# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE CIENCIAS

VARIACIONES DIARIAS DE LAS PROTEÍNAS PER Y TIM EN EL SISTEMA NERVIOSO DEL ACOCIL *Procambarus clarkii*.

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLOGA**

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

**ROSA MARÍA VELÁZQUEZ AMADO**

**DIRECTORA DE TESIS:**
**DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL**

**2009**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**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.

VNIVERSIDAD NACIONAL
AVTONOMA DE
MEXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS**
**Secretaría General**
**División de Estudios Profesionales**

**Votos Aprobatorios**

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**
**Jefe de la División de Estudios Profesionales**
**Facultad de Ciencias**
**P r e s e n t e**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Variaciones diarias de las proteínas PER y TIM en el Sistema Nervioso del Acocil *Procambarus clarkii***

realizado por **Velázquez Amado Rosa María** con número de cuenta **3-0010971-7** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

| | | |
|---|---|---|
| Propietario | Dra. María Luisa Fanjul Peña | |
| Propietario | Dr. Manuel Miranda Anaya | |
| Propietario<br>Tutora | Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal | |
| Suplente | Dr. Jorge Luis Hernández Aguilera | |
| Suplente | Dra. Silvia Arteaga Hernández | |

**Atentamente,**
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "**
**Ciudad Universitaria, D. F., a 30 de junio de 2009**
EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**DR. PEDRO GARCÍA BARRERA**

**Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.**

*"El mejor uso que le puedes dar a la vida es amar. La expresión del amor es el tiempo. El mejor momento para amar es ahora"*
*Rick Warren.*

# Dedicatoria.

A mis padres Minerva Amado y Sergio Velázquez que han sido pilar en mí formación y ejemplo de vida.

A mis hermanos Mine y Sergio Leonardo.

Siempre estarán en mis pensamientos y en mi corazón, los amo.

## Agradecimientos.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por forjar una parte importante de mi vida, por brindarme los recursos necesarios para mi formación de profesional.

Gracias Dra. Elsa G. Escamilla Chimal, mi directora por sus observaciones y correcciones en este trabajo, por todo el aprendizaje y ayuda. De manera especial Dra. María Luisa Fanjul Peña por permitirme participar en este proyecto y abrirme una ventana al mundo de la cronobiología, gracias por su accesoria, los comentarios y la revisión, gracias por su confianza. Gracias, M. en C. Julio A. Prieto Sagrado por la ayuda a lo largo del taller y las observaciones en la tesis. Gracias a ustedes por su guía y amistad.

Agradezco a mis sinodales Dra. María Luisa Fanjul Peña, Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal, Dr. Manuel Miranda Anaya, Dr. Jorge Luis Hernández Aguilera y Dra. Silvia Arteaga Hernández por su dirección y el tiempo en la revisión del trabajo de tesis.

Les agradezco, Dr. Jorge Humberto Limón Pacheco del Instituto de Neurobiología. Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva. Laboratorio de Plasticidad Cerebral UNAM y M. en C. Dr. Jorge Luís Ventura Gallegos técnico académico del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM por el apoyo, accesoria y ayuda en los ajustes de la técnica experimental.

A todos los neurocuates Marlen, Hugo, Bianca, Mara, Zu, Valeria, Jany, Lupita y Gaby por su ayuda en la realización de este trabajo, su consejo, compañía, escucha y amistad, porque le han dado al laboratorio ese toque especial, por los buenos deseos muchas gracias.

Gracias mamá por tu ejemplo de vida, entrega, humildad, y papá por tu fuerza, lucha diaria, a ambos por su amor, comprensión y apoyo, por estar a mi lado, gracias a mis hermanos Mine y Sergio por inspirarme confianza y alegría, porque también han sido mis amigos, por su compañía y apoyo incondicional.

Alberto Carlos por compartir tantas cosas y ahora que estas a mi lado en este día tan importante, gracias.

A tod@s mis amig@s de esta grandiosa Facultad de Ciencias: linda Verito, alegre Marisol, pequeña Ana, sonriente Gaby, agradable Lau, amigable Ale, Vania, Coniferofita, Claudia, Chabelita, Ixchel, Itzel, Erica, Adriana, Valeria, Janet, Jorgito, Fabián, Ivan, Jaime, Miguel, Abraham, Tona, Oliver, Memo, Memito, Hugo y Diego Fernando, con ustedes inicie esta travesía, por los momentos compartidos y su inmensa alegría. Mis amigas de la prepa, inseparable Petite Coccinelle Marisela y estrella de la suerte Mónica Los amigos de la vida Edith, Alma, Martha, Santiago, Josué, Rene, Sonia, Rosalía y Hernán.

Y a todos aquellos que han o siguen estando, porque cada uno de ustedes de distinta manera es una joya invaluable en mi camino.

Rosa María Velázquez Amado.

Este trabajo fue financiado por:
PAPIIT IN207008 y CONACYT 46193.
Proyectos de la Dra. María Luisa Fanjul Peña.

Y realizado en el Laboratorio de
Neurofisiología Comparada con la dirección
de la Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal.
Facultad de Ciencias. UNAM.

# ÍNDICE.

1. Resumen ..... 2

2. Introducción ..... 3
2.1. El acocil como modelo de estudio. ..... 3
2.1.1. Sistema Nervioso Central ..... 4
2.1.1.1. Pedúnculos oculares ..... 5
2.1.1.2. Ganglio cerebroide ..... 8
2.1.1.3. Cadena Ganglionar ..... 12
2.2. Ritmos biológicos ..... 13
2.2.1. Ritmos circadianos ..... 16
2.2.2. Control molecular del reloj circadiano ..... 18
2.2.2.1. Proteína del PERIODO ..... 24
2.2.2.2. Proteína TIMELESS ..... 26
2.3. Ritmos circadianos en el acocil *Procamburus clarkii* ..... 27

3. Planteamiento y justificación ..... 28

4. Hipótesis ..... 30

5. Objetivos ..... 30

6 Método ..... 31
6.1. Animales ..... 31
6.2. Disecciones y tratamiento del tejido ..... 31
6.3. Cuantificación de proteínas ..... 32
6.4. Western blott ..... 33
6.4.1. Electroforesis ..... 33
6.4.2. Electrotransferencia ..... 34
6.4.3. Inmunodetección ..... 35
6.5. Revelado ..... 35
6.6. Digitalización ..... 36
6.7. Análisis de los datos ..... 36

**7. Resultados** ..... 38
7.1. Pedúnculos oculares ..... 40
7.2. Ganglio cerebroide ..... 43
7.3. Cadena Ganglionar ..... 46

8. Discusión ..... 48

9. Conclusiones ..... 52

10. Referencias ..... 53

# 1. Resumen.

En especies de invertebrados como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y en mamíferos como el ratón *Mus musculus* se han logrado identificar componentes moleculares del reloj circadiano, dos de ellos son los genes *period* y *timeless* y sus respectivas proteínas PERIOD (PER) y TIMELESS (TIM). Para *Drosophila* ambos son importantes en la generación de la ritmicidad, así mismo se encuentra implicado *period* en mamíferos, sin embargo *timeless* al parecer no está relacionado directamente en la generación de estos ritmos. Ambas proteínas PER y TIM se expresan en órganos marcapasos, estas proteínas en *Drosophila* forman un heterodímero que se transloca al núcleo inhibiendo la vía de transcripción de sus propios genes formando un asa de retroalimentación negativa. Por otra parte en el ratón, PER se encuentra implicado en un proceso muy parecido al que pasa en *Drosophila* pero formando estos dímeros con otras proteínas en tanto el papel de TIM no está involucrado con está asa de retroalimentación negativa.

En el acocil *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) se han propuesto tres estructuras como posibles marcapasos circadianos: el pedúnculo ocular, el ganglio cerebroide y la cadena ganglionar, pero aún no se han identificado los mecanismos moleculares que generan las oscilaciones circadianas.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar si las proteínas PER y TIM se encuentran en las estructuras propuestas como marcapasos y determinar si estas proteínas presentan oscilaciones diarias o circadianas. Por lo anterior, se emplearon acociles adultos de la especie *Procambarus clarkii* en condiciones de luz-oscuridad 12:12 y en oscuridad constante durante 24 y 72 horas, se disectaron las tres estructuras y se procesaron mediante el Western blotting, las bandas obtenidas se digitalizaron y fueron analizadas por cosinor. Se encontró inmunopositividad para PER y TIM en el pedúnculo ocular, el ganglio cerebroide y la cadena ganglionar. Los resultados de Cosinor sugieren que las oscilaciones de las proteínas TIM y PER

presentan oscilaciones circadianas en el pedúnculo ocular. En el ganglio cerebroide la oscilación de TIM puede ser de naturaleza circadiana, en tanto la participación de PER no es clara. En la cadena ganglionar, PER tiene oscilaciones diarias, en tanto las de TIM son circadianas.

Por lo anterior, estos resultados aportan información para corroborar que en el pedúnculo ocular se encuentra un marcapaso circadiano, en el ganglio cerebroide y en la cadena ganglionar al encontrar oscilaciones de TIM que podrían ser de naturaleza circadiana y en está última un ritmo diario de PER.

# 2. Introducción

## 2.1. El Acocil como modelo de estudio.

Los crustáceos de agua dulce comúnmente llamados acociles, de la especie *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Figura 1) pertenecen al filum Artropoda, subfilum Crustacea, clase Malacostraca, orden Decapoda, suborden Pleociemata, infraorden Astacidae (Holdich, 2002). A este infraorden pertenecen siete familias: *Astacidae, Enoplometopidae, Glypheidae, Nephropidae, Parastacidae, Thaumastochelidae y Cambaridae*. La especie *P. clarkii* presenta dimorfismo sexual (Scholtz, 2002; Brusca y Brusca, 2002) y mide hasta 10 cm de largo del rostro al telsón cuando son adultos. Esta especie tiene una amplia distribución intercontinental a excepción de la antártica (Campos, 2005), en América del Norte se encuentra en las regiones central y sur de los Estados Unidos de América y al noreste de México (Hobbs, 1989).

**Fig.1. Acocil Adulto *Procambarus clarkii*.**

*Procambarus clarkii* es una especie importante desde el punto de vista económico ya que tiene una producción del 85% dentro del grupo de los decápodos de agua dulce en Estados Unidos de Norte América, también ha habido una importante producción en China y España, las producciones pueden ser muy variables debido a las fluctuaciones climáticas. El interés comercial de *P. clarkii* en Europa y Australia ha ido incrementándose en los últimos años. Sin embargo, la enorme adaptabilidad de ésta especie a los diferentes ambientes ríos, lagos, cavernas, charcas, marismas, lugares lodosos como los pantanos, etc. En los diversos microambientes *P. clarkii* es capaz de construir túneles que pueden usar como madrigueras lo que origina la susceptibilidad de desplazar a otras especies nativas. *Procambarus clarkii* es una especie nocturna y o crepuscular, el intervalo de la temperatura para su cultivo se encuentra entre los 18-25° C y la salinidad en el agua es de 0-5 ppt. (Lee y Wickins, 1992). Es un organismo omnívoro e incluso puede ser saprófago y tiene un nicho trófico amplio (Avault y Brunson, 1990; Correira, 2002).

### 2.1.1. Sistema nervioso central.

El acocil tiene un sistema nervioso ganglionar que se compone de un ganglio cerebroide, también llamado ganglio supraesofágico del cual se proyectan los pedúnculos oculares hacia la región frontal y hacia la caudal la cadena ganglionar, como se muestra en el esquema de la figura 2.

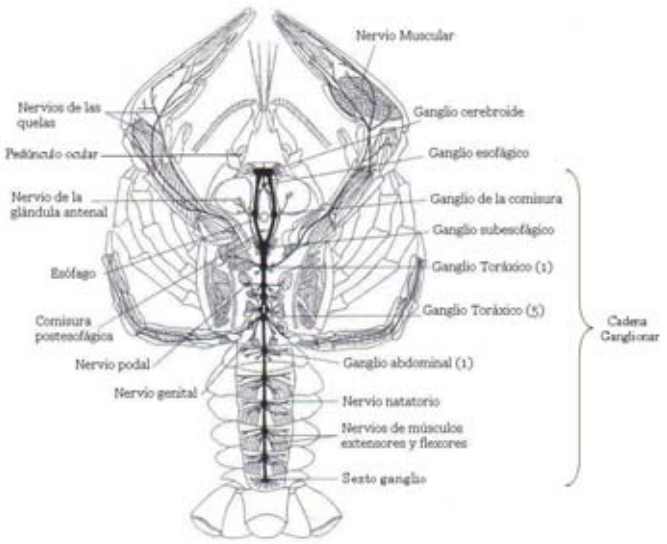


**Figura 2. Esquema en el que se muestra el Sistema Nervioso del Acocil.**
(Modificado de Keim, 1915).

Los ganglios formados por neuronas, se encuentran conectados de manera longitudinal por conectivos y transversalmente por comisuras. El sistema nervioso del acocil se compone de tres tipos de neuronas: **las neuronas sensoriales**, **las motoras y las interneuronas**, estas neuronas se asocian con tejido glial (Sandeman, 1982; Holdrich y Reeve, 1988).

