jerárquico y el reloj maestro se localiza en las neuronas del NSQ, en la parte ventral del hipotálamo (Morse y Sassone-Corsi, 2002 y Oster et al., 2002). El NSQ controla las oscilaciones circadianas y las actividades conductuales y metabólicas (Miyamoto y Sancar, 1999) y coordina la función de los osciladores esclavos de la periferia a través de la generación de ritmos en varias cascadas de señalización vía proyecciones neurales y factores difusibles, lo que finalmente da lugar a los ritmos en las conductas fisiológicas del organismo (Panda et al., 2002b).

La lesión del NSQ elimina casi la totalidad de la ritmicidad periférica, aunque se desconoce si esto se debe a la pérdida de la ritmicidad intrínseca o a la falta de acoplamiento entre osciladores (Allada et al., 2001).

El NSQ recibe las señales del ambiente y aporta pistas temporales para sincronizar las oscilaciones diarias en los tejidos periféricos (Morse y Sassone-Corsi, 2002). Las oscilaciones de la periferia regulan las funciones específicas relativas al tejido o a la función del órgano (Panda et al., 2002b).

Los niveles oscilantes de los transcritos de los genes del reloj en el NSQ son componentes esenciales del marcapaso circadiano en mamíferos (Morse y Sassone-Corsi, 2002). El mecanismo del marcapaso en este grupo está integrado por dos asas negativas de retroalimentación transcripcional en donde participan tres genes *mper* (*mper1*, *mper2* y *mper3*), dos criptocromos (*mcry1* y *mcry2*), un gen *clock* (*clk*) y un gen *bmal1* (Morse y Sassone-Corsi, 2002) (Figura 4). Las asas se encuentran entrelazadas (Devlin y Kay, 2001), con sus productos génicos actuando negativamente sobre su propia transcripción y positivamente sobre la transcripción de los genes de la otra asa (Morse y Sassone-Corsi, 2002). En el NSQ todos los transcritos de los genes del reloj, con excepción de *clk*, ciclan circadianamente (Morse y Sassone-Corsi, 2002). Todos los componentes moleculares en el NSQ tienen su pico durante el día, a diferencia de *Drosophila*, donde el pico es por la noche (Dunlap, 1999). En los tejidos periféricos, los genes del reloj también ciclan, pero

con un retraso de 3 a 9 horas, lo que podría indicar que están recibiendo las pistas temporales del oscilador maestro (Morse y Sassone-Corsi, 2002). La regulación circadiana de la mayoría de los genes es específica del tejido y solo un pequeño grupo de ellos es blanco directo de los factores de transcripción que guían al oscilador central (Panda et al., 2002b).

El asa de retroalimentación del reloj molecular contiene una familia de *mpers* (*mper1*, *mper2* y *mper3*) que poseen dominios heterodiméricos PAS, pero no dominios de unión a ADN (bHLH). Las interacciones entre los mPER son muy fuertes y al heterodimerizar promueven su entrada al núcleo (Kume et al., 1999). Por otro lado, a diferencia de lo que sucede en *Drosophila*, las interacciones de PER con TIM son muy débiles y poco probables, incluso se ha propuesto que en mamíferos TIM pudiera no estar involucrado en los ritmos circadianos (Allada et al., 2001). Una vez en el núcleo, el complejo formado por mPERs inhibe la transcripción inducida por CLK/BMAL1 (Kume et al., 1999) y por ende, inhibe su propia transcripción ya que ésta es inducida por el factor transcripcional que actúa sobre las cajas E de *mper1* y *mper2* de forma positiva (Lucas y Foster, 1999; Dunlap, 1999; Sancar, 2000; Allada et al., 2001) (Figura 4). Por otro lado, mPER2 promueve un incremento en la transcripción de *bmal1* (Allada et al., 2001; Morse y Sassone-Corsi, 2002; Oster et al., 2002). Tras su entrada al núcleo, PER comienza a fosforilarse y ubiquitinizarse, siendo degradado posteriormente por el proteosoma, a menos que sea retenido por mCRY (Oster et al., 2002). La fosforilación juega un papel importante en la acumulación y el recambio de PER y otras proteínas (Morse y Sassone-Corsi, 2002). Cuando los niveles de PER vuelven a bajar, el bloqueo de CLK/BMAL1 se libera y los niveles de *mper1*, seguidos por los de *mper2* y *mper3* comienzan a aumentar de nuevo, reiniciando el ciclo (Dunlap, 1999).



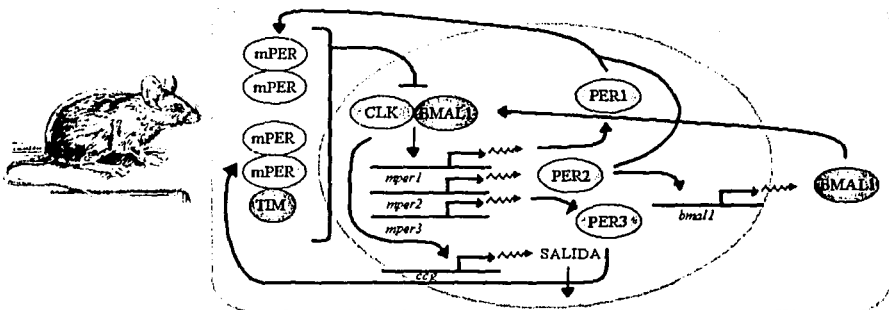


Figura 4. El reloj molecular del ratón reside en el NSQ y está integrado por dos asns negativas de retroalimentación transcripcional en donde participan tres genes *mper* (*mper1*, *mper2* y *mper3*), dos criptocromos\*, un gen clock (*clk*) y un gen *bmal1* (modificado de Morse y Sassone-Corsi, 2002).

\*no incluidos en este esquema; ver en la sección de criptocromos.

Debido a que la inactivación de *bmal1* provoca arritmia, se supone que su producto génico resulta crucial para el reloj molecular en ratones (Oster et al., 2002).

Los genes *mper1* y *mper2* son genes inducidos por la luz durante la tarde y por la noche (Dunlap, 1999). Se cree que estos genes pueden estar involucrados en la respuesta a la luz del reloj en mamíferos (Allada et al., 2001).

### 3.4 Los criptocromos y la fotorrecepción circadiana

Como se dijo antes, una característica fundamental de los relojes circadianos es que no oscilan con un periodo exacto de 24 horas y que requieren de una sincronización diaria que les permita tener una referencia del tiempo externo para poderse adaptar a los cambios en la longitud del día (Devlin y Kay, 1999). El reloj central responde a las claves ambientales externas (Pittendigh, 1993, Emery et al., 2000, Alvarez y Sehgal, 2002) y su sincronización se lleva a cabo a través de diversos estímulos, como la luz y la temperatura.

Se sugiere que en el primer paso hacia la consolidación de una organización circadiana se necesitó de la selección de procesos que respondían directamente a las transiciones de luz-obscuridad, es decir, de genes regulados por la luz (Jonson, 1994 en Johnson y Kondo, 2001). La presencia de este tipo de genes requiere de la existencia de vías de fotorrecepción y transducción que desencadenan una cascada de señalización que desemboca en los genes efectores, o en sus productos (Johnson y Kondo, 2001).

La fotorrecepción es una característica universal de los marcapasos circadianos (Emery et al., 1998). La luz es considerada como el Zeitgeber por excelencia. La sincronización por luz es tan importante que algunos organismos cuentan con una vía de entrada circadiana formada por múltiples sistemas fotosensibles (Sancar, 2000). A la capacidad de los ritmos circadianos de adoptar el periodo de los ciclos ambientales a los que son sometidos se le denomina fotosincronización (Meijer en Takahashi et al., 2001). La luz afecta al reloj molecular al activar factores de transcripción que regulan la expresión de los genes del reloj (Morse y Sassone-Corsi, 2002). Para que el estímulo fótico produzca un desplazamiento en el reloj es necesario un fotorreceptor que transduzca la señal luminosa al marcapaso circadiano (Egan et al., 1999). Para ser eficiente, el mecanismo de recepción del reloj circadiano no tiene que ser hipersensible y se debe poder acoplar a un amplio espectro luminoso, pues la intensidad del estímulo y la calidad espectral de la luz cambian bruscamente durante las transiciones día-noche (atardecer) y noche-día (amanecer), virando hacia la parte azul del espectro cuando apenas hay luz y hacia los verdes y el rojo durante los momentos de alta intensidad luminosa. (Hall, 2000).

Existen muchos compuestos capaces de absorber la luz, sin embargo el número de aquellos compuestos capaces de transformar la energía luminosa en energía electroquímica y codificar información en la vía de transducción de señales es limitado (Sancar, 2000).

Una fotoproteína está asociada a uno o varios pigmentos fotoactivos (cromóforos) que convierten la energía luminosa en energía química o en información; entendiéndose por pigmento fotoactivo a aquella molécula orgánica que absorbe la luz en el rango UV-luz visible y por medio de la absorción de un fotón, inicia una reacción química (e.g.: flavinas y pterinas). Algunos ejemplos de pigmentos fotorreceptores son la rodopsina, el sistema fotosintético, las fotoliasas, los criptocromos, etc. (Sancar, 2000).

Las fotoliasas son proteínas cuyo peso molecular oscila entre los 55 y 65 kDa (Sancar, 2000 y Lin, 2002) y se encuentran en bacterias, arqueobacterias y hongos (Lin, 2002). Son enzimas asociadas a dos cromóforos, uno que capta la luz (foliato o dezaflavina) y uno catalítico (flavina: FAD), que reparan los daños inducidos por la luz UV del ADN en una reacción dependiente de luz azul-UV ( $\lambda = 350-450$  nm.). Existen dos tipos de fotoliasas: la fotoliasa (tipo I) que repara dímeros de ciclobutano-pirimidina y la 6-4 fotoliasa (tipo II), que repara dímeros de pirimidina-pirimidina (Sancar, 2000 y Lin, 2002). Ambas contienen los cromóforos FAD y pterina. El daño del ADN es reconocido por la enzima, en forma independiente de la luz y ambas moléculas se unen formando un complejo. La pterina, que actúa como una fotoantena, al ser expuesta a la luz absorbe un fotón y transfiere la energía de la excitación a la flavina, el cofactor catalítico, que a su vez transfiere el electrón al fotoproducto del ADN efectuando su reparación. La enzima recupera así su estado basal y se disocia del ADN (Sancar, 2000).

Los criptocromos, son fotoproteínas sensibles a la luz azul-UV ( $\lambda = 350-450$  nm.) igual que las fotoliasas, con las que comparten un alto grado de homología en su secuencia (Sancar, 2000), la composición de sus cromóforos y una actividad bioquímica dependiente de la luz (Lin, 2002). El nombre de esta familia de fotorreceptores radica en su importancia para los fotoprocesos de las plantas criptógamas, así como a su naturaleza críptica. (Sancar, 2000). Los criptocromos no son sistemas basados en opsinas (Miyamoto y Sancar, 1999), sino pigmentos basados en la vitamina B<sub>2</sub> (Emery et. al., 1998) que a pesar de que carecen de la actividad reparadora de ADN de las fotoliasas, median otras respuestas a la luz azul (Sancar, 2000) a través de una extensión carboxilo-terminal única (Devlin y Kay, 1999).