### 2.1.1.1. Pedúnculos oculares.

El acocil posee dos ojos compuestos, uno en cada pedúnculo ocular, estos están superpuestos en los artrópodos. Los tallos oculares se pueden mover por medio de los músculos oculomotores.

El pedúnculo ocular formado por la retina y el lóbulo óptico, en su región más posterior constituye el protocerebro lateral, como se puede observar en la figura 3B. Este pedúnculo está formado por la retina y cinco neurópilos rodeados de neuronas periféricas los cuales son la lámina ganglionaris, la médula externa, la médula interna, la médula terminalis, el cuerpo

hemielipsoidal, y el complejo órgano-X-glándula sinusal (Hanström, 1924). Strausfeld y Nässel en 1981 proponen que la lámina, la médula externa, la médula interna y la médula terminalis podrían ser homólogas a la lámina, médula y lóbula de los insectos; también se forman dos quiasmas que son el resultado de una completa rotación de la médula externa durante el desarrollo embrionario, uno se encuentra entre la lámina ganglionaris y la médula externa, y el otro entre la médula externa y la médula interna.

Al cúmulo denso de neuronas situado en el margen ventral proximal de la médula terminalis se le llama órgano-X, está formado por cerca de 150-200 células (Cooke y Sullivan, 1982) las terminaciones axónicas de estas neuronas forman la glándula sinusal (GS). El OX-GS en los crustáceos es el principal centro de control neuroendocrino que media las diferentes adaptaciones metabólicas al ambiente, esta glándula está localizada en la parte dorso-ventral de la superficie del ganglio óptico, entre la médula externa e interna. Keller en el año 1992 reporta que el sistema OX-SG es un complejo que secreta fundamentalmente neurohormonas de naturaleza peptídica (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 2002).

La retina de los acociles está formada por diferentes subunidades llamadas omatidias, cada una de las cuales posee sus elementos ópticos. A lo largo de la vida del acocil, las omatidias aumentan en número y en talla (Bernhards, 1916; Vogt, 2002). Cada omatidia está compuesta por los siguientes elementos (Vogt, 2002):

- El *aparato dióptrico*, está formado por una seudocornea que es una cutícula transparente. Por debajo de esta, se encuentra el cono cristalino que incluye el tallo del cono cristalino, el cual se encarga de guiar la luz a la retina. El cono cristalino está formado por cuatro

células, la parte central es transparente y está rodeada por células accesorias que contienen el pigmento distal.

- La *retina fotosensible*, está formada por siete células retinulares que proyectan sus microvelloscidades en capas, con una orientación opuesta al centro de la ommatidia. Estas capas de microvelloscidades forman el rabdomo que absorbe la luz. Los pigmentos fotosensibles están localizados en las miles de microvelloscidades. Una octava célula retinular de talla reducida no participa en la formación del rabdomo principal, pero posee su propio rabddómero. Las células retinulares contienen el pigmento proximal. Los axones de las células retinulares pasan a través de espacios en la membrana basal y proyectan hacia la lámina ganglionaris.

- *Los pigmentos blindantes*. Cuando el organismo está en la luz los pigmentos distales se dispersan a lo largo del cono cristalino, y los pigmentos proximales se dispersan en las células retinulares, mientras que cuando se encuentran en la oscuridad los pigmentos distales migran hacia la región en la que se encuentran las células del cono cristalino permitiendo el paso de la luz al rabdomo de manera directa y los pigmentos proximales migran retrayéndose en dirección a la lámina basal, los movimientos de los pigmentos se ilustran en la figura 3A, así el ojo del acocil es altamente sensible (Shaw y Stowe, 1982; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 2002).
- *Las células del tapetum* o pigmento reflector se localizan entre los rabdomos por encima de la membrana basal.

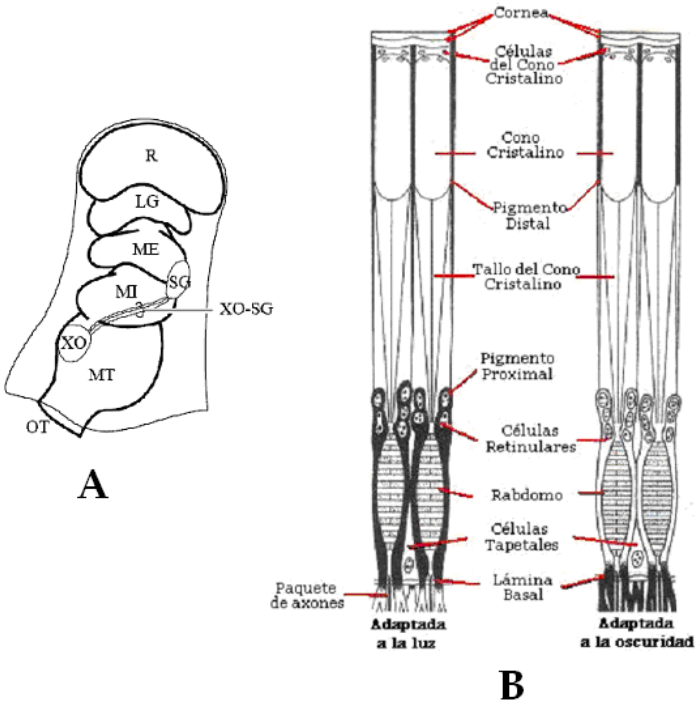


**Figura 3. Pedúnculo ocular y Omatidias.** A) Sección horizontal del pedúnculo ocular de *P. clarkii*. R, retina; LG, lámina ganglionaris; ME, médula externa; MI, médula interna; MT, médula terminalis; SG, glándula sinusal; OX, órgano-X; XO-SG, tracto órgano-X-glándula sinusal; OT, tracto óptico (Tomado de Escamilla-Chimal, *et al.* 2001).
B) En la parte izquierda se encuentra una ommatidia adaptada a la luz y a la derecha esta adaptada a la oscuridad (Modificado de Bernhards, 1916).

### 2.1.1.2. Ganglio cerebroide.

El ganglio cerebroide o ganglio supraesofágico incluye cerca de 80 000 neuronas, organizadas en neurópilos, grupos celulares periféricos, tractos neurales y comisuras, como se puede observar en la figura 4 (Vogt, 2002).

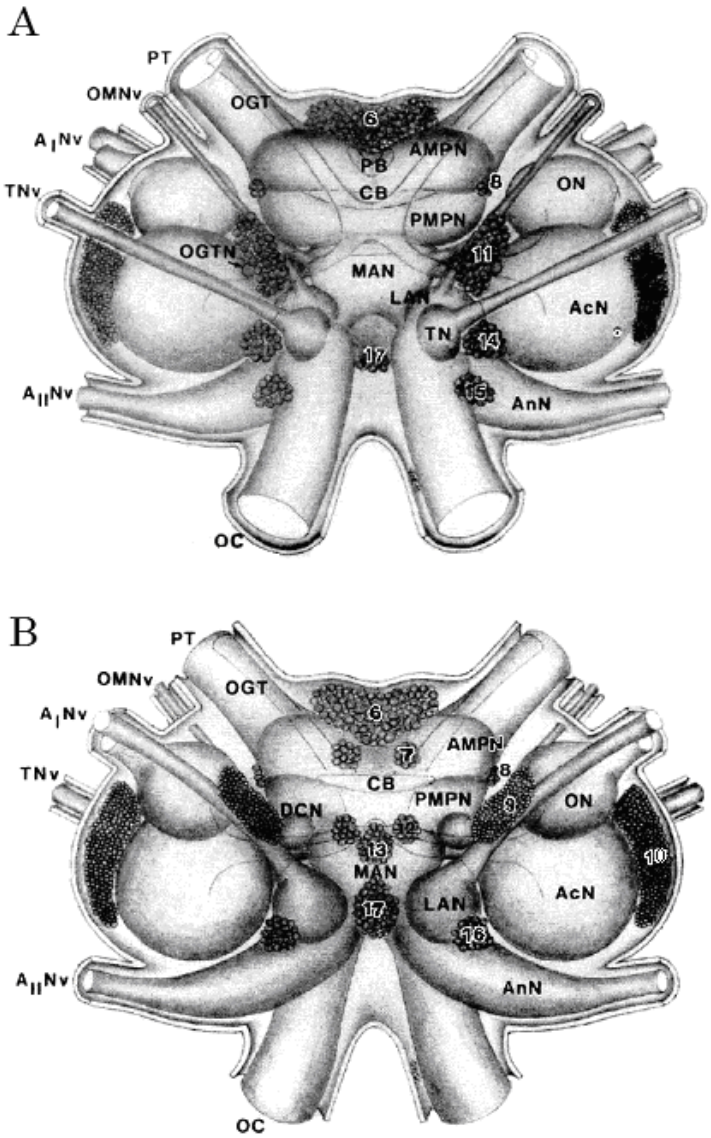


**Figura 4. Esquema que ilustra el cerebro del acocil.**
**A.** Vista dorsal y **B** ventral. *Nervios*: **OMNV**, Nervio medio anterior; **AINV**, Nervio I antenal; **TNV**, Nervio tegumentario; **AII N V**, Nervio antenal II. *Tractos*: **PT**, Tracto protocerebral; **Oc**, Conectivos oesofágeal; **OGT**, Tracto globular olfatorio. *Neurópilos*: **AcN**, Lóbulo accesorio; **ON**, Lóbulo olfatorio; **CB**, Cuerpo central; **DCN**, Neurópilo de la comisura deuterocerebral; **OGTN**, Neurópilo del tracto globular olfatorio; **PB**, Puente protocerebral; **MAN**, Neurópilo I antenal medio; **LAN**, Neurópilo antenal lateral I; **AMPN**, Neurópilo protocerebral medial anterior; **PMPN**, Neurópilo protocerebral medial posterior; **TN**, Neurópilo tegumentario. Los números indican los grupos celulares neuronales (Modificado de Sandeman, *et al.*, 1992).

El ganglio cerebroide se divide en tres regiones:

- **Protocerebro.**

El protocerebro a su vez se divide en dos partes:

- **El protocerebro lateral.** En esta zona se encuentra en el lóbulo óptico la médula terminalis, el cuerpo hemilipsoidal, el tracto protocerebral que une los une y el tracto óptico (Sandeman, *et al.*1988; Sandeman, *et al.* 1992; Sullivan y Beltz, 2001). En esta zona se encuentran dos grupos neuronales el 4 y 5 localizados de manera adyacente a la médula terminalis y el cuerpo hemielipsoidal respectivamente (Sandeman, *et al.* 1992).
- **El protocerebro medio**. Está formado por un par de neurópilos protocerebrales mediales anteriores y otro par de neurópilos posteriores además del puente protocerebral (Sandeman *et al.*, 1990 Sandeman *et al.*, 1992), el cuerpo central (Schürmann *et al.*, 1991). Destaca por su tamaño el grupo neuronal 6, también hay dos grupos pequeños el grupo 7 y 8 (Sandeman, *et al.* 1992).

- **Deuterocerebro.**

El deuterocerebro está formado por los lóbulos accesorios, la comisura deuterocerebral, los lóbulos olfatorios, el neurópilo del tacto globular olfatorio y los neurópilos antenales mediales y laterales. En esta zona resaltan el grupo neuronal 9 cuyos axones se dirigen al lóbulo olfatorio y al accesorio, en la parte lateral de ambos lóbulos destaca una población neuronal grande de pequeñas neuronas el grupo 10. El grupo 11 tiene neuronas grandes y pequeñas (Sandeman, *et al.* 1992). El deuterocerebro es el responsable

del procesamiento y la integración de las vías de entrada olfatorios (Derby y Blaustein, 1988). El lóbulo accesorio está compuesto de glomérulos pequeños esféricos, además es una estructura que se distingue por su tamaño de entre los otros neurópilos del ganglio cerebroide, es bilateral y está unido al otro lóbulo por un largo tracto, llamado comisura deuterocerebral compuesta por axones de una gran población de interneuronas que proveen a los lóbulos accesorios la entrada de vías visual, mecanosensorial y olfatoria. A diferencia del lóbulo olfatorio recibe vías de entrada multimodales (Sullivan y Beltz, 2001). Se ha interpretado que los lóbulos accesorios son centros integrativos sensoriales, también se asocian al estilo de vida nocturna del acocil (Vogt, 2002). Las principales vías de salida de ambos lóbulos accesorio y olfatorio se encuentran provistas de axones de una larga población de proyecciones neuronales cuyos somas están en los lóbulos laterales en el grupo 10; estos lóbulos proyectan sus axones formando un largo tracto llamado tracto globular olfatorio que une el cuerpo hemilipsoidal y la médula terminalis con los lóbulos accesorio y olfatorio (Sullivan y Beltz, 2001). El lóbulo olfatorio es una estructura esférica que se encuentra conectado ipsilateralmente al lóbulo accesorio y al neurópilo antenular lateral, por neuronas quimiosensoriales, varios autores han reportado que este lóbulo recibe terminaciones neuronales aferentes primarias de los quimiorreceptores de la antena I (Sandeman et al., 1992)

- **Tritocerebro.**

El tritocerebro incluye los neurópilos antenales, los neurópilos tegumentarios y los conectivos esofágicos que unen al ganglio cerebroide con el ganglio subesofágico y la cadena ganglionar (Sandeman y Sandeman, 1988).

### 2.1.1.3. Cadena Ganglionar.

La cadena ganglionar se localiza centralmente, está formada por una serie de ganglios pareados unidos entre sí por comisuras y de manera longitudinal por conectivos como se observa en la figura 5. Se sabe que los tres primeros ganglios se encuentran fusionados formando el ganglio cerebroide anteriormente mencionado, éste se une al ganglio subesofágico por las comisuras circumesofágicas (Holdich y Revee, 1988). El ganglio subesofágico se origina por la fusión de 7000 neuronas (Elofsson, 1986) que coordinan la actividad de las piezas bucales, los maxilipedos y la glándula antenal, la musculatura toráxica y el corazón (Vogt, 2002). Posterior a este ganglio se encuentra la cadena ganglionar que presenta cinco ganglios toráxicos y seis ganglios abdominales.

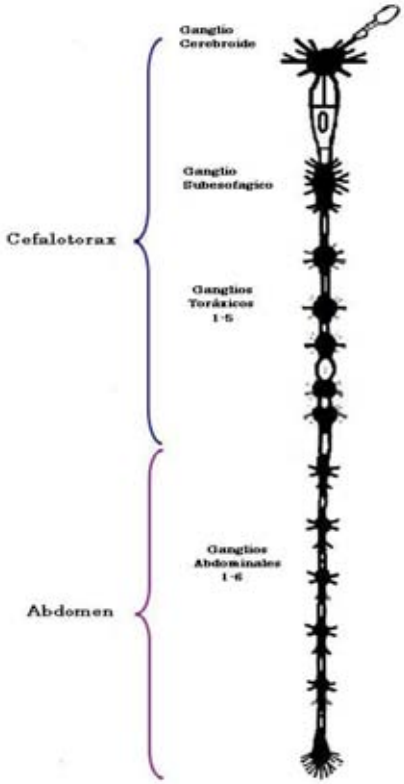


**Figura 5. Esquema del ganglio cerebroide y la cadena ganglionar del acocil**.
(Modificado de Aréchiga *et al.*, 1993)

Prosser en 1934, realizó una serie de experimentos para identificar un tipo de receptores que no se encuentran en la retina pero poseen las características de los fotorreceptores retinianos, los llamados fotorreceptores extraretinianos, él identificó un sitio fotosensible en la cadena ganglionar, una región en el sexto ganglio abdominal o también conocido como fotorreceptor caudal (FC) del acocil (Posser, 1934) que esta localizado en la parte anterior al sexto ganglio y en los conectivos entre el quinto y sexto ganglio en la parte ventral, contiene dos neuronas fotosensibles, el FC dispara actividad eléctrica espontánea y respuesta tónico-fásica a pulsos de luz (Rodríguez-Sosa, *et al.* 2005). Posteriormente, en 1987 Edward y Simon trazaron un modelo de ramificaciones dentríticas a lo largo de la cadena ganglionar a partir del fotorreceptor caudal encontrando que van al ganglio torácico y abdominal, y a los ganglios subesofágico y supraesofágico (Wilkens, 1988).

## 2.2. Ritmos biológicos.

La vida comenzó en un entorno cíclico, con periodos de oscuridad y de radiación. La radiación fue un recurso de energía para la organización y también para la destrucción de algunas moléculas primitivas. Durante el día había una intensa radiación ultravioleta a la que las primeras formas de vida no sobrevivieron por mucho tiempo, no se había desarrollado una organización temporal que limitara sus procesos más sensibles en la noche. Se sabe que organismos celulares como las Euglenas, las plantas y los animales multicelulares presentan ritmos fisiológicos diarios, con un ritmo de veinticuatro horas, siendo esta vista como una propiedad fundamental de la vida en los eucariotas (Brady, 1979).

Un **ritmo biológico** es la recurrencia en el tiempo de cualquier evento dentro de un sistema biológico (Aschoff, 1981) con una fase estable y produce variaciones periódicas, estas

integran procesos funcionales. En los organismos se pueden distinguir dos tipos de ritmos biológicos los homeostáticos como son las secreciones hormonales, el ritmo respiratorio, los potenciales de células excitables, ritmo de temperatura; y los ritmos geofísicos por ejemplo el ritmo de actividad-reposo, el ritmo de sueño-vigilia, ritmos lunares y las migraciones, por mencionar algunos, los seres vivos pueden utilizar un zeitgeber que significa "dador de tiempo" y es una señal ambiental (Pittendrigh, 1981). Por tanto, la ritmicidad es una propiedad inherente de la materia viva. El reloj biológico es una estructura orgánica que es capaz de generar un ritmo determinado.

Entonces los ritmos biológicos son fenómenos fisiológicos, bioquímicos, moleculares, y conductuales que presentan cambios cíclicos medibles, es decir oscilaciones que en una gráfica representan una onda, con un periodo relativamente constante (Vega, 1993). La repetición regular en el tiempo es en sí lo que define a un ritmo biológico y para caracterizar el lapso de tiempo en el que ocurre esta repetición podemos definir las siguientes características (Vega, 1993; Moore-Ede, *et al.* 1982):

- **Periodo:** es la característica más importante de una oscilación, definido como el intervalo de tiempo entre dos acontecimientos de referencia idénticos, es la duración de un ciclo completo y se expresa en unidades de tiempo. Al periodo del ritmo biológico se le simboliza con $\tau$ y al periodo del zeitgeber con la letra **T**.
- **Frecuencia:** es la inversa del periodo, es decir el número de veces que ocurre un evento a lo largo de un cierto tiempo.
- **Media:** (mesor, en el caso de que se trate de un análisis cosenoidal) es el promedio de todos los valores de un ciclo.

- **Fase:** es el tiempo estimado en el que ocurre un evento o el valor instantáneo de un ciclo. El símbolo de la fase del ritmo biológico es **φ**, la del zeitgeber es **Φ** y la relación de fase entre el zeitgeber y el ritmo biológico es **Ψ**.
- **Amplitud:** Es la diferencia entre el valor de la cresta y el valle. El símbolo de la amplitud del ritmo biológico es ***a***, y el de la amplitud del zeitgeber es **A**.
- **Acrofase:** es el punto máximo en una curva sinusoidal.
- **Índice de Actividad:** es la relación de alfa y rho, en donde alfa es el periodo de actividad y rho es considerado como el periodo en reposo.

Franz Halberg en 1959 introdujo la nomenclatura para los ritmos biológicos que utiliza el prefijo "circa" que significa "alrededor de" o "cercano a" agregándole el sufijo que determina la duración del periodo del ritmo ambiental o geofísico al que es asociado, llamándolos **circadianos, circamareales, circalunares o circanuales** (McClung, 2006). Otra forma de clasificarlos es a partir de su frecuencia es alta con respecto a 24 horas, a estos ritmos se les llama **ultradianos** y como el periodo es el inverso de la frecuencia, el periodo es corto, es decir menor a 20 horas. Si la frecuencia es muy baja se les llama **infradianos** y su característica es un periodo largo, mayor a 28 horas (Refeneti, 2000). Los ritmos que presentan un periodo de entre 20 y 28 horas se le llama circadianos por tener una duración cercana a 24 horas.

Una forma en la que el sistema interno del organismo se ajusta a los cambios diarios del ambiente es por medio de la sincronización, que es el mecanismo mediante el cual el organismo puede funcionar en coordinación con el orden temporal externo permitiendo que los seres vivos se adapten a las condiciones del hábitat y a los diversos ambientes en los que viven ajustando y anticipando procesos fisiológicos y conductuales a los arreglos cronológicos de las señales externas (Brady, 1979; Aschoff, 1981; DeCoursey, *et al.* 2004).

### 2.2.1. Ritmos circadianos.

Los seres vivos pueden ajustar sus actividades diarias a los cambios del medio ambiente a través del reloj circadiano.

Los ritmos circadianos se caracterizan por:

- Ser endógenos y tener un sistema interno para le medición del tiempo que se encuentra determinado genéticamente.
- Persistir en condiciones constantes.
- Poderse sincronizar a los ritmos ambientales que posean un periodo cercano o igual a 24 horas.
- Compensar los cambios de temperatura.

Un sistema circadiano posee uno o más osciladores que interactuan entre sí, se encuentre o no el organismo en un ambiente externo que sea capaz de sincronizarlo, manteniendo la característica endógena (Moore-Ede, *et al.*, 1982). Los osciladores deben estar internamente acoplados para así mantener la sincronía. Cada oscilador está sincronizado a ciclos ambientales específicos, de este modo debe haber transductores sensoriales que se encarguen de convertir la señal ambiental a una señal que reconosca.

En un sistema circadiano se pueden distinguir combinaciones de los elementos generales en las diferentes formas de vida. Los elementos de un sistema circadiano son los transductores, los osciladores primarios, secundarios, los efectores y los mediadores.

Como se observa en el diagrama de la figura 6, algunos modelos proponen que hay una señal que sincroniza al sistema, esta es el **"zeitgeber"**, un ejemplo es el ciclo diario de luz-oscuridad, esta señal es detectada por los receptores asociados a **transductores de señales** que

son los que reciben los cambios periódicos del ambiente y estos cambios se transforman en señales que pueden identificar los elementos internos del sistema. Los **osciladores primarios** o marcapasos censan el tiempo endógenamente, reciben la información de los cambios en el ambiente y proveen señales diarias de tiempo para el cuerpo vía transductores. El sistema circadiano se compone de uno o más marcapasos que muestran señales de tiempo que sincronizan al sistema en conjunto. Los **osciladores secundarios** o también llamados osciladores periféricos presentan oscilaciones autosostenidas que se sincronizan a través de mediadores y son los encargados de manejar los ritmos de las variables fisiológicas; algunos de estos osciladores secundarios son capaces de amortiguar las oscilaciones por lo que se hace más difícil identificar la ritmicidad. Los elementos pasivos son tejidos o subsistemas que no pueden mantener estas oscilaciones autosostenidas pero son considerados tejidos blanco del sistema circadiano. Y finalmente, los **mediadores** transmiten la información temporal de un sitio del cuerpo a otro en algún órgano llamado efector donde se lleva acabo la acción fisiológica, siendo así como los osciladores secundarios se acoplan al marcapasos (Moore-Ede, *et. al* ,1982).

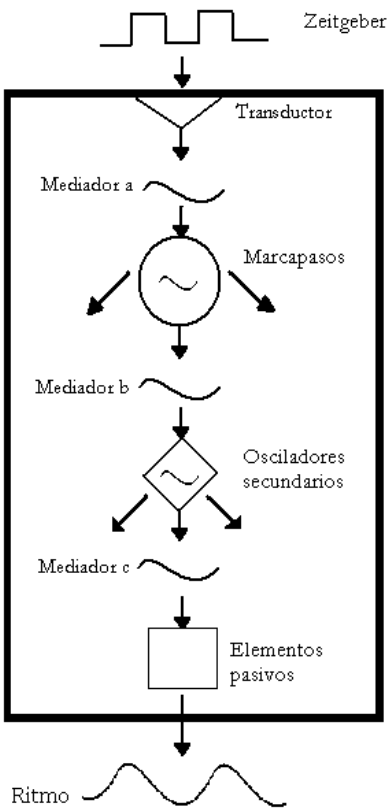


**Figura 6. Diagrama de los elementos del sistema circadiano.**
(Modificado de Moore-Ede *et al.* 1982)

### 2.2.2. Control Molecular del reloj circadiano.

El reloj a nivel molecular en cada grupo de organismos presentan genes propios y la regulación genética es distinta, pero a pesar de todas esas divergencias evolutivas hay mecanismos que los marcapasos circadianos conservan los cuales son una o más asas de retroalimentación positivas y negativas, como se ilustra en la figura 7, y promotores e inhibidores transcripcionales, lo que en conjunto forma la oscilación (Ver tabla 1) (Dunlap, 1999). A nivel molecular el reloj se pone a tiempo con las señales externas por medio de moléculas sincronizadotas, un ejemplo en *Drosophila* es CRY.