Varias evidencias sugirieron que el sistema de fotorrecepción circadiana podría estar integrado por un sistema con cromóforos de flavina, en adición o en sustitución de los de retinal (Emery et. al., 1998). El criptocromo fue propuesto como una molécula fotorreceptora debido a sus características estructurales, funcionales y a su localización en el núcleo de la célula. Esto le permite desempeñar funciones de fotorrecepción, fototransducción y ser componente del reloj molecular.

En 1881 Darwin reportó que ciertas plantas presentaban una respuesta fototrópica a la luz azul (Lin, 2002). Investigaciones posteriores descubrieron que en *Arabidopsis thaliana* existen dos fotorreceptores de luz azul, las fototropinas y los criptocromos, sin embargo solo los criptocromos se han hallado también en animales. Los criptocromos encontrados en *Arabidopsis* (CRY1 Y CRY2), aunque no forman parte integral de los componentes del reloj, participan en distintos procesos controlados por la luz como son la expresión génica, la regulación del crecimiento, las respuestas fotomorfogénicas como la elongación celular, el fotoperiodismo en la floración y el fototropismo en respuesta a la luz azul (Thresher et al., 1998, Lin, 2002).

Por ser los criptocromos proteínas evolutivamente conservadas y estar estructuralmente relacionadas con la enzima de reparación de ADN, la fotoliasa, se cree que fueron el producto evolutivo de una duplicación de los genes de la fotoliasa ancestral, ya que en plantas y animales como *Arabidopsis* y en *Drosophila* encontramos ambos, cada uno con sus actividades de fotorrecepción o reparación de ADN (Emery et al., 1998). Recientemente se descubrió un nuevo criptocromo en bacterias y plantas llamado DASH (Brudler et al., 2003). El DASH actúa como un represor transcripcional, contiene un cromóforo/cofactor FAD, presenta similitudes con los procesos de reconocimiento del ADN con la fotoliasa y conserva la cadena de transporte de electrones de la proteína a la flavina (Brudler et al., 2003). Este hallazgo sugiere que los criptocromos evolucionaron antes de la divergencia entre procariontes y eucariontes, refutando la teoría anterior que proponía que los criptocromos habían evolucionado tras el origen de los eucariontes (Brudler et al., 2003).

Los criptocromos presentan los sitios de unión a los cromóforos/cofactores de flavina, el FAD y la pterina, pero aparentemente carecen del sitio de unión al ADN (Emery et al., 1998). Son los cofactores unidos a la proteína los que determinan su espectro de absorción de la luz (350-450 nm.). Estos pigmentos absorben la luz y transmiten la señal electromagnética al reloj molecular (Sancar, 2000). Se desconoce con exactitud el mecanismo de señalización del criptocromo, sin embargo se sabe que en las plantas la señalización del criptocromo conlleva la actividad de óxido-reducción mediada en parte por el sitio de unión a la flavina (Lin, 2002). Recientemente Lin y cols. (2001) reportaron que

el mecanismo de señalización del criptocromo de *Drosophila* está asociado a un cambio en su estado de oxidación en el que interviene este mismo cofactor tras recibir la luz. Aparentemente, la actividad redox conduce al cambio conformacional del criptocromo, alterando su estado de fosforilación y sus relaciones con otras proteínas a las que se une y desencadena así la propagación de la señal (Lin, 2001, Froy et al., 2002).

Otros procesos celulares están involucrados en la propagación y transducción de la señal y en la regulación de la retroalimentación de los criptocromos, además de la regulación transcripcional. La ocurrencia de cambios en la homeostasis iónica es uno de ellos, ya que en respuesta a la luz azul se produce una rápida despolarización de la membrana celular, que resulta probablemente en la apertura de los canales iónicos. Se sabe además que existen cambios en la homeostasis del calcio inducidos por la luz azul, ya que este tipo de luz promueve el flujo de calcio hacia el citosol (Lin, 2002).

Los criptocromos de mamíferos, plantas e insectos son 60% homólogos entre sí, sin embargo cuentan con extensiones carboxilo terminales únicas que pueden ser cortas o alcanzar los 240 aminoácidos. Se sugiere que este dominio es el que se une a las moléculas efectoras (Sancar, 2000). Considerando la similitud en las secuencias y debido a que se ha descubierto que el criptocromo de *Drosophila* (CRY) funciona como un fotorreceptor circadiano (Emery et al., 1998), mientras que los dos criptocromos de mamíferos (mCRY1 y mCRY2), encontrados en la retina y el NSQ, parecen desempeñar una función dentro del mecanismo central del reloj circadiano, no siendo clara su función en la fotorrecepción (Lucas y Foster, 1999), algunos autores han propuesto la posibilidad de que a lo largo de la evolución de los vertebrados, los criptocromos se movieran desde la vía de entrada de la luz, hasta convertirse en uno de sus componentes centrales. El que los sitios de unión a los cofactores se hayan conservado parece indicar su importancia para el funcionamiento correcto de la molécula (Lucas y Foster, 1999).

### 3.4.1 *Drosophila*

La ablación de los ojos, o las mutaciones en la vía de fototransducción visual en *Drosophila* reducen, pero no impiden, la sincronización de los relojes circadianos a la luz, lo que indica

la existencia de una vía alterna de transducción de señales hacia el marcapaso circadiano (Emery et al., 1998).

La posibilidad de construir una curva de respuesta de fase a luz azul del ritmo de eclosión de *Drosophila* sugiere la presencia de un fotorreceptor circadiano a luz azul que actúa tanto sobre los ritmos de actividad, como sobre los relojes periféricos (Emery et al., 1998). La búsqueda de este fotorreceptor condujo al descubrimiento del gen *cry* (Emery et al., 1998 y Egan et al., 1999). Este gen se localiza en la región 91 F del cromosoma 3 y codifica una proteína perteneciente a la familia de los criptocromos (CRY) que es 45-46% idéntica a los criptocromos humanos (*Hscry1* y *Hscry2*), 43% idéntica a la fotoliasa 6-4 de *Drosophila* y 23-30% similar a los criptocromos de las plantas (Egan et al., 1999). El CRY de *Drosophila* posee los residuos de unión al cromóforo/cofactor FAD y los de unión al ADN de las fotoliasas en su extremo carboxilo terminal (Emery et al., 1998).

El ARNm de *cry* se expresa en las neuronas laterales del SNC de *Drosophila*, sitio anatómico que coincide con las neuronas marcapaso de este organismo (Egan et al., 1999). El transcrito de *cry* es más abundante durante el día que durante la noche, ya que si se considera a ZT1 como la hora en que ocurre el encendido de la luz y a ZT12 como la hora en que se apaga bajo condiciones L:O 12:12, el ARNm cicla con un pico en ZT 1-5 y un valle en ZT 17. La persistencia de este ciclo, aunque con una menor amplitud bajo condiciones de obscuridad constante, demuestran que es regulado a nivel transcripcional y que no es producto de los ciclos de luz-obscuridad a los que se somete el organismo (Emery et al., 1998). El ciclo del ARNm de *cry* se ve afectado por mutaciones en los genes del reloj: *per*, *tim*, *clk* y *cyc*, lo que establece la existencia de una retroalimentación entre el marcapaso circadiano y *cry* (Emery et al., 1998). La evidencia anterior indica que el gen *cry* posee una regulación circadiana y sugiere que podría actuar como un gen del reloj (Emery et al., 1998).

La proteína CRY tiene un peso molecular de 60 kDa (Emery et al., 1998). Bajo un régimen de L:O 12:12 los niveles mínimos de CRY ocurren en ZT11-13 y los niveles máximos se alcanzan en ZT23. Sin embargo en obscuridad constante los niveles de CRY se incrementan a lo largo de las 24 h, comenzando a acumularse durante la primera hora del día subjetivo, alcanzando sus niveles máximos al final del mismo y comenzando a

acumularse de nuevo al día siguiente partiendo de los niveles que alcanzó la noche anterior (Emery et al., 1998). Estos hallazgos muestran que los niveles de CRY en *Drosophila* son influidos de manera importante por la luz, siendo la proteína muy inestable durante el día y estable durante la noche (Emery et al., 1998). Esta regulación fótica a nivel postraduccional y el hecho de que al sobreexpresar CRY se incremente la sensibilidad de las moscas a la luz de baja intensidad sugiere que CRY juega un papel en la fotorrecepción de *Drosophila* (Emery et al., 1998).

La mutación *cry<sup>b</sup>* (*cry baby*) que afecta al sitio de unión a flavina de CRY provoca que la proteína se degrade rápidamente sin acumularse. Los mutantes *cry<sup>b</sup>* no presentan un ciclo del ARNm de *cry*, además de que el ciclo de *per* y *tim* se ve afectado, por lo que se considera que CRY es capaz de autorregular su propia expresión (Stanewsky et al., 1998). El desplazamiento de fase que sufren las moscas silvestres tras la aplicación de pulsos de luz durante la noche temprana está ausente en los mutantes *cry<sup>b</sup>*, quienes además se comportan rítmicamente bajo condiciones de luz (Emery et al., 2000) y oscuridad constante (Stanewsky et al., 1998) mostrando así un defecto en la vía de entrada de la luz, sin embargo aún pueden sincronizarse a condiciones L:O 12:12 y a un segundo régimen de luz, lo que sugiere que no hay una pérdida completa de función en estos mutantes (Stanewsky et al., 1998).

Rosato y cols. (2001) encontraron que en presencia de luz, CRY, PER y TIM interactúan, y que aunque estén presentes en el mismo complejo, los sitios de unión a PER de CRY y de TIM son distintos. En la oscuridad, el complejo PER/CRY existe en forma independiente a la luz en el citoplasma, sin embargo existe algún factor nuclear que le impide a CRY asociarse con PER o con TIM en la oscuridad (Rosato et al., 2001). La proteína TIM es suprimida por la luz, sin embargo en los mutantes *cry<sup>b</sup>* TIM permanece constante (Stanewsky et al., 1998). El CRY de *Drosophila* interactúa físicamente con TIM de manera dependiente a la luz y en la oscuridad están presentes en el mismo complejo (Lin et al., 2001 y Rosato et al., 2001). Es probable que una reacción redox, inducida por la luz, sea la que active a CRY nuevamente y le permita unirse a las moléculas del reloj TIM y PER (Rosato et al., 2001). El trimero que se forma permite que CRY entre al núcleo (Ceriani et al., 1999), evita que TIM se degrade e impide que el dímero PER/TIM inhiba al factor de

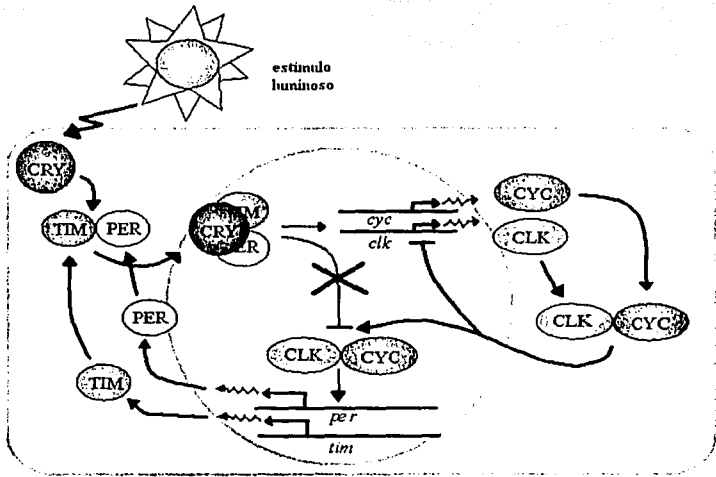
transcripción CLK/CYC, es decir, impide que realice su función de retroalimentación negativa dentro del asa molecular (Ceriani et al., 1999; Lin et al., 2001) (Figura 5). La degradación posterior de TIM ocurre como consecuencia de su ubiquinación, facilitada por CRY en presencia de luz (Lin et al., 2001).