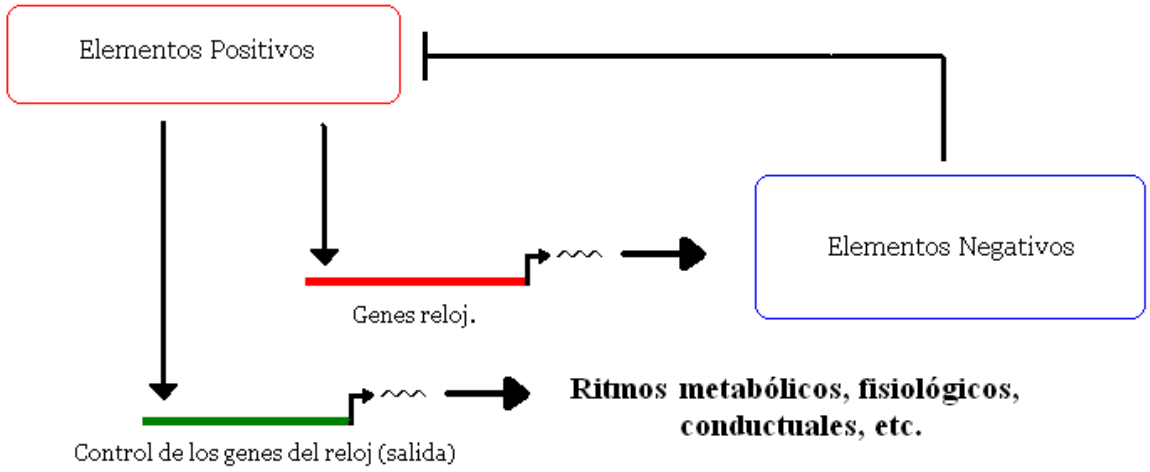


**Figura 7. Diseño de los elementos del Oscilador Circadiano**. Se muestran de forma esquemática los componentes de un oscilador en donde los elementos positivos activan la transcripción de genes del reloj y generan la transcripción y traducción de los elementos negativos que son proteínas que bloquean la actividad de los elementos positivos. Los elementos positivos también controlan genes de salida que están involucrados con la expresión de los ritmos metabólicos, fisiológicos, conductuales, etc. (Modificado de Dunlap, 1999).

Para entender el control de la ritmicidad circadiana se han realizado estudios genéticos en organismos como *Gonyaulax polyedra* y *Neurospora crassa*, en plantas como *Arabidopsis thaliana*, en los animales invertebrados como *Drosophila melanogaster*; y en mamíferos como *Mus musculus*. Para cada uno de estos sistemas se han hecho investigaciones con mutaciones genéticas que han permitido encontrar genes del reloj para después caracterizar su RNA y sus productos proteicos y así poder identificar los mecanismos celulares y moleculares de la ritmicidad circadiana.

En *Drosophila* se han caracterizado cinco genes que son necesarios para la ritmicidad circadiana, estos genes son: *period (per), timeless (tim), dclock (dclock), cycle (cyc)* y *double-time (dbt),* genes que codifican sus propias proteínas PER, TIM, CLOCK, CYC y DBT respectivamente (Young, 2002). A continuación se muestra en la tabla 1 los elementos génicos que se han identificado en *Drosophila* y en el ratón.

| Tabla 1. Genes del reloj y sus funciones en *Drosophila* y el ratón. | | | |
|---|---|---|---|
| **Organismo** | **Gen** | **Propiedades.** | **Referencia.** |
| ***Drosophila*** | *periodo (per)* | • El ARN y la proteína se expresan circadianamente.<br>• PER fosforilado es inestable.<br>• PER se une a TIM formando un heterodímero y este se une a dCLK-CYC generando un asa de retroalimentación negativa. | Zerr, *et al.*, 1990 y Hardin *et al.*, 1990. |
| | *timeless (tim)* | • TIM estabiliza a PER fosforilado promoviendo su localización nuclear, contribuye a la acumulación de PER.<br>• Se une a dCLK-CYC.<br>• Es degradado por la luz.<br>• Media el ajuste de fase en respuesta a la luz. | Gekakis *et al.* 1995 y Myers *et al.*, 1996. |
| | *dclock (dclk)* | • El ARN y la proteína ciclan de manera circadiana.<br>• dCLK tiene dominio PAS y forma un heterodímero con CYC.<br>• Esta proteína se puede unir a una secuencia promotora llamada E-box a través de su dominio bHLH, favoreciendo la transcripción de *per, tim, vri* y *pdf* e inhibiendo la de *clk*. | Lee *et al.,* 1998; Lee *et al.* 1999 y Subramanian, 2005. |
| | *cycle (cyc)* | • Expresión constitutiva.<br>• CYC posee un dominio PAS y un factor de transcripción bHLH, forma con CLK el asa de retroalimentación positiva.<br>• Esta proteína es homóloga a BMAL1 de mamíferos. | Lee *et al.* 1999; Darlington, *et al.,* 1998; Panda, *et al.,* 2002. |
| | *doubletime (dbt)* | • La expresión del gen es constitutiva. Es una caseína cinasa 1$\varepsilon$.<br>• La proteína se asocia físicamente con PER promoviendo su fosforilación y es requerida para la expresión rítmica del complejo PER-TIM. | Price *et al,*. 1998 y Panda, *et al.,* 2002. |
| | *criptocromo (cry)* | • La expresión del ARN cicla circadianamente.<br>• La proteína contiene una flavina que media la fotorrecepción circadiana.<br>• Es un elemento que se une a TIM dependiente de la luz produciendo su degradación por medio de un proteosoma.<br>• Puede ser esencial para algunos relojes periféricos. | Stanewsky *et al.* 1998; Naidoo *et al.* 1999; Panda, *et al.,* 2002 y Subramanian, 2005. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | *vrille (vri)* | • La transcripción de *vri* es activada por CLK-CYC, es un factor de transcripción negativo de *dclk* que regula *per, tim* y *pdf.*<br>• Las oscilaciones de VRI son necesarias para la expresión de *per* y *tim.* | Cyran *et al.,* 2003. |
| | *Proteína 1ε de dominio par. (pdp1ε)* | • La trascripción de *pdp1ε* también depende de la formación del complejo CLK-CYC.<br>• La proteína es un factor de transcripción positivo para dclk. | Cyran *et al.,* 2003. |
| | *Factor dispersor del pigmento (pdf)* | • La abundancia del ARN muestra ritmos circadianos.<br>• El control de la expesión del *pdf* y su proteína se lleva a cabo por CLK y CYC.<br>• PDF es un neuromodulador y es una señal de salida. | Park *et al.*, 2000; Subramanian, 2005. |
| **Ratón** | *periodo (mper)* | • El ARN cicla circadianamente.<br>• Las proteínas mPER forman complejos con mCRY1 y mCRY2 y translocan al núcleo.<br>• Hay tres homólogos al gen *per* de *Drosophila* que se han identificado *mper1*, *mper2* y *mper3* y oscilan en el NSQ y también se han localizado en tejidos periféricos. | Sherman *et al.* 1997; Takumi *et al.* 1998; Zylka *et al.* 1998. |
| | *tímeles (mtim)* | • No presenta oscilaciones circadianas.<br>• mTIM se encuentra en el núcleo. | Kume *et al.* 1999. |
| | *clock (mclk)* | • Forma un heterodímero con BMAL1 y se une a la secuencia E-box activando la transcripción de *mper1-3* y *mcry1.* | Gekakis *et al.* 1998. Dunlap, 1999. |
| | *bmal1* | • El ARN presenta ritmicidad en el NSQ y la retina. BMAL1 forma un heterodímero con CLK. | Gekakis *et al.* 1998; Dunlap, 1999. |
| | *Caseina cinasa 1ε (ck1ε)* | • Su expresión es constitutiva. CK1ε es una cinasa que fosforila a PER1 y PER2 en el citoplasma y afecta su estabilidad. | Price *et al* , 1998. |
| | *mcriptocromo1 y mcriptocromo 2 (mcry1 y mcry2)* | • mCRY se dimeriza con PER1-3. Y se une a CLOCK-BMAL1.<br>• Promotor de localización nuclear de mPer1-3.<br>• Su ARN cicla.<br>• Se asocia físicamente con PER, inhibe la transcripción de *per* y *cry.* | Kume, *et al.* 1999. |

*Cry* de *Drosophila* es homologo a *Bmal1* de ratón y *dbt* es homologo de *CK1ε* de ratón y *tau* de hamster. Debajo de cada gen se encuentran escritas sus siglas.

El oscilador circadiano de *Drosophila* como se muestra en la figura 8 se compone de dos asas de retroalimentación intracelulares para la expresión de sus genes, una está compuesta por el asa PER/TIM, que son los elementos negativos y otra es el asa CLK/CYC, que son los elementos positivos del control molecular. CRY (proteína criptocromo) es un fotorreceptor circadiano que interactúa con TIM produciendo la degradación de este último vía proteosoma. Los monómeros de la proteína PER son inestables cuando se encuentran fosforilados y desestabilizados por la proteína "DOUBLE-TIME" (DBT) manteniendo los niveles de PER bajos hasta que se acumule la proteína TIM durante la noche tardía y ambos formen un heterodímero que se transloca al núcleo e interactua con CLK-CYC formando un tetrámero he inhibe la actividad de este último. Por otra parte, los heterodimeros CLK- CYC activan la transcripción de los genes *per* y *tim* al unirse específicamente al elemento E-box. Se presenta un pico máximo de los transcriptos de *per* y *tim* al principio de la noche (Hardin, 2005; Subramanian, 2005; Zheng y Sehgal, 2008).

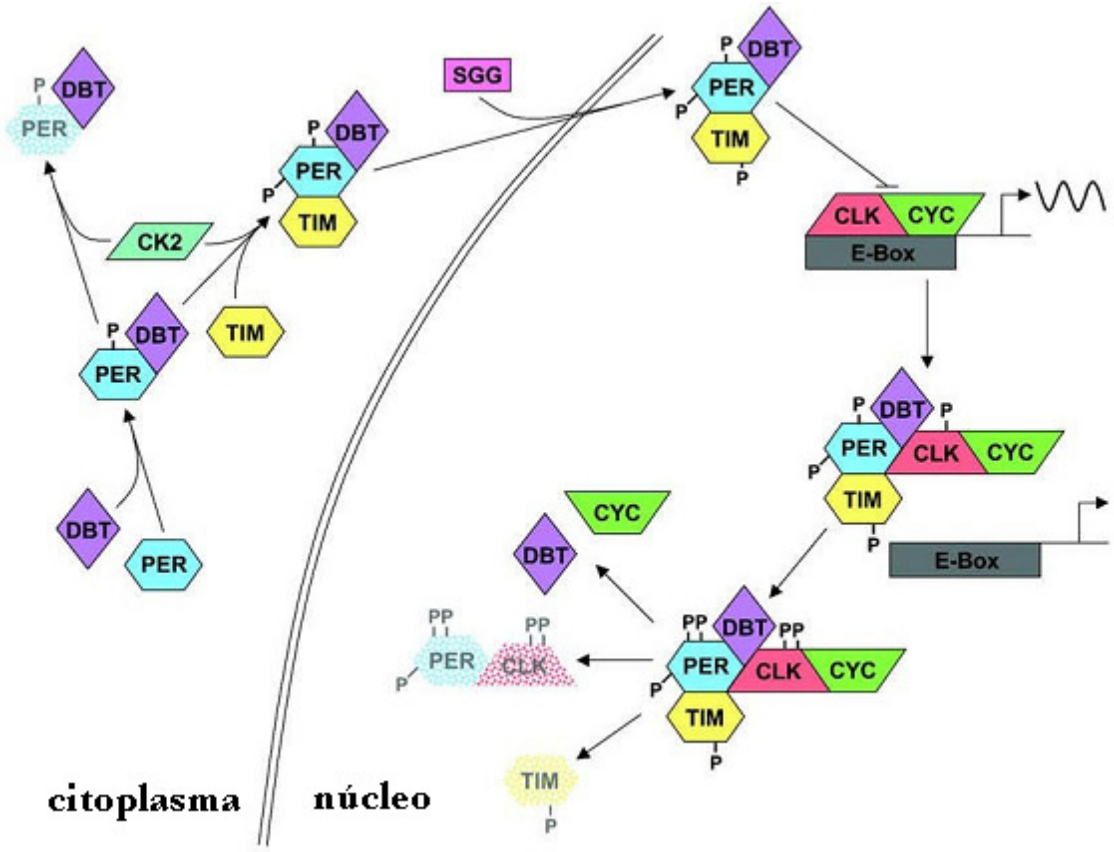


**Figura 8. Modelo de los componentes del reloj molecular en *Drosophila melanogaster*.** El heterodímero CLK-CYC un elemento positivo que reconoce una secuencia E-Box, induciendo la transcripción de genes del reloj como *per, tim, vri, pdf*, etc. y que codifican a sus propias proteínas. La proteína de PER interactúa con DBT y CK2, en donde PER es degradado por un proteosoma, por otro lado si TIM interactúa con este complejo PER forma un heterodímero y se transloca al núcleo con la la participación de SGG, en donde PER-TIM actúan como un elemento negativo de CLK-CYC. P indica la fosforilación de la proteína. (Figura tomada de Yu, *et al.* 2006).

**2.2.2.1. Proteína del PERIODO (PER).**

El gen *per* tiene un papel central en la regulación de los ritmos circadianos, su producto, la proteína PER, forma parte de los mecanismos que subyacen al reloj molecular.

En *Drosophila* las mutaciones en *per* alteran o suprimen el periodo de los ritmos circadianos en ritmos conductuales como son la eclosión y la actividad locomotora; en el cerebro *per* es el responsable de mantener los ritmos de actividad. Konopka y Benzer en una investigación relacionada con el cromosoma X de *Drosophila*, aislaron tres alelos mutantes de *per*: $per^{0}$ que produce arritmia, $per^{L}$ que presenta alargamiento del periodo de hasta 28 h, y $per^{S}$ que acorta el periodo hasta 19 horas (Konopka y Benzer, 1971; Young y Judd, 1978). Durante los años 80's *per* fue clonado y posteriormente se obtuvo la proteína de 1200 aminoacidos (aa) con un peso molecular de 127 KD que se encuentra predominantemente en el núcleo de la células (Baylies *et al,* 1987; Young, 1998; Subramanian, 2005).

Al comparar secuencias de *per* en cuatro insectos, se identificaron cinco regiones discretas de alta homología: una región de secuencias conservadas en alto grado que se encuentra en el N-terminal de PER de aproximadamente ~75 aa, una secuencia señal de localización nuclear (NLS), la región PAS y el dominio de localización citoplásmica (CLD) ambos median la interacción proteína-proteína. Se sugiere que la región CLD puede regular la actividad o estabilidad de la proteína (PAS y CLD tienen ~300 aa) y la región C2/C3 (~130 aa) en la que no se ha definido su función (Young, 1998).

El dominio PAS, una estructura altamente conservada que conforma a una superfamilia de factores de trascripción de interacción proteína-proteína, es un elemento que permite una interacción física con la proteína TIM mostrando no sólo el papel heterotípico de PAS sino

también homotípico; no se ha demostrado que PER tenga algún motivo de unión a las secuencias del ADN, a través de la cual se pueda unir con otros productos genéticos (Jackson *et al.,* 1986; Baylies *et al.,* 1993; Gekakis, *et al.* 1995).

Los ciclos del mARN y de la proteína se producen con una constante relación de fase en tejidos de ojo, cerebro, y tubos de Malpighi en *Drosophila*. Se han observado altos niveles de *per* ARN a dos horas después del apagado de la luz en ciclos LO 12:12 y la proteína se detecta en el núcleo con un retrazo de la acrofase de 4-6 h después de la acumulación del *per*RNA (Hardin *et al.*, 1990). Adicionalmente a la acumulación de la proteína, los ciclos de la fosforilación de PER parece que están involucrados varios sitios de la proteína y que el incremento de la fosforilación depende de la movilidad hasta que PER es degradado cerca de la madrugada. Además, se ha indicado que un mecanismo de regulación post-transcripcional podría contribuir a la regulación del gen *per* (Hardin *et al.*, 1990), pero no estrictamente a la transcripción de PER. Experimentos reportados por varios investigadores se ha demostrado que una parte de la regulación post-transcripcional ocurre a través de la fosforilación de PER y que influye en el metabolismo o en la actividad locomotora en *Drosophila* (Edery, et al., 1994; Young, 1998).

**2.2.2.2. Proteína TIMELESS (TIM).**

El gen *tim* codifica a una larga proteína de ~1400 aa llamada TIM (Myers, *et al.* 1995). El ARN de *tim* y su proteína ciclan de manera circadiana, y TIM presenta ritmos de fosforilación. La fase de su ARN es similar a la de *per*. TIM se acumula en el núcleo, en los fotorreceptores de los ojos y ocelos en la mosca.

Mutaciones en *tim* en el cromosoma 2, producen arritmia acortando el periodo ($tim^{s}$) y alargando el periodo ($tim^{L}$), además detienen el ciclo del ARN de *per* y bloquean la acumulación nuclear de PER ($tim^{0}$) (Sehgal *et al.*, 1994).

La coexpresión de las proteínas PER y TIM tiene como resultado la asociación física y la localización nuclear en donde TIM es totalmente requerido, es decir, la localización y la estabilidad de PER dependen de la acumulación de TIM porque el tiempo y la tasa de formación de los heterodímeros es influenciada por la oscilación de sus ARNs que presentan ritmos circadianos y la afinidad entre sus respectivas proteínas y la disminución de los monómeros de PER (Sehgal, *et al.*, 1995; Young, *et al.*, 1996). Los sitios de unión en PER que se involucran son dos: el dominio PAS y una secuencia adyacente CLD, en donde la región PAS-A interactúa con una región que presenta una señal de localización nuclear de TIM y el CLD interactúa con una segunda región de localización nuclear en TIM (Saez y Young, 1996).

Se a demostrado en *Drosophila* que cuando TIM es degradado por la proteína CRY (Sandrelli *et al.*, 2007) no se requiere para la expresión del reloj, siendo la alta sensibilidad de TIM la responsable de la sincronización de la fase de los ritmos circadianos a la condición de luz-oscuridad.

### 2.2.3. Ritmos circadianos en el acocil *Procambarus clarkii.*

En el acocil se han propuesto al menos tres estructuras en donde posiblemente se localizan marcapasos circadianos: el ganglio cerebroide (Barrera-Mera y Block, 1990), la retina (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Aréchiga, *et al.*, 1993; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998) y el sexto ganglio de la cadena ganglionar (Prieto-Sagredo y Fanjul-Moles, 2001; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2008).

Se han encontrado en la retina del acocil *Procamabarus clarkii* inmunoreactividad al anticuerpo anti-PER-S, PER-S es una región de PER altamente conservada en insectos (Siwichi *et al.* 1988) sugiriedo que los fotorreceptores en esta región podría presentar ritmicidad (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998), también se ha encontrado inmunoreactividad a CRY en el protocerebro lateral en la región del tallo óptico específicamente en el cuerpo hemilipsoidal y en un grupo celular del protocerebro medio (Fanjul-Moles *et al.*, 2004) en donde CRY podría ser el responsable de la respuesta circadiana a la luz azul y un elemento de entrada para el reloj del acocil (Fanjul-Moles *et al.*, 2004).

En el FC se han reportado ritmos en los potenciales de acción espontáneos, ritmos en los cambios de los potenciales de acción que son inducidos por la luz, y se ha propuesto que los cambios de fase en el ritmo de actividad locomotora y el ritmo del la amplitud del ERG, están controlados por dos osciladores circadianos localizados en una neurona fotosensible en el sexto ganglio, en donde la serotonina se ha sugerido como un neuromodulador de esta actividad eléctrica (Rodríguez-Sosa, *et al.* 2008)

# 3. Planteamiento y justificación.

El marcapaso circadiano es capaz de generar ritmos con una duración cercana a las 24 horas. Diversos grupos de investigadores han estado interesados en encontrar los mecanismos que subyacen los marcapasos en los organismos invertebrados y los vertebrados utilizando especies tan conocidas como lo son la mosca de la fruta *Drosophyla melanogaster* (Young, 1998; Ashmore y Sehgal, 2003; Collins, *et al.* 2004; Hardin, 2005) y el ratón *Mus musculus* (Gekakis, *et al.* 1998; Hastings y Maywood 2000; Ko y Takahashi, 2006; Tosini, *et al.*, 2007) en donde se ha reportado el control molecular que genera oscilaciones, los órganos generadores y las vías de sincronización que utilizan para poner a tiempo al marcapaso.

En el acocil se han reportado diversos ritmos fisiológicos y conductuales circadianos y se han propuesto al menos tres estructuras marcapaso: 1) el pedúnculo ocular que contiene el sistema neurosecretor y que además de ser una de las vías de entrada para sincronizar los ritmos a través de los fotorreceptores retinianos, es un centro de control del ritmo de actividad del electrorretinograma y del ritmo de actividad locomotora; 2) el ganglio cerebroide que al extirparlo se pierde el ritmo de actividad locomotora y 3) la controvertida participación de los fotorreceptores extrarretinianos localizados en el sexto ganglio abdominal en el control del ritmo de electrorretinograma y el ritmo locomotor, además de la posibilidad de ser un marcapaso al reportar la presencia de ritmos de actividad eléctrica espontánea in *Vitro*.

En los mecanismos que dan origen al marcapaso circadiano hay características que se conservan, como la presencia de elementos positivos y negativos capaces de regular la transcripción de sus propios genes y generar ritmos moleculares, sin embargo presentan sus propios genes, y en los animales estos parecen estar bastante conservados, aunque su función parece variar.

En el acocil se han descrito ritmos circadianos, pero no se han estudiado los mecanismos que subyacen al posible sistema marcapaso, en el acocil no hay reportes de la oscilación de las proteínas reloj.

Por lo anterior, es importante investigar si las proteínas reloj PER y TIM que participan en la regulación negativa de sus propios genes y oscilan circadianamente en *Drosophila* se encuentran también en las estructuras propuestas como osciladores del sistema circadiano, por medio de la presencia de estas proteínas y sus variaciones en *P.clarkii*.

# 4. Hipótesis.

Si en el pedúnculo ocular, el ganglio cerebroide y el sexto ganglio que se encuentra en la cadena ganglionar ventral se localizan posibles marcapasos circadianos cuyos mecanismos moleculares son similares al propuesto para el modelo de *Drosophila*, entonces proteínas reloj como PER y TIM se expresarán de manera circadiana.

# 5. Objetivos.

- Determinar si las proteínas PER y TIM están presentes en el pedúnculo ocular, el ganglio cerebroide y la cadena ganglionar ventral del acocil.
- Determinar si estas proteínas se ajustan a los cambios diarios de luz oscuridad y si oscilan de manera diaria y circadiana.

# 6. Método.

## 6.1. Animales.

Se utilizaron 54 acociles adultos de la especie *Procambarus clarkii* en intermuda sin distinguir entre hembras y machos, que fueron colectados en Chihuahua, México. Los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio, dentro de acuarios, a una temperatura de 20° C aproximadamente, con ciclos de luz-oscuridad 12:12 con encendido de la luz a las 07 horas durante 15 días. Se alimentaron *ad libitum* cada tercer día en horas aleatorias con verdura cocida.

Una vez pasados los 15 días en ciclos luz-oscuridad 12:12 los animales se dividieron en tres grupos de 18 animales, en el primer grupo los acociles se sacrificaron ese mismo día para disectar el tejido a diferentes horas (03:00, 07:00, 11:00, 15:00, 19:00 y 23:00 horas), al segundo grupo se mantuvo en 24 horas en oscuridad constante (OO) y el tercer grupo en 72 horas en OO, una vez completado el ciclo de oscuridad se realizaron las disecciones a las mismas horas que el primer grupo, para cada hora se sacrificaron 3 acociles en todas las condiciones.

## 6.2. Disecciones y tratamiento del tejido.

Los animales se anestesiaron por 20 minutos en frío, para posteriormente hacer la disección. Primero se cortaron los tallos oculares, después se decapitó el animal, se disectó el cerebro y finalmente se retiró todo el tejido a lo largo del abdomen y el tórax para obtener la cadena ganglionar.