La señalización de CRY ocurre gracias a la actividad redox mediada por la flavina y fomenta su degradación por el proteosoma al provocar un cambio conformacional en la molécula (Lin et al., 2001). Es posible que en respuesta a la luz, CRY transmita una señal que conduzca a la ubiquinación de TIM (Lin et al., 2001), el sensor de la entrada de luz del reloj (Egan et al., 1999), que posteriormente provoque su degradación por el proteosoma una vez que CRY se haya degradado (Lin et al., 2001).

Podemos resumir entonces que CRY funciona como fotorreceptor circadiano al integrarse al complejo PER/TIM de manera dependiente a la luz, lo que desemboca en la supresión de la retroalimentación negativa de PER/TIM sobre la actividad transcripcional de CLK/CYC (Figura 5). El efecto de la luz resulta en la reducción de los niveles de TIM por CRY que aparentemente intervienen en la sincronización del asa molecular del reloj circadiano que controla los ritmos conductuales en *Drosophila*, al desplazar al reloj al punto donde los niveles de TIM son comúnmente bajos (Devlin y Kay, 2001). El bloqueo de la actividad de PER/TIM permanece hasta que CRY es degradado y mientras el estímulo fótico se mantenga (Lin et al., 2001), alterando así el asa de retroalimentación negativa que comprende el reloj circadiano (Lucas y Foster, 1999). Al participar en la degradación de CRY y TIM, la vía de degradación ubiquitina/proteosoma puede ser uno de los primeros eventos que ayudan a poner a tiempo al reloj de *Drosophila* en respuesta a la luz (Lin et al., 2001).

Debido a que las mutaciones en los criptocromos no eliminan por completo la sincronización en la expresión rítmica de *per* y *tim*, se ha sugerido que otro fotorreceptor de la vía visual sincroniza este ciclo en las moscas, actuando como una vía redundante a los criptocromos (Devlin y Kay, 2001).





**Figura 5.** El CRY de *Drosophila* funciona como fotorreceptor circadiano al integrarse al complejo PER/TIM de manera dependiente a la luz, provocando la supresión de la retroalimentación negativa de PER/TIM sobre la actividad transcripcional de CLK/CYC. El bloqueo permanece hasta que CRY se degrada.

La conservación de los sitios de unión a ADN de la fotoliasa en el CRY de *Drosophila* permiten suponer que además de su función fotorreceptora, CRY podría actuar como un factor transcripcional y por lo tanto participar directamente en el reloj circadiano como parte integral del marcapaso en las neuronas laterales (Emery et al., 2000).

Se ha encontrado que CRY también se expresa en tejidos ajenos al SNC, como las antenas y las patas delanteras. Diversos estudios han encontrado que el papel de CRY en el sistema circadiano periférico difiere de aquél que juega en el SNC y que existen diferencias específicas entre cada tejido con respecto a la forma en que opera el oscilador molecular (Levine et al., 2002). En la periferia, CRY podría ser un componente central del oscilador o un componente de la sincronización no fótica, como la termorrecepción (Hall, 2000, Krishnan et al., 2001 y Rosato et al., 2001).

El sistema que permite reajustar el reloj de *Drosophila* es muy versátil ya que cuenta con los fotorreceptores extra-oculares de la estructura conocida como “ojuelo de Hofbauer Buchner”; también cuenta con los fotorreceptores retinianos de la vía de las rodopsinas que absorben en los periodos en que la luz es más intensa, y por último cuenta con los criptocromos (Hall, 2000), considerados como los fotorreceptores circadianos por excelencia (Lin et al., 2001), que absorben la luz azul durante el amanecer y el atardecer (Hall, 2000). Emery y cols. (2000) sugieren que CRY contribuye principalmente al ajuste del pico de actividad de la tarde, mientras que los ojos contribuyen a ajustar el pico de actividad de la mañana bajo condiciones L:O. En conjunto, estos fotorreceptores le permiten a la mosca mediar la sensibilidad a la luz a lo largo de distintas longitudes de onda (Hall, 2000).

#### 3.4.2. Mamíferos

En los mamíferos, la información luminosa se procesa en el marcapaso circadiano del NSQ para determinar la hora del día (Sancar, 2000). Los ojos son estructuras necesarias para la transmisión de la luz al reloj circadiano (Foster, 1998 en Stanewsky et al., 1998) y se sugiere que es ahí donde se localizan los fotorreceptores de los mamíferos (Sancar, 2000), aunque aún se desconoce la naturaleza exacta de todos ellos.

Hasta hace poco tiempo, el hecho de que los fotorreceptores extrarretinianos participaran en la sincronización del marcapaso a los ciclos de luz-obscuridad, como lo hacen en *Drosophila*, no era completamente aceptado y se atribuía esta función exclusivamente a la vía retiniana. Sin embargo, ahora se dispone de evidencias que apoyan la función fotorreceptora de los criptocromos en los mamíferos.

A pesar de que el espectro de acción de los mamíferos coincide con el espectro de aquellos fotopigmentos basados en opsinas (510 nm) y no con el de los criptocromos (350-450 nm) (Sancar, 2000), en los ratones con degeneración retiniana, es decir, con una degeneración en los conos y bastones causada por la mutación *rd/rd*, se produce la pérdida de la visión pero se mantiene su capacidad de sincronizarse a ciclos de L:O 12:12, de responder a la aplicación de pulsos de luz (Foster, 1991 en van der Horst et al., 1999) y de presentar

respuestas circadianas normales con un desplazamiento de fase dentro de un espectro de acción de 480 nm, muy cercano al de los criptocromos (Thresher et al., 1998). Lo anterior hace suponer que el sistema de fotorrecepción de los mamíferos es un sistema dual que podría involucrar a los criptocromos y a otra vía independiente de algún fotopigmento basado en opsinas (Thresher, et al., 1998; Devlin y Kay, 1999; Sancar, 2000 y Hall, 2000) o en tetrapirroles (Thresher et al., 1998). La melanopsina, un fotopigmento que se expresa en las células ganglionares de la retina, ha sido propuesta como probable fotorreceptor circadiano, responsable de llevar la señal luminosa al NSQ vía tracto retinohipotalámico (Morse y Sassone-Corsi, 2002).

La luz en los sistemas circadianos que es absorbida por los criptocromos de las células ganglionares y de la capa interna nuclear de la retina es enviada a través del tracto retinohipotalámico hacia el NSQ (Sancar, 2000). La luz captada por las opsinas de los conos y bastones localizados en la retina exterior (a través de la vía visual) es transducida por el nervio óptico hacia los centros visuales de la corteza cerebral (Sancar, 2000).

Se cree que la habilidad del reloj de desplazar la fase como respuesta a la luz puede deberse a la liberación de glutamato de las células ganglionares a los receptores en las neuronas del NSQ, o bien, a la degradación de BMAL1 en forma análoga al TIM de *Drosophila* (Morse y Sassone-Corsi, 2002), o ambas. Por lo tanto, el proceso de transducción luminosa por el mCRY de mamíferos no ocurre por la recepción neuronal directa del criptocromo, como en las moscas, sino probablemente la señal una vez captada es transportada en forma de una señal axonal (Hall, 2000). En animales pequeños y parcialmente transparentes como las moscas, la luz puede penetrar fácilmente en el cuerpo y sincronizar a los relojes periféricos, sin embargo en animales de mayor talla como los mamíferos, se requiere de un control neurohormonal de las oscilaciones de los órganos internos (Allada et al., 2001).

Tanto en el ratón como en el humano, se han encontrado dos criptocromos (mCRY1 y mCRY2 en ratones, y HsCRY1 y HsCRY2 en humanos) cuyos pesos moleculares se encuentran alrededor de los 65 kDa (Griffin et al., 1999). Ambos criptocromos se expresan diferencialmente (Sancar, 2000). El ARNm de *mCRY1* es abundante en el NSQ, donde oscila circadianamente, mientras que el de *mCRY2* es abundante en la capa interna nuclear de la retina y no oscila (Griffin et al., 1999). Se sabe que la transcripción de *mCRY1* no está

regulada por la luz (Miyamoto y Sancar, 1999) y se sugiere que la ritmicidad circadiana en la transcripción de su ARNm es controlada por el factor de transcripción CLK/BMAL1 a través de una caja E (Lucas y Foster, 1999 y Kume et al., 1999) (Figura 6). Debido a la arritmicidad que muestra el ARNm de *mCRY2*, la ritmicidad que se observa en su proteína debe ser causada por procesos post-transcripcionales (Lucas y Foster, 1999).

Los criptocromos mCRY1 y mCRY2 modulan de manera antagonista el periodo del reloj circadiano (van der Horst et al., 1999). El mutante de *mCRY1* sufre un acortamiento de una hora en el periodo del ritmo locomotor en O:O, presenta fallas en la inducción por la luz de *per1* y en condiciones L:O 12:12 mantiene los niveles de *mper1* cercanos a los de su máxima expresión (van der Horst et al., 1999). La mutación de *mCRY2* por el contrario, provoca un alargamiento de una hora en el periodo conductual en O:O, incrementa la sensibilidad en el desplazamiento de la fase del ritmo y provoca un efecto similar a *mCRY1* sobre *mper1* en condiciones L:O 12:12 (Thresher et al., 1998). En O:O los mutantes de *mCRY2* no presentan alteraciones en el periodo de expresión de *mper1* y *mCRY1* (Thresher et al., 1998). El doble mutante sufre alteraciones en la inducción de *mper1* por la luz, y bajo condiciones O:O carece de ritmicidad molecular y conductual, reflejando un colapso en el reloj molecular (van der Horst et al., 1999). No existe un ciclo de *mper1* o *mper2* bajo estas condiciones (van der Horst et al. 1999), sin embargo si existe una sincronización a la luz que indica un enmascaramiento de la deficiencia de los criptocromos por la luz (van der Horst et al., 1999). Ratonos portadores de una sola copia de *mCRY1* o de *mCRY2*, mantienen una ritmicidad bajo O:O, lo que resalta la importancia de los criptocromos para mantener la longitud del periodo y la ritmicidad circadiana en los mamíferos (van der Horst et al., 1999). Si los criptocromos actuaran exclusivamente como fotorreceptores, no deberíamos esperar que afectaran a la ritmicidad en O:O (Thresher et al., 1998). Las mutaciones en ambos criptocromos muestran que mCRY1 y mCRY2 tienen funciones parcialmente redundantes, pero también parcialmente complementarias.