Los pedúnculos oculares y el ganglio cerebroide se colocaron por separado en 100 µl de amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.4, mientras que la cadena ganglionar se colocó en 200 µl del mismo amortiguador debido a que la cantidad de tejido era mayor.

Todas las muestras se homogenizaron y centrifugaron por 3 minutos, se tomó el sobrenadante desechando el pelet.

Las muestras se guardaron a -70° C (Legaci, Refrigeration System).

## 6.3. Cuantificación de proteínas.

Se utilizó el método de cuantificación espectofotométrica de proteínas diseñado por Bradford (1976).

En 10 ml de agua desionizada se disolvieron 0.5 mg de albumina de suero de bovino (BSA) y se determinó la absorbancia a 280 nm la cual tenía que ser igual a 0.33.

En tubos Ependorff se colocarón 0.5 mg/ml de BSA con 0.15 M de cloruro de sodio (NaCl), llevando el volumen de cada tubo a 150 µl totales. Se agregó 1.5 ml de reactivo de Bradfor (Bio-Rad). Se obtuvo la absorbancia a 595 nm para cada dilución de BSA para realizar la curva estándar de acuerdo a la siguiente tabla:

| Tubo | BSA 0.5 mg/ml (µl) | NaCL 0.15M(µl) | Bradford (ml) |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 150 | 1.5 |
| 2 | 7.5 | 142.5 | 1.5 |
| 3 | 15 | 135 | 1.5 |
| 4 | 22.5 | 127.5 | 1.5 |
| 5 | 30 | 120 | 1.5 |
| 6 | 35.5 | 112.5 | 1.5 |
| 7 | 45 | 105 | 1.5 |
| 8 | 52.5 | 97.5 | 1.5 |
| 9 | 75 | 75 | 1.5 |

Tabla 2. Cantidades de las soluciones para realizar la curva patrón.

Por medio de la curva estándar, se calculó la cantidad de muestra en microlitros para colocar en cada pozo de los geles 40 µg de proteínas totales para el western blott.

## 6.4. Western blott.

El Western Blott es una técnica bioquímica que permite identificar las proteínas en un homogenizado a través de una detección inmunoquímica. Por medio de la electroforesis, las proteínas se separaron en un gel por peso molecular. Posteriormente las proteínas que se encontraron en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por medio de absorción capilar y posteriormente se realizó la inmunodetección utilizando anticuerpos específicos al antígeno (proteína de interés).

### 6.4.1. Electroforesis.

Para la electroforesis se prepararon geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SPS-PAGE) compuestos por gel separación (base) al 10% y gel de carga al 7.5%.

Para el gel al 10% se utilizaron 3.3ml de solución de acrilamida, 2.5 ml de amortiguador pH 8.8, 4.17 ml de agua desionizada, 100 µl de SDS al 10%, 10 µl de N', N', N', N'-Tetra-metiletilenediamina (TEMED; Bio-Rad) y 100 µl de persulfato de amonio, ya polimerizado este gel se adicionó el gel al 7.5% el cual se preparó con 2.5 ml de solución de arcrilamida, 2.5 ml de amortiguador de TRIS-HCl (con un pH 8.8), 4.8 ml de agua desionizada, 100 µl de SDS al 10%, 10 µl de TEMED y 100 µl de persulfato de amonio. Una vez polimerizado el gel, este se colocó en una cámara de electroforesis vertical (OWL) se agregó una solución amortiguadora de corrida que contenía 14.48g de glicina, 3g de Tris base, SDS al 10% y posteriormente se aforó a un litro. En el primer carril del gel se cargó un marcador de peso molecular MultiMark Multi-colored

(Invitrogen), posteriormente se cargaron las muestras en cada carril, lo equivalente a 40µg de proteínas totales (pedúnculos oculares, ganglio cerebroide o cadena ganglionar) más el amortiguador para la muestra el cual se realizó con 63µl de amortiguador TRIS-HCL con un pH 6.8, 53 µl de glicerol, 105 µl de SDS 10%, 26 µl de azul de bromofenol, 275 µl de agua desionizada, de esto se tomaron 475 µl de la solución y se le agregó 25µl de β-mercaptoetanol (Bio-Rad). La cámara se conectó a una fuente de poder para correr las proteínas a 100V hasta que rebasaron la parte del gel 7.5%; posteriormente se incrementó el voltaje a 120V, cuando las proteínas se encontraban a 8mm antes del borde inferior del gel se detuvo la electroforesis.

### 6.4.2. Electrotransferencia.

Ya terminada la electroforesis, las proteínas se pasaron a la electrotransferencia.

Se acomodó cada gel en un casset como se explica a continuación. En un recipiente con amortiguador de transferencia (14.4g de Glicina, 3.03g de Tris base, 200ml de metanol se disuelve en 700 ml de agua desionizada aforando a un litro), el casset se orientó con la parte positiva hacia abajo. Se colocó una fibra, un papel filtro, el gel con las proteínas, la membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot, transfer Medium, 0.45 µm, Bio-Rad), de nuevo un papel filtro, finalmente la fibra y el casset con la parte negativa. Se cerró el casset y se introdujo en la cámara de transferencia previamente llena con amortiguador de transferencia. Se transfirió por 1 hora 20 minutos para cerebro y cadena ganglionar; y para pedúnculo ocular 1 hora 30 minutos a 100V.

Finalizada la transferencia las membranas se colocaron en amortiguador TRIS (TBS, Bio-Rad) a temperatura ambiente en agitación, durante 5 a 10 min.

Los geles se tiñeron con azul de coomasie en agitación por 30 min. Después se retiró el azul de coomasie y se agregó la solución desteñidora, se realizaron tres lavados de 30 minutos. Finalmente se enjuagaron con agua y se secaron en papel celofan para confirmar que pasaran las proteínas y no se quedaran en el gel.

### 6.4.3. Inmunodetección.

Después de hacer un lavado con TBS las membranas permanecieron en TBS, se bloquearon con gelatina al 3% en TBS por 2 horas a temperatura ambiente. Se decantó la solución bloqueadora, se lavó 10 minutos en TTBS (350 µl de Tween-20 a 700 ml de TBS).

Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios policlonales a una concentración previamente establecida anti-*Drosophila* PER en pollo 1:1,000 o anti-ratón TIM en conejo 1:500 (Alpha Diagnostic) y un anticuerpo para el control de carga anti-gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en conejo 1:1,000 (ABCAM), se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en agitación constante.

Se retiró la solución de anticuerpos, se lavaron las membranas dos veces por 5 min con TTBS, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, cabra anti-pollo 1:4000 o cabra anti-conejo 1:30,000 (Alpha Diagnostic), se incubaron durante 2 horas en agitación. Se eliminó la solución de anticuerpos y se lavaron las membranas por 5 minutos dos veces con TTBS.

## 6.5. Revelado.

Al finalizar los lavados de TTBS, se retiró este de las membranas, y se prosiguió a incubar con el Kit de Quioluminiscencia (Super Signal West Pico Chemiluminescent Sustrate, luminol y

solución de peróxido 1:1, PIERCE) por aproximadamente 15 minutos en agitación a temperatura ambiente.

Se retiraron las membranas del reactivo, escurriendo sin que se secaran y se cubrieron con una mica de plástico para evitar el contacto directo con la placa. Se revelaron en un cuarto oscuro, con placas CL-X Posure, Clear Blue X-Ray Film Light Sensitive (PIERCE), la membrana se expuso de 1 a 20 minutos.

Posteriormente las placas se incubaron en una solución de revelado (Developer and Replenisher, 1:10, Kodak) por aproximadamente 10 segundos, se lavó la placa en agua agitando y luego se paso al fijador (Fixer and Replenisher, 1:10, Kodak) hasta que en la placa se visualizaron las bandas. Finalmente las placas se dejaron secar para su posterior digitalización.

## 6.6. Digitalización.

Las bandas se escanearon y fueron digitalizadas mediante un transiluminador (Gel Logic 200), y se analizaron con el software Molecular Imaging vs4.0.4. (Kodak) para cuantificar la intensidad promedio obteniéndose los pixeles a partir de la relación entre la intensidad promedio y la intensidad del fondo de cada banda de proteína a las diferentes horas del día para las proteínas PER y GAPDH o TIM y GAPDH. El promedio de las repeticiones, el error estandar y los cronogramas correspondientes de cada tejido y condición se obtuvieron a partir del programa Sigma ScanProt y Sigma plott.

## 6.7. Análisis de los datos.

Posteriormente se obtuvo la abundancia relativa de PER y TIM con respecto al control (GAPDH) para lo cual la cantidad obtenida para cada banda de proteínas de dividió entre el dato

obtenido de su respectiva banda de GAPDH para cada hora del día, se sacó el promedio y se normalizaron los datos para realizar los cronogramas correspondientes. Los datos se analizaron mediante el método de cosinor usando el software COSANA (A. Benedit Silva.GMDRB, Departamento de Fisiología y Biofísica. ICB/UPS, Brasil). Cosinor realiza un ajuste por mínimos cuadrados y asume que los datos están distribuidos en una onda sinusoidal en base al periodo de prueba ($\tau$), esto permite realizar una prueba objetiva de la hipótesis si la amplitud es diferente a cero y el porcentaje de ritmo. El ritmo es significativo cuando $p$ es $\leq 0.05$ (Vega, 1993). Se realizó cosinor con un periodo prueba de 24 horas y además se realizó el análisis con otros periodos de prueba.

# 7. Resultados.

Se observó la presencia de las proteínas PER y TIM en el pedúnculo ocular, el ganglio cerebroide y en la cadena ganglionar, estructuras que han sido propuestas como marcapasos de los ritmos circadianos en el acocil *Procamabarus clarkii*, utilizando anticuerpos policlonales anti-*Drosophila* PER y anti-ratón TIM (Figura 9).

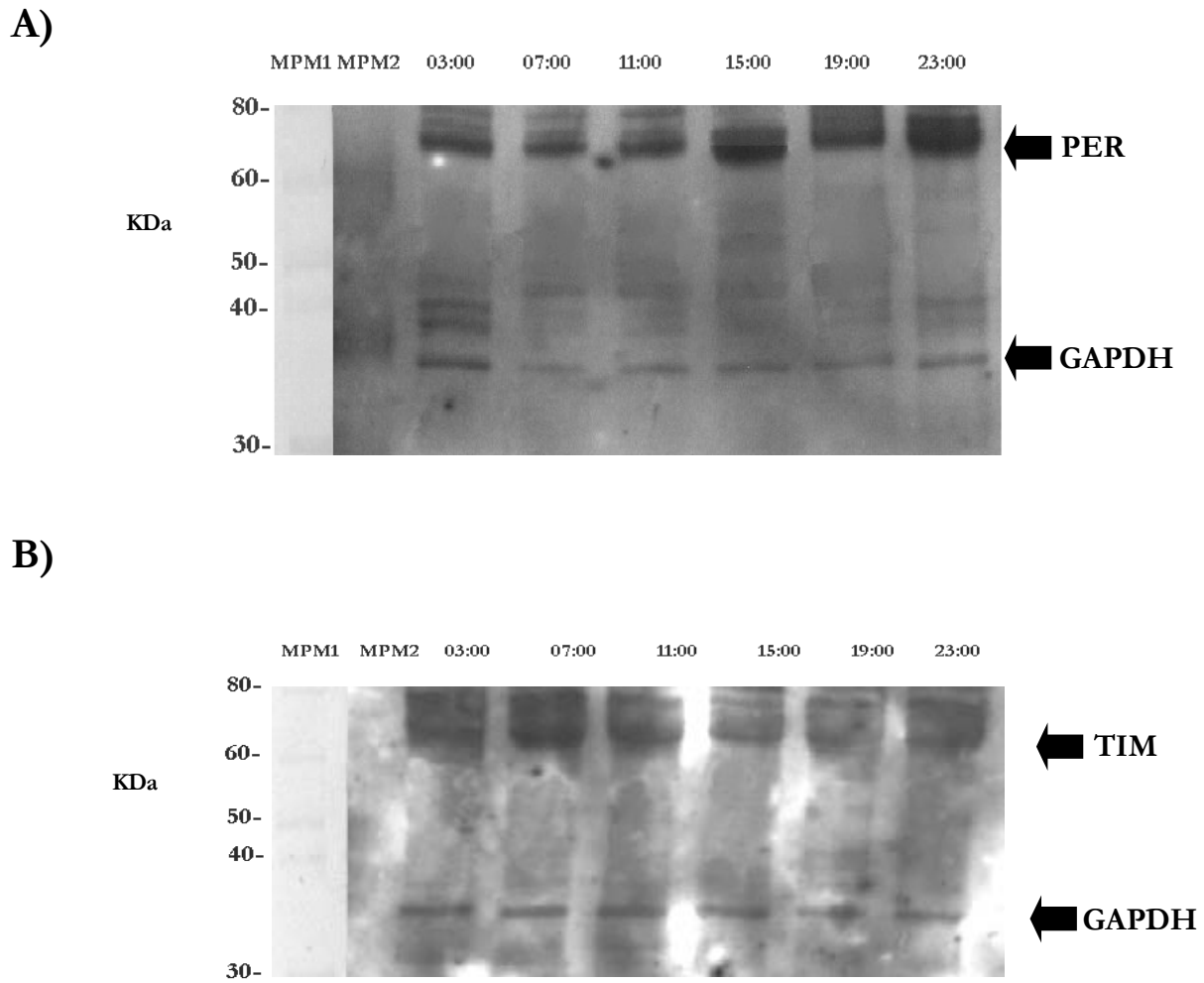


**Figura 9. Imágenes de las membranas representativas de las proteínas PER y TIM.**
Se muestran a la izquierda de cada imagen el peso molecular en kilodaltones (KDa), el marcador de peso molecular en la membrana (MPM1) y la placa (MPM2), finalmente las horas del día. A) Corresponde a los pedúnculos oculares en la condición 24 horas de OO. Y B) la cadena ganglionar en la condición LO 12:12.