Ambos criptocromos se asocian con mPER1, mPER2 y mPER3, transportándolos o reteniéndolos en el núcleo (Lucas y Foster, 1999 y Sancar, 2000) en donde inhiben la función del complejo CLK/BMAL1 (Figura 6). La translocación de mPER3 requiere de un trímero para llevarse a cabo (Kume et al., 1999). La asociación de los criptocromos con TIM es posible, especialmente para mCRY2 (Lucas y Foster, 1999 y Sancar, 2000) y al

unirse con mPER, facilitan su translocación al núcleo (van der Horst et al., 1999, Kume, et al., 1999 y Sancar, 2000) donde actúan en el asa de retroalimentación negativa del reloj molecular. Sin embargo, tanto mCRY1 como mCRY2 por sí mismos son potentes inhibidores del dímero CLK/BMAL1 (Kume et al., 1999) pues mCRY1 actúa sobre la caja E de BMAL1, o directamente con la proteína, mientras que mCRY2 se asocia con CLOCK (Griffin et al., 1999) (Figura 6).

De forma aislada o como parte de un complejo multiprotéico con TIM y mPER, los criptocromos bloquean la transcripción de *mper1* de forma independiente a la luz, al inhibir el complejo CLK/BMAL1 (Griffin et al., 1999). Sin embargo, es interesante saber que a diferencia del CRY de *Drosophila*, a la actividad inhibitoria de mCRY1 no le resulta esencial la transferencia intramolecular de electrones a través de la flavina (Froy et al., 2002). Es posible que los criptocromos regulen la acción represora de los otros inhibidores, ya que existe cierto antagonismo funcional con TIM (Griffin et al., 1999) y además se ha demostrado que existen complejos mPER/mCRY con diferentes potenciales de activación transcripcional, pues mCRY1 es un represor más fuerte que mCRY2, y mPER2 es un represor más fuerte que mPER1 (Oster et al., 2002). Como alternativa, Allada y cols. (2001) proponen que es mPER el que regula la actividad represora de los criptocromos.

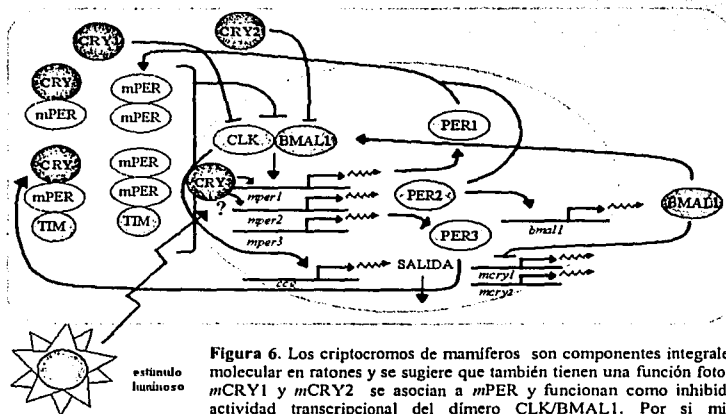


Figura 6. Los criptocromos de mamíferos son componentes integrales del reloj molecular en ratones y se sugiere que también tienen una función fotorreceptora. mCRY1 y mCRY2 se asocian a mPER y funcionan como inhibidores de la actividad transcripcional del dímero CLK/BMAL1. Por sí mismos, los criptocromos son potentes represores transcripcionales, mCRY1 actúa sobre CLK y mCRY2 sobre BMAL1. (modificado de Kume, 1999; Hall, 2000)

Estas investigaciones nos conducen a la conclusión de que ambos criptocromos tienen una función fotorreceptora antagonista para el ajuste del reloj por la luz, y ambos son también componentes integrales del reloj central que interactúan con los componentes principales del asa negativa de retroalimentación del marcapasos (Griffin et al., 1999 y Kume et al., 1999) en el cerebro (Krishnan et al., 2001) (Figura 6). *mcry1* podría ser la oscilación circadiana dominante del marcapasos de mamíferos (Kume et al., 1999), mientras que *mcry2* actuaría principalmente como una molécula fotorreceptora, que al igual que las fotoliasas, posee una función en la oscuridad y puede participar como parte del marcapasos (Griffin et al., 1999).

### 3.5 El acocil como modelo para el estudio de los ritmos circadianos

Los acociles son crustáceos decápodos de agua dulce y son los invertebrados dulceacuícolas móviles más grandes que se conocen (Holdich, 2002). Algunos acociles como *Procambarus clarkii* son organismos fisiológica y conductualmente muy adaptables. Se consideran especies clave del sitio en que habitan y tienen un impacto biológico importante debido a sus actividades tróficas, ya que son omnívoros pero principalmente depredadores (Holdich, 2002).

Los acociles han atraído el interés de anatomistas y fisiólogos, y ahora de los biólogos moleculares (Holdich, 2002). Estos crustáceos resultan excelentes sujetos para estudios etológicos. Debido a que los acociles han sido objeto de estudio de los electrofisiólogos, se dispone de una gran cantidad de información sobre su actividad nerviosa y sobre técnicas de estudio de una sola célula, o un grupo pequeño de ellas (Gherardi, 2002).

Las diferentes especies de acociles de agua dulce son en su mayoría nocturnas y presentan una gran variedad de ritmos circadianos controlados por funciones periódicas del sistema nervioso. Un gran número de estudios se han centrado en la ritmicidad circadiana en la actividad del acocil, principalmente en los ritmos de actividad locomotora y de sensibilidad retiniana, incluyendo los ritmos en el electroretinograma y en las migraciones de los pigmentos retinales (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003). Estos estudios confirman la

existencia de varios marcapasos circadianos distribuidos a lo largo del sistema nervioso en los acociles adultos (Page, 2001). Un ejemplo de ello es el ritmo circadiano de la sensibilidad retiniana que es controlado por un par de fotorreceptores retinianos y tres pares de osciladores: las células retinulares de los ojos, el sistema neurosecretor de los lóbulos ópticos y un par de posibles marcapasos cerebrales. Una gran cantidad de experimentos sugieren que el SNC y el sistema neuroendocrino controlan la generación y la coordinación de muchos de los ritmos conductuales y fisiológicos en el acocil (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003).

Muchas de las investigaciones sobre ritmos biológicos se han enfocado a la especie de acocil *Procambarus clarkii*. Este organismo puede encontrarse en todo tipo de cuerpos de agua, habita en charcas fangosas, praderas húmedas, campos de arroz, en lagos y en los fondos de arroyos lentos, abunda en los pantanos estacionales y en las aguas cenagosas, estando presente tanto en aguas dulces como saladas. *P. clarkii* es una especie considerada como invasora de ambientes aerobios y anaerobios que presenta una gran capacidad de adaptación. Se distribuye entre los 28° y los 59° de latitud norte. Su distribución nativa abarca el noreste de México y el sur-centro de los Estados Unidos (Huner, 1988).

### 3.5.1 Ritmos biológicos en el acocil

*P. clarkii* es un organismo en el que se han demostrado ritmos circadianos y estacionales que le permiten adaptarse a los cambios diarios y estacionarios de la luz. Los ritmos más estudiados encontrados en *P. clarkii* son el ritmo de actividad locomotora (Fanjul-Moles et al., 1996; Fanjul-Moles, 1998), el del consumo de oxígeno (Fingerman, 1955; Fanjul-Moles et al., 1998) y los cambios en la sensibilidad retiniana (Fanjul-Moles et al. 1987, 1992; Fanjul-Moles y Fuentes-Pardo, 1988, Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003).

La luz tiene un efecto sobre las estructuras neurales y endocrinas responsables del control del comportamiento y de las funciones metabólicas (Fanjul-Moles et al., 1998). La actividad de los acociles está regulada por la presencia o ausencia de luz. La muda y la reproducción parecen estar fotoperiódicamente reguladas (Fanjul et al., 1998). Los ritmos circadianos pueden ser sincronizados por ciclos de luz a través de fotorreceptores circadianos retinianos o extraretinianos (Fanjul-Moles, 1998; Prieto-Sagredo y Fanjul-

Moles, 2001; Page, 2001; Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003). En 1975, Page y Larimer demostraron que la ritmicidad en la actividad locomotora permanece tras la ablación de los pedúnculos oculares, sugiriendo que el ganglio supraesofágico era el origen de dicha actividad. La evidencia sugiere que el fotorreceptor principal para la sincronización de los ritmos en el acocil se localiza en el cerebro, pero para que exista una ritmicidad normal se requiere tanto de los lóbulos ópticos, como de los lóbulos cerebrales (ganglio supraesofágico), ya que la lesión de alguna de éstas estructuras afecta a la ritmicidad, aunque no la suprime. Las investigaciones indican que ambas estructuras contienen osciladores circadianos, pero se desconoce la forma en que se integran las salidas del reloj (Page y Larimer, 1975; Page, 2001).

Page y Larimer (1975) demostraron que los fotorreceptores que participan en la sincronización del ritmo del ERG en *P.clarkii* no se localizan en la retina o en el ganglio caudal, sino que ésta se debe a fotorreceptores extraretinianos y extracaudales que se localizan en el ganglio supraesofágico (Page y Larimer, 1975; Page, 1982). Estos autores proponen que tanto fotorreceptores retinianos, como extraretinianos podrían estar involucrados en la sincronización del ritmo de ERG y de la actividad locomotora en los acociles adultos (Page, 2001, revisión en Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003). Por otro lado, Fanjul-Moles y cols. (2001) demostraron que la maduración ovárica es inducida por fotorreceptores extraretinianos, los cuales podrían ser responsables de las respuestas fotoperiódicas y circadianas del acocil (Fanjul-Moles et al., 2001).

Los acociles son animales nocturnos y se ha visto que su nivel de respuesta a la luz varía a lo largo de las 24 h, con un umbral más bajo durante la noche que durante el día (Aréchiga et al., 1993). Los acociles muestran cambios circadianos en la posición de los pigmentos accesorios de la retina (Fingerman y Lowe, 1957 en Durán, 2002) y en la actividad eléctrica de los fotorreceptores visuales y extraretinianos (Fanjul-Moles et al., 1987; Prieto-Sagredo y Fanjul-Moles et al., 2001). La luz es un factor dominante en el proceso de muda y en la maduración gonadal en estos organismos (Castañón-Cervantes et al., 1995 y Fanjul-Moles et al., 2001).



Estudios realizados por Fanjul-Moles y Fuentes-Pardo en 1988 mostraron que existen variaciones significativas en la detección de la luz monocromática a lo largo del desarrollo del acocil. Durante la ontogenia de *P. clarkii* la sensibilidad a la luz de longitudes de onda corta (azul y UV) es la primera en aparecer, desarrollándose con rapidez durante las primeras semanas de desarrollo. Conforme el acocil se desarrolla, aparece la sensibilidad a longitudes de onda más largas (verde y roja), la cual predomina; sin embargo la sensibilidad a la luz azul prevalece. Estos autores sugieren que el sistema circadiano de fotorrecepción de onda corta involucra la regulación neural, mientras que el de onda larga involucra al sistema endocrino, en especial a la glándula sinusal (Fanjul-Moles y Fuentes-Pardo, 1988).

El espectro luminoso del ritmo electroretinográfico (ERG) del acocil cambia de manera similar durante el desarrollo, variando su sensibilidad a la luz (Fanjul-Moles et al., 1992). Estos trabajos sugieren la existencia de dos receptores circadianos, uno encargado de la detección de luz de onda corta, y otro de la detección de luz de onda larga.

En 1996, Bernal-Moreno y cols. construyeron una curva de sensibilidad del sistema circadiano a la luz azul donde se mostraban avances de fase durante el atardecer y la noche subjetiva temprana y retrasos de fase alrededor de la noche tardía y el amanecer. Esta curva de respuesta a la luz azul, junto con el espectro de acción de la fotosincronización del ritmo del ERG llevan a proponer a los criptocromos como uno de los grupos de fotorreceptores involucrados en la sincronización de los ritmos circadianos en *P. clarkii*.

#### **4. Planteamiento del problema**

Las investigaciones sobre los ritmos locomotores y del ERG del acocil *P. clarkii* han demostrado que existen dos grupos de fotorreceptores involucrados en la sincronización del reloj biológico en esta especie (Fanjul-Moles et al., 1992, Miranda-Anaya y M. L. Fanjul-Moles, 1997; Bernal-Moreno et al., 1996). El espectro de acción de la fotosincronización del ritmo ERG muestra que uno de los picos se encuentra en los 430 nm (Fanjul-Moles et al., 1992), que corresponde con el espectro de acción del criptocromo (350-450 nm) (Sancar 2000). Lo anterior plantea la posibilidad de que uno de los fotorreceptores involucrados en la sincronización de los ritmos en *P. clarkii* sea un integrante de la familia

de los criptocromos, al igual que en *Drosophila* (Emery et al., 1998). Por otra parte, no se puede descartar que la familia de CRY en los acociles juegue un papel diferente al de la fotorrecepción circadiana, como sucede en los mamíferos. En los ratones se encontró que los dos criptocromos que existen, no solo juegan un papel como fotorreceptores, sino que parecen ser parte integral del mecanismo del reloj molecular (van der Horst et al., 1999). Si en *P. clarkii* el criptocromo es un elemento del reloj, una de sus características debe ser la presencia de un comportamiento oscilatorio en condiciones de obscuridad constante.

## 5. Objetivos

- 1) investigar la presencia del criptocromo (CRY) en las estructuras marcapaso del acocil.
- 2) estudiar la ritmicidad de la proteína CRY.

## 6. Hipótesis

Si el criptocromo se encuentra involucrado en el sistema de medición temporal del acocil *P. clarkii*, la proteína se expresará en los tejidos que conforman las estructuras consideradas como generadoras y/o sincronizadoras de los ritmos circadianos, los pedúnculos oculares y el cerebro.

Si el criptocromo es un elemento del mecanismo del reloj biológico del acocil, y no sólo funciona como fotorreceptor circadiano, la proteína deberá presentar una oscilación espontánea una vez que ha sido liberada en obscuridad constante.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Animales

Se emplearon 36 acociles machos adultos de la especie *Procambarus clarkii* provenientes de la localidad de Delicias, Chihuahua (27° 24' de latitud norte). Se establecieron dos lotes de 18 animales. Ambos lotes se aclimataron a condiciones de laboratorio en acuarios con

temperatura constante de 20-22° C y filtro biológico y se alimentaron con verduras cocidas (zanahoria, chayote y calabaza) una vez al día, sin horario fijo. Los animales se sincronizaron a ciclos L:O 12:12 durante 2 meses. Para facilitar la toma de muestras a lo largo de las 24 horas del día en condiciones experimentales, el primer lote fue sometido a un fotoperiodo normal (encendido de la luz a las 7:00 h.) y el segundo lote se colocó bajo un fotoperiodo invertido (encendido de la luz a las 19:00 h.).

El día del inicio del experimento, el fotoperiodo de los acuarios fue modificado a condiciones de obscuridad constante (oscilación espontánea) y así se mantuvieron hasta el día del sacrificio.

## *7.2 Sacrificio y toma de muestras*

El día 1 y 3 de obscuridad (24 y 72 horas después de la modificación del fotoperiodo) se sacrificaron tres acociles por cada punto de muestreo (3:00, 7:00, 11:00, 15:00, 19:00, y 23:00 horas). Se disectaron los cerebros y los pedúnculos oculares bajo el microscopio estereoscópico y se almacenaron las muestras de cada hora-día en 100  $\mu$ L de PBS pH 7.4. Los tejidos se procesaron utilizando un homogeneizador de tejidos tipo potter Elvehjem de 1.2 mL. Las muestras se almacenaron en un ultracongelador a -70 °C (REVCO ULT390-3-A31) para su análisis posterior.

## *7.3 Determinación de la concentración de proteínas (Método de Bradford)*

### *7.3.1 Curva estándar*

Se construyó una curva estándar utilizando albúmina de suero bovino (BSA). Se disolvieron 5 mg. de BSA en 10 mL de agua desionizada y se midió su absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ). La solución se ajustó con agua desionizada y/o BSA hasta que  $A_{280} = 0.33$ . A partir de la solución estandarizada de BSA (0.5 mg/mL) se realizaron las siguientes diluciones en tubos Eppendorf:

<i>Tubo</i>	<i>BSA (<math>\mu</math>L)</i>	<i>NaCl 0.15M (<math>\mu</math>L)</i>
1	0.0	150.0
2	7.5	142.5
3	15.0	135.0
4	22.5	127.5
5	30.0	120.0
6	37.5	112.5
7	45.0	105.0
8	52.5	97.5
9	75.0	75.0

Se añadieron 1.5 mL. de colorante de Bradford (Bio Rad) a cada uno de los tubos. Tras agitar en un vortex Maxi-mix I (Thermoline) se determinó la absorbancia a 595 nm. de cada uno de los tubos en una cubeta de cuarzo de 4 mL de capacidad con un espectrofotómetro Ultrospect 2000 (Amersham Pharmacia Biotech). Se graficó la cantidad de BSA de cada tubo ( $x$ ) contra su absorbancia ( $y$ ) y se realizó una regresión lineal en EXCEL 2000 (vs. 9.0.2812). La ecuación de la recta obtenida fue despejada para  $x$ .

### 7.3.2 Determinación de proteínas

Se colocaron 7.5  $\mu$ L de cada una de las muestras de cerebro y ojos en tubos Eppendorf. A cada uno se le añadieron 142.5  $\mu$ L de NaCl 0.15M y 1.5 mL. de colorante de Bradford (Bio Rad). Se midió la absorbancia de todos los tubos y los valores se introdujeron a la ecuación despejada de la curva estándar para calcular la cantidad de proteínas totales presentes en cada muestra.

#### 7.4 Electroforesis y Western Blot

En cada carril se colocó el equivalente a 40  $\mu\text{g}$  de proteínas totales del tejido homogeneizado para cada muestra de cerebro y de ojo de los dos días de sacrificio. En otros carriles, se cargaron 5  $\mu\text{L}$  del péptido control (Alpha Diagnostic) como control positivo, así como 5  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular MultiMark, Multi-Colored Standard (Invitrogen). Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) empleando el módulo para electroforesis Mini-Protean II (Bio Rad). Se utilizaron dos concentraciones de acrilamida para mejorar la definición de las bandas, para el gel superior una de 7.5%, y una para el gel de separación de 10% (3.33 mL de acrilamida, 2.5 mL buffer pH. 8.8, 4.17 mL de agua desionizada, 100  $\mu\text{L}$  de SDS 10%, 10  $\mu\text{L}$  de TEMED, 100  $\mu\text{L}$  de persulfato de amonio 10%). El gel se corrió a 100 V durante 20 min. y luego a 120 V durante aproximadamente 45 min., o hasta que la banda de pigmento azul se encontrara a 1 cm del borde inferior del gel.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Pharmacia Biotech) con ayuda del Mini Trans-Blot (Bio Rad) a 100 V durante 45-60 minutos. Después de sumergir la membrana en TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) se bloquearon los sitios de unión no específicos de la membrana incubándola con solución bloqueadora de gelatina 3% en TBS (Immun-Blot Assay Kit de Bio Rad) por 1 hora. Se retiró la solución bloqueadora y se realizaron dos lavados con TTBS (350  $\mu\text{L}$  Tween-20 en 700 mL de 1x TBS) en periodos de 5 minutos. Posteriormente se añadió la solución del anticuerpo primario anti-CRY de *Drosophila* generado en conejo (Alpha Diagnostic) en una dilución 1:800 en una solución de gelatina 1% en TTBS (Immun-Blot Assay Kit de Bio Rad) y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente cada membrana se lavó dos veces con TTBS en periodos de 5 min y se le añadió el anticuerpo secundario, una anti-inmunoglobulina de conejo en cabra acoplado a peroxidasa de rábano, en una dilución 1:3000 (Bio Rad) en una solución de gelatina 1% en TTBS (Immun-Blot Assay Kit de Bio Rad) por 2 horas. Una vez que la membrana fue lavada dos veces con TTBS y una vez con TBS en periodos de 5 min., se reveló con diamino-bencidina (DAB) (10 mg DAB, 20 mL PBS, 2  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% ) durante 45 min. La reacción se detuvo con dos lavados de 5 min de agua destilada y las membranas se dejaron secar prensadas en papel filtro.

Se realizaron 3 repeticiones de electroforésis y Western blot con las mismas muestras.

### 7.5 Análisis

Cada una de las membranas fue digitalizada en blanco y negro utilizando un Scanner Jet 3400C (Hewlett Packard). El área de las bandas de las membranas se midió en el programa Sigma Scan Pro (v. 4.01, SPSS Inc.) y su intensidad en Gene Tools (v. 3.00.22, Synoptics). A partir de los promedios de las 3 repeticiones de cada hora/día  $\pm$  el error estándar (EE) se realizaron cronogramas en Sigma Plot (v. 5, SPSS Inc.) con ayuda de Excel 2000 (v.9.0.2812, Microsoft Corporation). Para detectar las diferencias entre cada punto muestral, principalmente entre las crestas y los valles de las oscilaciones, se realizó un análisis de varianza para muestras homogéneas (ANOVA) y posteriormente una prueba *post hoc* (LSD) en Statistica (v.5.1, StatSoft Inc.) con los datos del área de las bandas. El programa COSENA (Ana Amelia Benedito Silva, vs. 3.1 1996) se utilizó para estimar el ritmo circadiano. COSENA emplea un método de análisis de cosinor simple usando un periodo de prueba; el programa ajusta los datos a una onda cosinusoidal y calcula si la amplitud del ritmo es distinta de cero, además de que proporciona los valores de estimadores como la acrofase, el mesor, la amplitud y el porcentaje del ritmo (Durán, 2002).

## 8. Resultados

### 8.1 Cerebro

Las figuras 8 y 9 muestran las oscilaciones de la abundancia de CRY en el cerebro de los acociles sacrificados durante las primeras 24 h de obscuridad constante. Los datos fueron obtenidos utilizando dos métodos distintos: 1) medición de la intensidad de las bandas y 2) medición del área de las bandas. En los cronogramas puede apreciarse que la mínima expresión de CRY se produce a las 15:00 h, que corresponde a la segunda mitad del periodo de exposición a la luz bajo las condiciones previas de sincronización (L:O 12:12). A partir de las 15:00 h la expresión de CRY va incrementándose hasta alcanzar su pico

máximo 12 horas más tarde (3:00 h), durante la noche tardía. En la figura 9 se detectó un ligero incremento en la abundancia de CRY a las 11:00, 4 h después del momento en que ocurría el encendido de la luz, en los días previos (7:00 h). La prueba *post hoc* LSD mostró una diferencia significativa entre los niveles máximos (3:00 h) y mínimos (15:00 h) de CRY ( $P < 0.05$ ).

El análisis de COSINOR ajustó significativamente el ritmo en la abundancia de CRY en los cerebros del primer día de oscuridad constante a un periodo de 25 h (Tabla 1).