En la tabla 3 se encuentran los resultados del análisis de cosinor que fueron significativos en las tres condiciones experimentales.

| Tabla 3. | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Proteína** | **Periodo (h)** | **PR (%)** | **Amplitud** | **Acrofase (h)** | **Mesor** |
| | **Ciclo LO 12:12** | | | | | |
| **Pedúnculos oculares** | TIM | 24 | 21.00 | 23.78 | 21.52 | 30.88 |
| **Ganglio cerebroide** | TIM | 24 | 25.92 | 25.86 | 19.24 | 48.81 |
| **Cadena ganglionar** | PER | 24 | 27.44 | 28.95 | 23.36 | 44.29 |
| **Ciclo 24 horas de OO.** | | | | | | |
| **Pedúnculo oculares** | PER | 24 | 16.72 | 04.28 | 20.35 | 08.88 |
| | TIM | 24 | 19.35 | 08.46 | 02.31 | 84.00 |
| **Cadena ganglionar** | PER | 24 | 65.80 | 20.21 | 00.56 | 73.06 |
| | TIM | 24 | 31.11 | 29.28 | 03.16 | 47.00 |
| **72 horas de OO.** | | | | | | |
| **Pedúnculo oculares** | PER | 20 | 33.00 | 25.55 | 05.21 | 50.89 |
| | TIM | 24 | 23.59 | 21.75 | 08.08 | 56.62 |
| **Ganglio cerebroide** | TIM | 23.17 | 46.72 | 29.32 | 10.55 | 51.79 |
| **Cadena ganglionar** | TIM | 21.53 | 28.29 | 23.24 | 13.12 | 54.58 |

Resultados significativos ($P<0.05$) en las tres condiciones experimentales.
PR: Porcentaje rítmico.

## 7.1. Pedúnculo ocular.

Los resultados del pedúnculo ocular en la condición LO 12:12 se representan en el cronograma de la figura 10, encontrando que el máximo de la abundancia relativa de PER se presenta a las 11:00 horas justo después del encendido de la luz, en tanto el mínimo de la concentración de la proteína se encuentra a las 3:00 horas y es del 45%. El porcentaje del ritmo de PER fue de 4.32% y la amplitud de 9.29, observar la tabla 3. El análisis de cosinor para la oscilación de PER no fue significativo en esta condición (P>0.05).

En tanto que, la abundancia de TIM en la condición LO 12:12 a las 3:00 horas es del 92% con el máximo a las 23:00 horas y el mínimo es del 18% a las 7:00 horas. El porcentaje del ritmo fue de 21%, el mesor de 30.88 y su amplitud de 23.78 que se muestran en la tabla 3, en donde cosinor mostró una oscilación significativa de TIM (P<0.05).

Se observa en el cronograma que la máxima concentración de PER tiene un adelanto de aproximadamente 12 horas con respecto a la de TIM para un periodo de prueba de 24 horas en la condición LO 12:12.

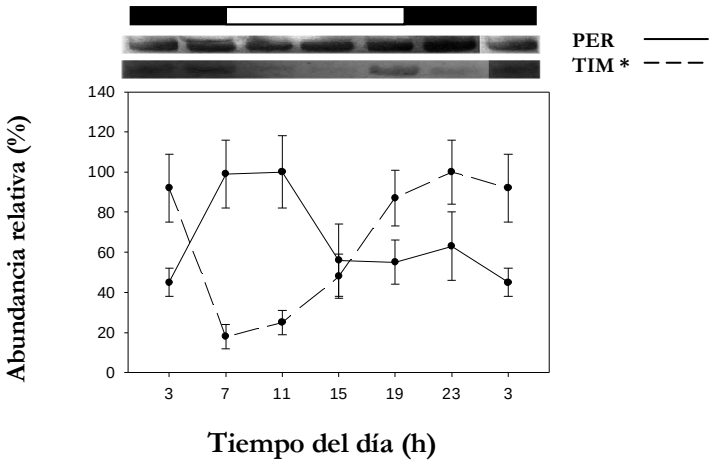


**Figura 10. Cronograma de pedúnculo ocular en la condición LO 12:12.** La barra superior indica la condición experimental (la parte blanca en la barra representa la fase de iluminación) y se muestran las bandas representativas de PER y TIM. La línea continua indica los promedios de la abundancia relativa de PER y la discontinua los de TIM. Las barras indican el error estándar y el asterisco indica que la oscilación tiene resultados significativos por el análisis de cosinor (P<0.05). En cada tiempo se tomaron 3 animales.

En la condición de 24 horas en OO (cronograma de la figura 11) se observa el mínimo de la abundancia relativa de PER a las 7:00 horas de 19%, presentando un incremento de 67% a las 11:00 horas y el máximo a las 23:00 horas. El porcentaje del ritmo de PER es de 16.72% con una amplitud de 4.28 y el mesor de 8.88. Los resultados son significativos en la condición de 24 horas en OO por cosinor ($P<0.05$).

Para TIM, en la condición de 24 horas de OO la abundancia relativa mínima ocurrió a las 15:00 horas de 80%, su máxima abundancia a las 3:00 horas, con un porcentaje del ritmo de 19.35 y la amplitud de 8.46. Cosinor indica que los resultados de TIM son significativos en la condición de 24 horas en OO ($P<0.05$) (ver tabla 3).

La amplitud de la oscilación de TIM en la condición 24 horas en OO disminuye un 69% con respecto a la máxima abundancia de TIM en la condición LO 12:12 (Figuras 10 y 11).

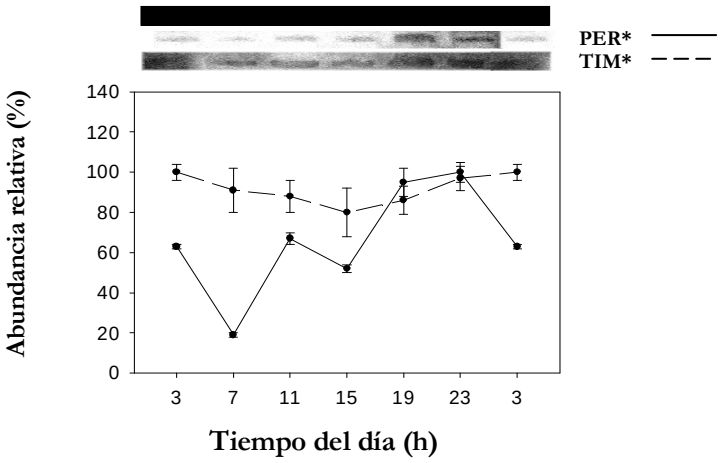


**Figura 11. Cronograma de pedúnculo ocular en la condición 24 horas de OO.** La barra superior indica la condición y enseguida se muestran las bandas representativas de PER y TIM. La línea de continua indica los promedios de la abundancia relativa de PER y la discontinua los de TIM. El asterisco indica que la oscilación tiene resultados significativos por el análisis de cosinor ($P<0.05$) y las barras indican el error estándar. En cada tiempo se tomaron 3 animales.

Finalmente el pedúnculo ocular en la condición experimental de 72 horas en OO (figura 12), mostró que la máxima abundancia de PER ocurre a las 3:00 horas y la mínima abundancia a las 19:00 horas de 41%. El análisis de cosinor para PER con un periodo de prueba de 20 horas indicó que los resultados son significativos (P<0.05). El porcentaje del ritmo de PER fue de 33%, la amplitud de 25.55 y el mesor de 50.89 (tabla 3).

La abundancia relativa máxima de TIM en 72 horas en OO es a las 7:00 horas y la mínima de 23% a las 23:00 horas se muestran en la figura 12. El porcentaje del ritmo de TIM es de 23.59%, el mesor de 56.62, la amplitud de 21.75, es decir se incremento en un 46.89% con respecto a la amplitud de TIM de la condición en 24 horas de OO (tabla 3). Los resultados son significativos para TIM en la condición de 72 horas en OO con periodo de prueba de 24 horas (P<0.05). Las oscilaciones de PER y TIM presentan oscilaciones circadianas en 72 horas de OO.

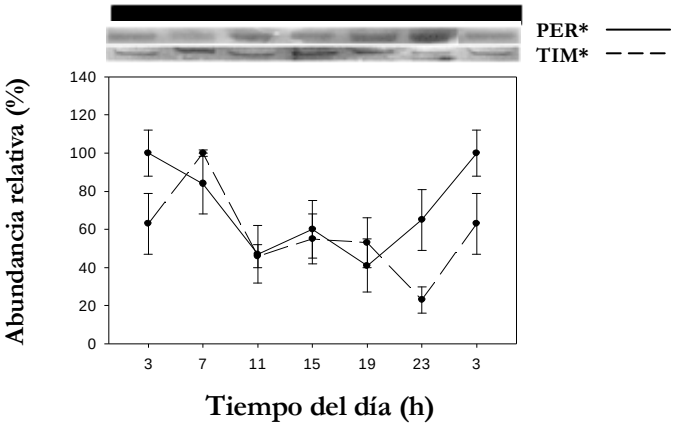


**Figura 12. Cronograma de pedúnculo ocular en la condición 72 horas de OO.** La barra superior indica la condición de oscuridad y también se muestran las bandas representativas de PER y TIM. La línea continua indica los promedios de la abundancia relativa de PER y la discontinua los de TIM. Las barras indican el error estándar y el asterisco indica que la oscilación tiene resultados significativos por el análisis de cosinor (P<0.05). En cada tiempo se tomaron 3 animales.

## 7.2. Ganglio cerebroide.

En el cronograma de la condición LO 12:12 del ganglio cerebroide se muestra en la figura 13, se encontró que la mínima abundancia de la proteína PER es a las 7:00 horas que coincide con el apagado de la luz y comienza a incrementarse hasta alcanzar su máximo a las 23:00 horas, cuatro horas después del apagado de la luz. El porcentaje del ritmo de PER es de 14.90% y la amplitud de 4.28. El análisis de cosinor indica que los resultados no son significativos (P>0.05) para PER en la condición LO 12:12.

La mínima abundancia de TIM en LO 12:12 fue de 25% se observa a la misma hora que la de PER (Figura 13) y ambas proteínas incrementan a lo largo de la fase de luz, alcanzando TIM su máxima abundancia a las 19:00 horas que coincide con el apagado de la luz y nuevamente disminuye durante las siguientes horas de oscuridad, estos resultados son significativos (P<0.05) con un porcentaje del ritmo de 25.92%, la amplitud de 25.86 y el mesor de 48.81 (tabla 3) para TIM en esta condición. TIM presenta un ritmo diario en la condición de LO 12:12.