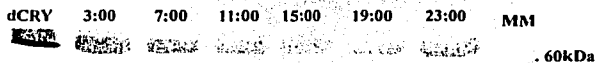


Figura 7: Western Blot de los cerebros de los acociles sacrificados a lo largo del primer día de oscuridad constante. Las bandas muestran el criptocromo detectado utilizando anti-CRY de *Drosophila* generado en conejo (Alpha Diagnostic). dCRY= control positivo, MM= marcador de peso molecular.

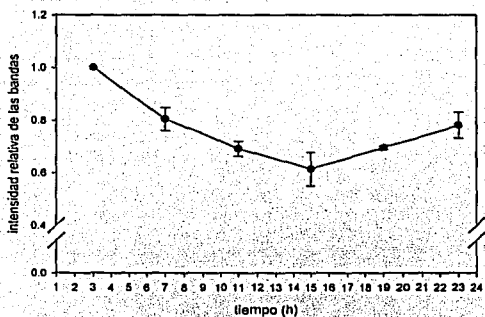
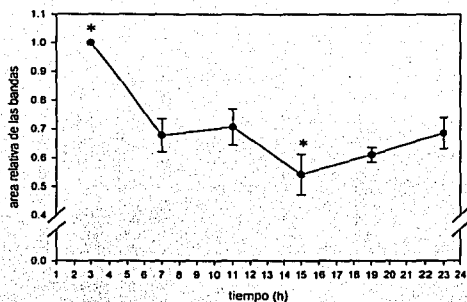


Figura 8: Cronograma de la expresión de CRY en los cerebros de los acociles sacrificados durante el primer día de oscuridad constante. Los puntos corresponden la media  $\pm$  EE. n=3.



**Figura 9:** Cronograma de la expresión de CRY en los cerebros de los acociles sacrificados durante el primer día de obscuridad constante. Los puntos corresponden a la media  $\pm$  EE, n=3. Los asteriscos muestran diferencias significativas en la prueba *post hoc* LSD ( $P<0.05$ ).

**Tabla 1:** resultados de COSINOR para las muestras de cerebro y pedúnculos oculares disectados durante el primer (1 O:O) y el tercer día (3 O:O) de obscuridad constante.

Muestra	Periodo (h)	Mesor	Amplitud	Acrofase	PR	P
Cerebro 1O:O	25:00	0.91 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.07	21.02 $\pm$ 0.30	87.76	0.000*
Cerebro 3O:O	20:30	0.82 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.04	18.44 $\pm$ 0.42	66.56	0.007*
	12:00	0.82 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.03	10.02 $\pm$ 0.27	44.66	0.007*
Ojo 1O:O	21:30	0.91 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.04	20.19 $\pm$ 0.41	68.71	0.006*
	12:00	0.89 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.03	1.01 $\pm$ 0.22	74.30	0.002*
Ojo 3O:O	25:30	0.78 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.08	18.01 $\pm$ 1.53	51.45	0.074

\* los datos son significativos

periodo: duración de un ciclo completo de la oscilación; intervalo entre dos puntos de referencia idénticos en la onda.

mesor: valor alrededor del cual oscilan los datos.

amplitud: es igual a la mitad de la diferencia entre los valores máximos y mínimos de la oscilación.

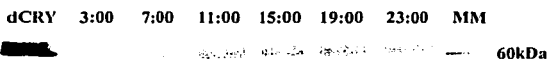
acrofase: tiempo en el que se alcanza la cresta de la función de la curva con el mejor ajuste.

PR= porcentaje del ritmo = porcentaje de los datos incluidos en el límite de confianza del 95% de la función coseno con mejor ajuste.



En los cronogramas de las figuras 11 y 12 se observa la abundancia relativa de CRY en los cerebros de los acociles sacrificados durante el tercer día de obscuridad constante. La abundancia en la inmunoreactividad a CRY tiene sus niveles máximos a las 19:00 (Fig.11) y a las 23:00 h (Fig.12). Los niveles de CRY disminuyen en dos ocasiones, siendo mínimos a las 7:00 h y a las 15:00 h (Fig.11 y 12). Mientras que un nivel mínimo de CRY se mantiene en lo que correspondería a la segunda mitad del día, bajo las condiciones previas de sincronización, el nuevo valle (7:00 h) coincide con el momento en que se esperaría el encendido de la luz. El comportamiento de la abundancia de CRY muestra un ritmo bimodal (Fig. 11 y 12), lo que coincide con los resultados del análisis de COSINOR en donde se obtuvo un ajuste significativo del ritmo para un periodo de 12 h ( $P<0.05$ ; Tabla 1) y para uno de 20:30 h ( $P<0.05$ , Tabla 1). La diferencia entre la abundancia máxima y mínima de CRY resultó ser significativa en la prueba *post hoc* LSD ( $P<0.05$ ).

La amplitud de la oscilación se amortiguó en un 47.06% (Tabla 1) con respecto a la amplitud del ritmo presente en el primer día en obscuridad constante. Las figuras 11 y 12 sugieren que la fase del ritmo se adelanta en el tercer día de obscuridad constante, al alcanzarse los niveles más altos de CRY alrededor de 4 u 8 h antes de lo observado en el primer día de O:O (Fig. 8 y 9). Posteriormente los niveles de CRY decaen.



**Figura 10:** Western Blot de los cerebros de los acociles sacrificados a lo largo del tercer día de obscuridad constante. Las bandas muestran el criptocromo detectado utilizando anti-CRY de *Drosophila* generado en conejo (Alpha Diagnostic). dCRY= control positivo, MM= marcador de peso molecular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

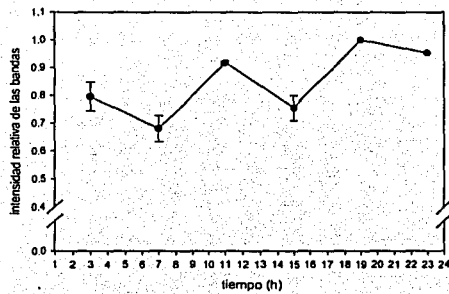


Figura 11: Cronograma de la expresión de CRY en los cerebros de los acociles sacrificados durante el tercer día de obscuridad constante. Los puntos corresponden a la media  $\pm$  EE. n=3.

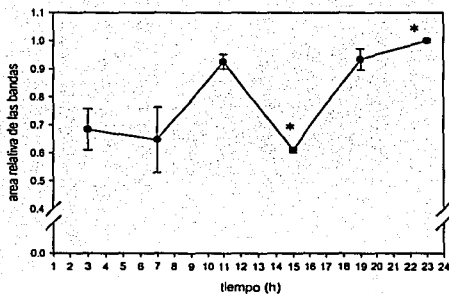


Figura 12: Cronograma de la expresión de CRY en los cerebros de los acociles sacrificados durante el tercer día de obscuridad constante. Los puntos corresponden a la  $\pm$  EE. n=3. Los asteriscos muestran las diferencias significativas detectadas en la prueba *post hoc* LSD ( $P < 0.05$ ).

## 8.2 Pedúnculos oculares

En los cronogramas de las figuras 14 y 15 se observan los cambios de CRY a lo largo del primer día de obscuridad constante en los pedúnculos oculares de los acociles. Los niveles más bajos de CRY coinciden con la hora del apagado de la luz (19:00 h) bajo las condiciones previas de L:O 12:12. Los niveles máximos de CRY se presentan a las 7:00 h (Fig. 14) y a las 11:00 h (Fig. 15). La prueba *post hoc* LSD demostró que existe una diferencia significativa entre los puntos máximos y mínimos de la abundancia de CRY ( $P < 0.05$ ). De acuerdo con COSINOR, el ritmo se ajustó significativamente a un periodo de 12:00 h ( $P = 0.002$ , Tabla 1) y a uno de 21:30 h ( $P = 0.006$ , Tabla 1), por lo que la oscilación se comporta de forma bimodal.

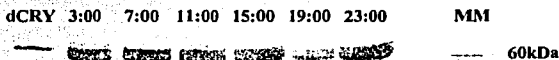


Figura 13: Western Blot de los pedúnculos oculares de los acociles sacrificados a lo largo del primer día de obscuridad constante. Las bandas muestran el criptocromo detectado utilizando anti-CRY de *Drosophila* generado en conejo (Alpha Diagnostic). dCRY= control positivo, MM= marcador de peso molecular.

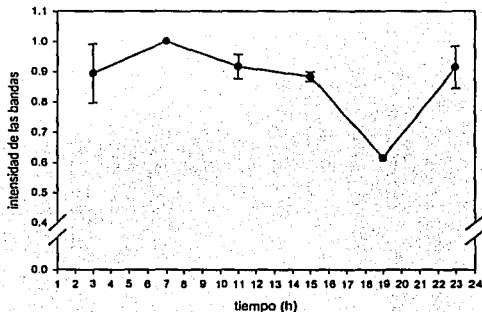


Figura 14: Cronograma de la expresión de CRY en los pedúnculos oculares de los acociles sacrificados durante el primer día de obscuridad constante. Los puntos corresponden a la media  $\pm$  EE.  $n = 3$ .

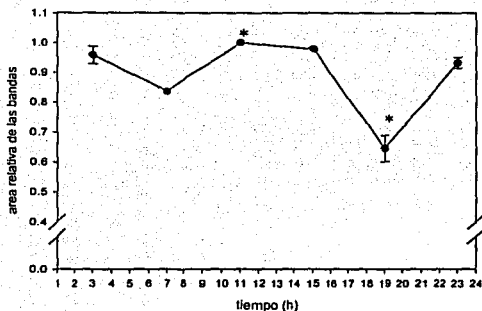


Figura 15: Cronograma de la expresión de CRY en los pedúnculos oculares de los acociles sacrificados durante el primer día de obscuridad constante. Los puntos corresponden a la  $\pm$  EE.  $n=3$ . Los asteriscos muestran la presencia de diferencias significativas en la prueba *post hoc* LSD ( $P<0.05$ ).

En las figuras 17 y 18 se pueden apreciar las oscilaciones de CRY en los pedúnculos oculares de los acociles sacrificados a lo largo del tercer día de obscuridad constante. El pico de abundancia de CRY ocurre a las 3:00 h (Fig. 17) y a las 23:00 (Fig.18), mientras que el valle permanece a las 19:00 h en la figura 17 y 18, aunque en la figura 18 se aprecia un valle más profundo a las 11:00 h. Las pruebas *post hoc* LSD no encontraron diferencias significativas entre el pico y el valle de la oscilación.

El ritmo de CRY en los pedúnculos oculares del tercer día en obscuridad constante no pudo ser ajustado por COSINOR a ningún periodo de forma significativa (Tabla 1).

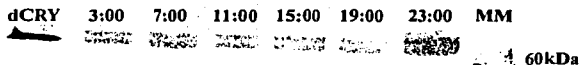


Figura 16: Western Blot de los pedúnculos oculares de los acociles sacrificados a lo largo del tercer día de obscuridad constante. Las bandas muestran el criptocromo detectado utilizando anti-CRY de *Drosophila* generado en conejo (Alpha Diagnostic). dCRY= control positivo, MM= marcador de peso molecular.

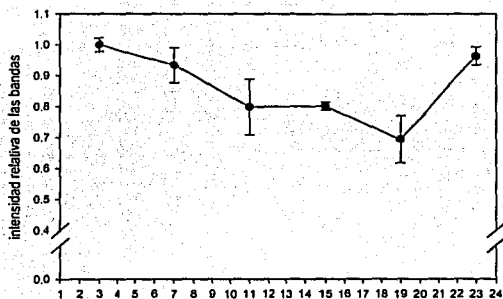


Figura 17: Cronograma de la expresión de CRY en los pedúnculos oculares de los acociles sacrificados durante el tercer día de obscuridad constante. Los puntos corresponden a la media  $\pm$  EE. n = 3.

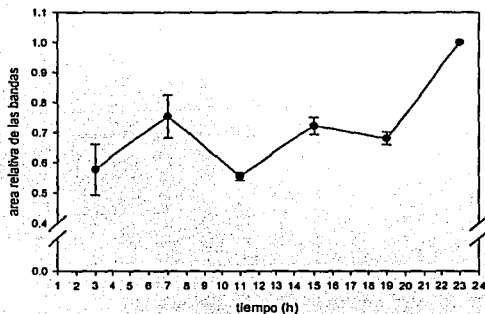


Figura 18: Cronograma de la expresión de CRY en los pedúnculos oculares de los acociles sacrificados durante el tercer día de obscuridad constante. Los puntos corresponden a la media  $\pm$  EE. n = 3.

## 9. Discusión

Los criptocromos son proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución, como se ha visto en bacterias (Brudler et al., 2003), en plantas (Lin, 2002), y en animales como *Drosophila*, el ratón y los humanos (Emery et al., 1998). Los anticuerpos contra el criptocromo de *Drosophila* (CRY) detectaron criptocromos en todos los Western blots que se realizaron, tanto en los pedúnculos oculares como en los cerebros de los acociles *P.clarkii* (Figura 7, 10, 13 y 16). La presencia del criptocromo en estas estructuras propuestas como marcapaso de los ritmos circadianos en el acocil (Page, 2001), así como su capacidad de oscilación espontánea, apoyan la hipótesis de que el criptocromo en esta especie esté participando como componente del reloj circadiano.

Una vez que los acociles fueron liberados en obscuridad constante, los criptocromos del cerebro mantuvieron una oscilación tras 24 y 72 horas (Tabla 1). El ritmo se amortiguó en un 47.06% del primer al tercer día de O:O, comportamiento muy similar al reportado por Emery y cols. (1998) para el ARNm del CRY de *Drosophila* al ser trasladado de condiciones L:O 12:12 a O:O. En el caso del CRY del acocil, esto podría indicar que existe cierta influencia de los ciclos previos de L:O sobre la amplitud del ritmo, sin embargo, la proteína oscila de manera endógena una vez que se libera de la sincronización. A diferencia del CRY de *Drosophila* que va acumulándose progresivamente bajo condiciones de obscuridad constante, sin mostrar la presencia de una ritmicidad (Emery et al., 1998), el CRY del acocil en cerebro si posee un comportamiento rítmico endógeno que se expresa tras permanecer 3 días en obscuridad constante. El periodo del ritmo de CRY en cerebro se modifica del primer (25 h,  $P<0.05$ ; Tabla 1) al tercer día de O:O (20:30 h,  $P<0.05$ ; Tabla 1), probablemente debido a la presencia de ciclos transitorios que anteceden a la expresión de la oscilación espontánea. El acortamiento del periodo de oscilación del criptocromo coincide con lo predicho por la ley de Aschoff (Aguilar-Roblero, 1993), donde se espera que en ausencia de claves temporales, los animales nocturnos presenten un acortamiento en el periodo de sus ritmos circadianos.

En los pedúnculos oculares; las oscilaciones del criptocromo resultan significativas durante el primer día en O:O ( $P<0.05$ ; Tabla 1); sin embargo dos días después se amortiguan y

pierden su comportamiento circadiano (Tabla 1). Lo anterior sugiere que en los pedúnculos oculares el criptocromo funciona exclusivamente como fotorreceptor, ya que sus oscilaciones parecen estar guiadas por los ciclos previos de L:O, en tanto que tras la ausencia de las claves luminosas el efecto de la luz sobre las fluctuaciones de la proteína se reduce.

La carencia de un ritmo endógeno del criptocromo en los pedúnculos oculares y su presencia en el cerebro del acocil, concuerda con las observaciones que se han hecho en otros organismos como *Drosophila*, donde se propone una doble función de los criptocromos, específica de los tejidos, ya que CRY actúa como un fotorreceptor en el cerebro y podría actuar como un componente del reloj en los tejidos periféricos (Krishnan et al., 2001). En los pedúnculos oculares del acocil el criptocromo podría estar desempeñando exclusivamente una función de fotorrecepción.

Para averiguar si efectivamente el papel del criptocromo en los pedúnculos oculares es el de un fotorreceptor, se deben llevar a cabo más estudios con organismos sincronizados a ciclos L:O y con organismos sometidos a pulsos luminosos para tratar de construir una curva de respuesta de fase.

Los resultados de este trabajo constituyen solo una parte de la investigación que debe realizarse con el fin de determinar si los criptocromos son elementos integrales del reloj biológico del acocil. Aún falta comprobar si la proteína y el gen que la codifica cumplen con las otras características que definen a las moléculas del reloj, lo cual requiere de técnicas de Northern blot, Western blot y otros estudios genéticos.

En esta investigación no se empleó una proteína constitutiva como referencia para las fluctuaciones en la cantidad del criptocromo a lo largo de las 24 horas del día. Esta referencia es comúnmente utilizada por los expertos en el área molecular de los ritmos (Emery, et al., 1998 y 2000; Miyamoto y Sancar, 1999; Lin et al., 2001, etc.) como control de carga de cada uno de los carriles del gel, con el fin de disminuir al máximo los errores humanos. En esta ocasión no fue posible el empleo de una proteína constitutiva como referencia, sin embargo es importante destacar que se tuvo extremo cuidado en cargar las cantidades adecuadas de muestra en cada uno de los carriles de los geles, lo cuál no exenta de la posibilidad de haber cometido errores de carga. Sin embargo se considera que su

efecto fue mínimo sobre los resultados obtenidos ya que los errores que pudieran afectar al experimento se redujeron considerablemente al realizar varias repeticiones con las mismas muestras.

Las variaciones circadianas del criptocromo se analizaron por dos métodos diferentes: se midieron las intensidades de las bandas por densitometría óptica (Gene Tools v. 3.00.22 Synoptics) y las áreas de las bandas (Sigma Plot v. 5, SPSS Inc.). Un tercer programa (Scion Image 4.0.2) confirmó los resultados obtenidos dando validez a los métodos de medición empleados. Por lo anterior podemos suponer que los datos obtenidos reflejan los cambios en la abundancia de la proteína en oscilación espontánea. En todos los casos, las gráficas mostraron gran similitud en el patrón de comportamiento del criptocromo, coincidiendo en las horas en que se presentaron los picos y los valles para cada uno de los experimentos. En general, los errores estándar fueron menores para las mediciones de la intensidad y mayores para las del área, lo que puede deberse a la intervención humana que se requiere para la medición del área, error que no incluye el programa Gene Tools al realizar la medición de manera casi automática.

El programa COSINOR ajustó la oscilación circadiana detectada en cerebro a un ritmo cosinusoidal de manera significativa ( $P = 0.05$ ), este resultado coincidió con los datos obtenidos de una ANOVA multivariada, en donde todos los puntos experimentales (3:00, 7:00, 11:00, 15:00, 19:00 y 23:00) resultaron significativamente distintos ( $F=9.3919$ ,  $P<0.001$ ). Ambos sistemas de análisis dan validez al descubrimiento de una oscilación endógena del criptocromo en el cerebro del acocil.



## 10. Conclusiones

- Proteínas pertenecientes a la familia de los criptocromos se expresan en las estructuras marcapaso del acocil *P. clarkii*, específicamente: en los pedúnculos oculares y el cerebro.
- En el cerebro del acocil existe una oscilación endógena del criptocromo que aparece tras un corto periodo de ciclos transitorios, posteriores al traslado del organismo a condiciones de obscuridad constante.
- Se sugiere que en los pedúnculos oculares el criptocromo no presenta un ritmo circadiano sino que su oscilación es causada por los ciclos L:O que ejercen un efecto de enmascaramiento sobre la proteína. En oscilación espontánea, en ausencia de claves luminosas, las oscilaciones del criptocromo se amortiguan, volviéndose arrítmicas en esta estructura.

## 11. Literatura citada

Aguilar-Roblero, R. (1993). Teorías básicas de los ritmos biológicos. *Psiquis* 2 (6): 121-132.

Alvarez, J. D. y A. Sehgal. (2002). Finer clock control. *Nature* 429: 798-799.

Allada, R.; P. Emery; J. D. Takahashi y M. Rosbash. (2001). Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks. *Annu. Rev. Neuroscience* 24: 1091-1119.

Aréchiga H.; F. Fernández-Quiroz; F. Fernández de Miguel y L. Rodríguez-Sosa. (1993). The circadian system of crustaceans. *Chronobiology Int.* 10: 119.

Aschoff, J.A. (1981). Survey in Biological Rhythms. En *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4. Biological Rhythms. (J. Aschoff, ed.) New York. Plenum Press: 3-10.

Bernal-Moreno, J.A.; M.Miranda-Anaya y M. L. Fanjul-Moles. (1996). Phase shifting the ERG amplitude circadian rhythm of juvenile crayfish by caudal monochromatic illumination. *Biological Rhythm Research*. 27 (3): 299-301.

Brudler, R.; K. Hitomi; H. Daiyasu; H. Ton; K. Kucho; M. Ishiura; M. Kanehisa; V. A. Roberts; T. Todo; J. A. Tainer y E. Getzoff. (2003). Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution. *Molecular Cell* 11. Jan: 59-67.

Castañón-Cervantes, O; C. Lugo; M. Aguilar; G. González-Morán y M. L. Fanjul-Moles. (1995). Photoperiodic induction on the growth rate and gonads maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* during ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol.* 11A(2): 139-146.

Ceriani, M. F.; T. Darlington; D. Statenis; P. Más; A. A. Petti; C. J. Weitz y S. A. Kay. (1999). Light dependent sequestration of timeless by cryptochrome. *Science* 285: 553-556.

Daan S. y J. Aschoff. (2001). *The entrainment of circadian Systems*. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. 12. Circadian Clocks. (Takahashi, J. S., F. W. Turek y R. Y. Moore eds.). Plenum Publishers. NY: 7-43.

Devlin P. F. y S. A. Kay. (1999). Cryptochromes - bringing the blues to circadian rhythms. *Trends in Cellular Biology* 9.

Devlin P. F. y S.A. Kay. (2001). Circadian photoreception. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 677-694.

Dunlap, J.C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.

Dunlap, J.C. y J. J. Loros. (2001). Molecular Genetics of circadian rhythms in *Neurospora*, a prototypic circadian system. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. 12. Circadian Clocks. (Takahashi, J. S., F. W. Turek y R. Y. Moore eds.). Plenum Publishers. NY: 335-349.

Durán-Lizarraga, M. E. (2002). Variaciones circadianas en diferentes parámetros del sistema glutatión en dos especies de acocil. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM. Nov: 27-31.

Egan E. S.; T. M. Franklin; M. J. Hilderbrand-Chae; G. P. McNeil; M. A. Roberts; A. J. Shroeder; X. Zhang, y F. R. Jackson. (1999). An extraretinally expressed insect cryptochrome with similarity to the blue light photoreceptors of mammals and plants. *The Journal of Neuroscience* 19 (10): 3665-3673.

Emery, P. R. Stanewsky, Ch. Helfrich-Förster, M. Emery-Le, J. C. Hall, M. Rosbash. (2000). *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron* 26. May: 493-504.

Emery, P., W. V. So, M. Kaneko, J. C. Hall, y M. Rosbash. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95: 669-679.

Fanjul-Moles, M. L.; E. Moreno-Sáenz; N. Villalobos-Hiriart y B. Fuentes-Pardo. (1987). ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A (2): 213-219.

Fanjul-Moles, M. L. y B. Fuentes-Pardo. (1988). Spectral sensitivity in the course of the ontogeny of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 91A (1): 61-66.

Fanjul-Moles M. L.; M. Miranda-Anaya y B. Fuentes-Pardo. (1992). Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish (*Procambarus clarkii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 102A (1):99-106.

Fanjul-Moles. (1998). Ontogenetic study of a circadian rhythm in crayfish: pacemaker and entrainment. *Trends. Comp. Biochem. Physiol.* 5: 153-160.

Fanjul-Moles, M. L.; T. Bosques-Tisler; J. Prieto-Sagredo; O. Castañón-Cervantes y L. Fernández-Rivera-Río. (1998). Effect of variation in photoperiod and light intensity on oxygen consumption, lactate concentration and behavior in crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 68A: 477-485.

Fanjul-Moles, M. L.; S. Ruiz-Yáñez; M. Aguilar-Morales; J. Prieto-Sagredo y E. G. Escamilla-Chimal. (2001). Photoperiodic induction of ovarian maturation in crayfish *Procambarus clarkii* is mediated by extraretinal photoreception. *Chronobiology International* 18(3): 423-434.

Fanjul-Moles, M. L. y J. Prieto-Sagredo. (2003). The circadian system of crayfish: A developmental approach. *Microscopy Research and Technique* 60: 291-301.

Fingerman, M. (1955). The rate of oxygen consumption of the dwarf crawfish *Cambarellus suffelti*. *Tulane Stud. Zool.* 3: 103-116.

Froy, O.; D. C. Chang y S. M. Reppert. (2002). Redox potential: Differential roles in dCRY and mCRY1 functions. *Current Biology* 12. Jan 22: 147-152.

Gherardi, F. (2002). Behaviour. En *Biology of freshwater crayfish* (Holdich, D. M. ed.) Blackwell Science Ltd. Estados Unidos: 258-291.

Griffin, E. A. Jr.; D. Stakinis y C. J. Weitz. (1999). Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 286: 768-771.

Granados-Fuentes, D.; A. Salazar-Juárez; P. Vergara-Aragón; J. Escandón-Calderón; A. Vega-González y R. Aguilar Roblero. (1995). Los ritmos circádicos en mamíferos: conceptos, implicaciones y bases biológicas. *Temas selectos de neurociencias.* (J. Velásquez Moctezuma. Ed.) UAM. México: 433-458.

Halberg, F. (1959). Physiologic 24-hour periodicity in human being and mice, the lighting regimen and daily routine. En: R. B. Withrow (Ed.). *Photoperiodicity related phenomena in plants and animals.* Washington. A. A. S.: 803-878.

Halberg, F.; F. Caradente; G. Mormelissen y G. S. Katenas. (1977). Glossary of Chronobiology. *Chronobiology* 4. Suppl. 1.

Hall, J. (2000). Cryptochromes: sensory reception, transduction, and clock functions subserving circadian systems. *Current opinion in Neurobiology* 10: 456-466.

- Hastings, W. (2001). Mecanismos celulares y moleculares de la regulación circadiana en el dinoflagelado unicelular *Gonyaulax polyedra*. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, 12, Circadian Clocks. (Takahashi, J. S., F. W. Turek y R. Y. Moore eds.). Plenum Publishers. NY: 321-334..
- Holdich, D. M. ed. (2000). Biology of freshwater crayfish. Blackwell Science Ltd. E. U.: 3-27, 259-260, 327-328 y 541-576.
- Horton, H. T. (2001). Conceptual Issues in the ecology and Evolution of Circadian Rhythms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, 12, Circadian Clocks. (Takahashi, J. S., F. W. Turek y R. Y. Moore eds.). Plenum Publishers. NY: 45-57.
- Huner, J. V. (1988). *Procambarus* in North America and elsewhere. En Freshwater crayfish biology. Management and exploitation. (Holdich, D. M. & R. S. Lowery eds.). Croom Helm. Londres: 239-261, 426-479.
- Johnson, C. H. y T. Kondo. (2001). Circadian rhythms in Unicellular organisms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, 12, Circadian Clocks. (Takahashi, J. S., F. W. Turek y R. Y. Moore eds.). Plenum Publishers. NY: 61-77.
- Konopka, R.J. y S. Benzer. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.68. 2112- 2116. Citado en Young 1998.
- Krishnan B.; J. D. Levine; M. Kathlea; S. Lynch; H. B. Dowse; P. Funes; J.C. Hall; P.E. Hardin y S.E. Dyer. (2001). A new role for cryptochrome in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature* 411: 313-317.
- Kume, K. M.; J. Zylka; S. Sriram; L. P. Shearman; D. R. Weaver; X. Jin; E. S. Maywood; M. H. Hastings y S. M. Reppert. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. (1999). *Cell* 98: 193-205.
- Levine, J.D.; P. Funes; H. B. Dowse y J.C. Hall. (2002). Advanced analysis of a *cryptochrome* mutation's effects on the robustness and phase of molecular cycles in isolated peripheral tissues of *Drosophila*. *BMC Neuroscience* 3(5): 1-17.
- Lin, C. (2002). Blue light receptors and signal transduction. *The plant cell*: 5207-5225.
- Lin, F., W. Song, E. Meyer-Bernstein, N. Naidoo, A. Sehgal. (2001). Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. *Molecular and Cellular Biology*. Nov: 7287-7294.

- Lucas, R. y R. G. Foster. (1999). Circadian clocks: A cry in the dark? *Current Biology* 9: R825-R828.
- Meijer, J. H. (2001). Fotic entrainment in mammals. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. 12. Circadian Clocks. (Takahashi, J. S., F. W. Turek y R. Y. Moore eds.). Plenum Publishers. NY: 183-222.
- Menaker, M.; J. Takahashi y A. Eskin. (1978). The physiology of circadian pacemakers. *Ann. Res. Physiol.* 40: 501-525.
- Miranda-Anaya M., M. L. Fanjul-Moles. (1997). Nonparametric effects of monochromatic light on the activity rhythm of juvenile crayfish. *Chronobiology International* 14 (1): 25-34.
- Miyamoto Y. y A. Sancar. (1999). Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse. *Molecular Brain Research* 71: 238-243.
- Moore, R. Y. y R. K. Leak. (2001). Suprachiasmatic nucleus. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. 12. Circadian Clocks. (Takahashi, J. S., F. W. Turek y R. Y. Moore eds.). Plenum Publishers. NY: 141-179.
- Moore-Ede, M. C.; F. M. Sulzman y Ch. A. Fuller. (1982). The Clocks that Time us. Physiology of the Circadian Timing System. Harvard University Press. E. U.; 1-151.
- Morse D., y P. Sassone-Corsi. (2002). Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends in Neurosciences* 25. Dic. 2002: 632-637.
- Nitabach, M. N.; J. Balu y T. C. Holmes. (2002). Electrical silencing of *Drosophila* pacemaker neurons stops the free-running circadian clock. *Cell* 109. May 17: 485-495.
- Oster, H.; A. Yasui; G. T. J. van der Horst y U. Albrecht. (2002). Disruption of *mCRY2* restores circadian rhythmicity in *mPER2* mutant mice. *Genes & development* 16: 2633-2638.
- Page, T. L. ; J. L. Larimer. (1975). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II. The ERG, amplitude rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97: 81-96.
- Page, T. L. (1982). Extraretinal photoreception in entrainment and photoperiodism in invertebrates. *Experientia* 38: 1007-1013.
- Page, T. L. (2001). Circadian system in invertebrates. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. 12. Circadian Clocks. (Takahashi, J. S., F. W. Turek y R. Y. Moore eds.). Plenum Publishers. NY: 79-110.

Panda, S.; J. B. Hogenesch y S.A. Kay. (2002a). Circadian rhythms, from flies to human. *Nature*. 417. Mayo 16:329-335.

Panda, S.; M. P. Antoch; B. H. Miller; A. I. Su; A. B. Schook; M. Straume; P. G. Schultz; S. A. Kay; J. S. Takahashi y J. B. Hogenesch (2002b). *Cell* 109. May 3: 307-320.

Pittendrigh, C. S. (1981). Circadian systems: Entrainment. En *Handbook of Behavioral Neurobiology* (J. Aschoff ed.). NY: Plenum Press: 95-124

Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55: 17-54.

Prieto-Sagredo, J. y M. L. Fanjul-Moles. (2001). Spontaneous and light-evoked discharge of the isolated abdominal nerve cord of crayfish in vitro reveals circadian oscillations. *Chronobiology international* 18(5): 759-765.

Rosato, E.; V. Codd; G. Mazzotta; A. Piccin; M. Zordan; R. Costa y C. P. Kyriacou. (2001). Light dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Current Biology* 11: 909-917.

Sancar A. (2000). Cryptochrome: The second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception. *Annu. Rev. Biochem* 69: 31-67.

Stanewsky R.; M. Kaneko; P. Emery; B. Bereta; K. Wager-Smith; S. A. Kay; M. Rosbash y J.C. Hall. (1998). The cry<sup>3</sup> mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95: 681-692.

Thresher, R.J.; M. H. Vitaterna; Y. Miyamoto; A. Kazantsev; D. S. Hsu; C. Petit; C. P. Selby; L. Dawut; O. Smithies; J. S. Takahashi y A. Sancar. (1998). Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science* 282: 1490.

Turek, F. W. y J. S. Takahashi. (2001). Introduction to Circadian Rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. 12. Circadian Clocks. (Takahashi, J. S., F. W. Turek y R. Y. Moore eds.). Plenum Publishers. NY: 3-6.

Underwood, H. (2001). Circadian organization in nonmammalian vertebrates. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. 12. Circadian Clocks. (Takahashi, J. S., F. W. Turek y R. Y. Moore eds.). Plenum Publishers. NY: 111-140.

van der Horst T. J. G.; M. Muijtjens; K. Kobayashi; R. Tacaño; S. Kanno; M. Takao; J. de Wit; A. Verkerk; A. P. M. Eker; D. van Leenen; R. Buijs; D. Bootsma; J. H. J. Hoeijmakers y A. Yasui. (1999). Mammalian CRY1 and CRY2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398: 627-630.

van Gelder, R.N.; E. D. Herzog, W. J. Schwartz y P. H. Taghert. (2003). Circadian Rhythms: In the loop at last. *Science* 300: 1534-1535.

Vosshall, L. B. y M. W. Young (1995). Circadian rhythms in *Drosophila* can be driven by period expression in a restricted group of central brain cells. *Neuron* 15. 345-360. Citado en Young 1998

Young M. W. (1998). The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in *Drosophila*. *Annu.Rev. Biochem.* 67: 135-152.