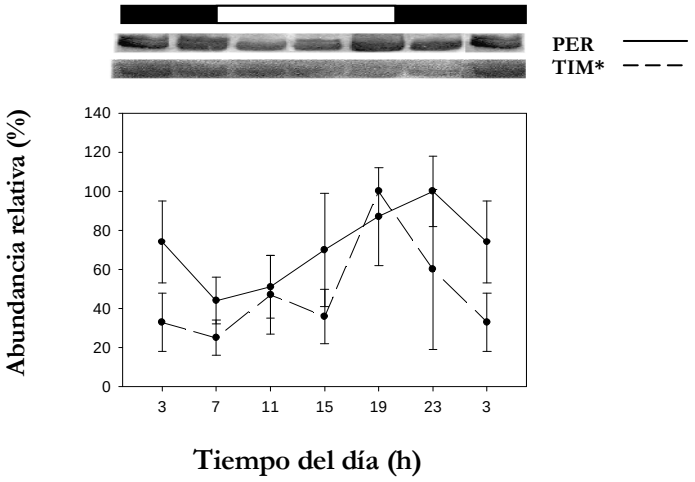


**Figura 13. Cronograma de ganglio cerebroide en la condición LO 12:12.** La barra superior indica la condición experimental (la parte blanca en la barra representa la fase de iluminación) y después las bandas representativas de PER y TIM. La línea continua indica los promedios de la abundancia relativa de PER y discontinua los de TIM. Las barras indican el error estándar y el asterisco indica que la oscilación tiene resultados significativos por el análisis de cosinor P<0.05. En cada tiempo se tomaron 3 animales.

El cronograma de la condición experimental de 24 horas en OO (figura 14), la abundancia máxima de PER se encuentra a la 15:00 horas y la de TIM a las 19:00 horas, es decir PER tiene un adelanto de 4 horas. La abundancia mínima de PER está a las 3:00 horas de 70% y la de TIM presenta dos mínimos, uno a las 15:00 horas de 64% y otro a las 23:00 horas de 62%. Ambas oscilaciones proteicas no son significativas para un periodo de 24 horas. El porcentaje del ritmo de PER es de 7.87% (tabla 3) y la amplitud de 10.18, es decir el 58% con respecto a la amplitud de la condición LO 12:12. El porcentaje del ritmo de TIM es de 1.14% (tabla 3), y la amplitud de 3.67 que representa una disminución del 86.48% con respecto a la condición LO 12:12.

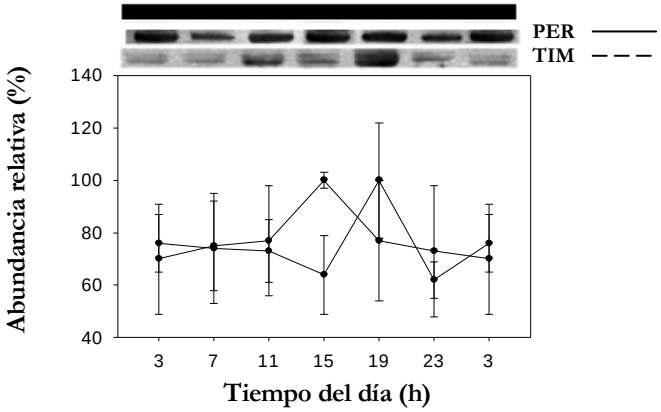


**Figura 14. Cronograma del ganglio cerebroide en la condición de 24 horas en OO.** La barra superior indica la condición experimental. Se muestran las bandas representativas de PER y TIM. La línea continua indica los promedios de la abundancia relativa de PER y discontinua los de TIM. Las barras indican el error estándar. Los resultados no son significativos (P>0.05). En cada tiempo se tomaron 3 animales.

Los resultados en 72 horas en OO representados en la figura 15 muestran que PER tiene una máxima abundancia a las 11:00 horas, con un mínimo del 57% y otro del 55% a las 15:00 y 23:00 respectivamente, el porcentaje del ritmo es de 7.3%, la amplitud de 10.18. La oscilación de PER no fue significativa (P>0.05). En tanto, la abundancia de TIM presenta una curva bimodal, con un máximo a las 7:00 horas del 100% y otro del 90% a las 23:00 horas, con un mínimo de la abundancia del 36% y otro de 24% a las 3:00 y 15:00 respectivamente. La oscilación de TIM es significativa (P<0.05), el porcentaje del ritmo de 46.72%, la amplitud de 29.32. La amplitud se redujo en ambas proteínas, en PER hasta el 70.7% y en TIM hasta el 42.24% con respecto a los valores de la amplitud que se obtuvo para ambas proteínas en la condición de LO 12:12.

La oscilación de TIM presenta un ritmo circadiano en la condición de 72 horas en OO.

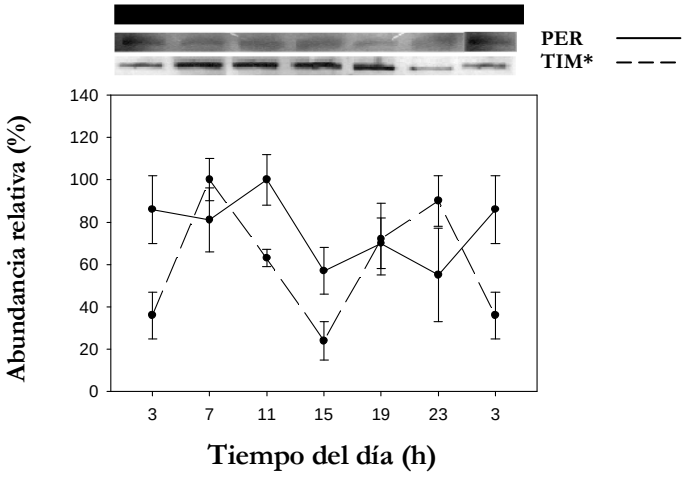


**Figura 15. Cronograma de ganglio cerebroide en la condición 72 horas en OO.** La barra superior indica oscuridad constante y enseguida se muestran las bandas representativas de PER y TIM. La línea continua indica los promedios de la abundancia relativa de PER y la discontinua los de TIM. Las barras indican el error estándar y el asterisco los resultados que son significativos (P<0.05). En cada tiempo se tomaron 3 animales.

## 7.3. Cadena ganglionar.

En el cronograma de la figura 16 de la condición LO 12:12 se puede observar que la mínima abundancia de PER registrada en el momento del encendido de la luz fue de 20%, después se incrementó la abundancia durante las siguientes horas del día, su máxima abundancia a las 23:00 horas, a la hora del apagado de la luz. La oscilación de PER es significativa ($P<0.05$) y tiene un porcentaje del ritmo del ritmo 27.44%, la amplitud 28.95 y el mesor de 44.29 (tabla 3).

El punto de máxima abundancia de TIM se registró a las 11:00 horas, es decir tiene una adelanto de 12:00 horas con respecto a la máxima abundancia de PER, la mínima abundancia de TIM fue de 25% a las 19:00 horas. La oscilación de TIM no es significativa ($P>0.05$). La máxima abundancia de TIM tiene un adelanto de 12 horas con respecto a la abundancia de PER (figura 16).

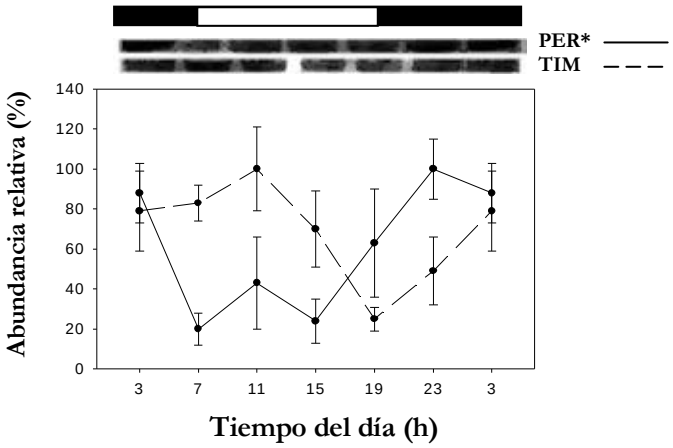


**Figura 16. Cronograma de la cadena ganglionar en la condición LO 12:12.** La barra superior indica oscuridad constante y enseguida se muestran las bandas representativas de PER y TIM. La línea continua indica los promedios de la abundancia relativa de PER y la discontinua los de TIM. Las barras indican el error estándar y el asterisco indica que la oscilación tiene resultados significativos por el análisis de cosinor $P<0.05$.

En la figura 17 que corresponde a la condición de 24 horas en OO la máxima abundancia de PER y TIM se presentó a la misma hora del día 3:00. La mínima abundancia de PER se observa hasta el 60% a las 11:00 horas, el porcentaje del ritmo de PER fue de 65.8%, la amplitud fue de 20.21 y el mesor de 73.06.

La mínima concentración de TIM se encuentra a las 15:00 horas, el porcentaje del ritmo de la oscilación de TIM es de 31.11, la amplitud fue de 29.28 y el mesor de 47 (tabla 3).

Las oscilaciones de PER y TIM son significativas ($P<0.05$) mostrando oscilaciones significativas.

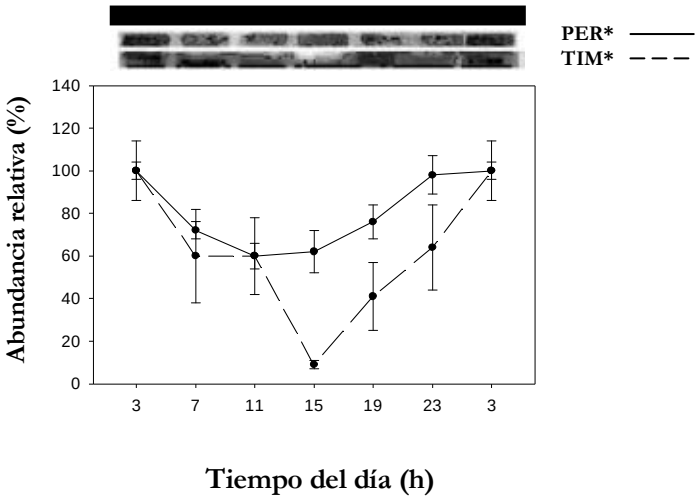


**Figura 17. Cronograma de la cadena ganglionar en la condición 24 horas en OO.** La barra superior indica oscuridad constante y enseguida se muestran las bandas representativas de PER y TIM. La línea continua indica los promedios de la abundancia relativa de PER y la discontinua los de TIM. Las barras indican el error estándar y el asterisco indica que la oscilación tiene resultados significativos por el análisis de cosinor $P<0.05$.

Para la condición experimental de 72 horas en OO (figura 18), el mínimo de la abundancia de PER se presentó a las 7:00 horas hasta el 45% y el máximo a las 11:00 horas. La oscilación de PER tiene una amplitud 4.41 y un porcentaje del ritmo de 0.95%, los resultados no fueron significativos (P>0.05).

La máxima abundancia de TIM en la condición de 72 horas en OO fue a las 7:00 horas, cuatro horas antes del máximo de PER, en tanto el mínimo está a las 23:00 horas y fue del 52%. La amplitud de la oscilación de TIM es de 23.24, el mesor de 54.58 y el porcentaje del ritmo de 28.29. Los resultados muestran una oscilación significativa de TIM (P<0.05) con un periodo de 21.53 (tabla 3).

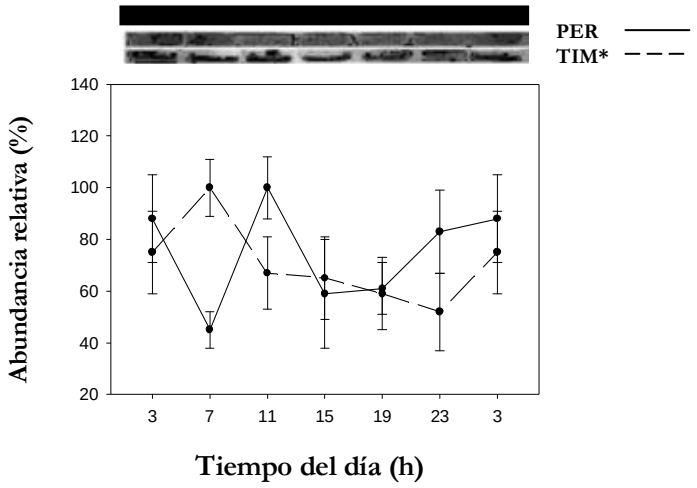


**Figura 18. Cronograma de la cadena ganglionar en la condición 72 horas en OO.** La barra superior indica oscuridad constante y se observan las bandas representativas de PER y TIM. La línea continua indica los promedios de la abundancia relativa de PER y la discontinua los de TIM. Las barras indican el error estándar y el asterisco indica que la oscilación tiene resultados significativos por el análisis de cosinor P<0.05.

# 8. Discusión.

Baylies y colaboradores en 1987 (Subramanian, 2005) reportaron una proteína de 127 KDa obtenida del gen de *per*, por otra parte, Edery *et al.* (1996) encontraron una proteína PER de

aproximadamente 180 KDa en rata. Por otra parte, en el año de 1996 *tim* fue clonado y se obtuvo una proteína de 165 KDa (Subramanian, 2005) y durante el mismo año Hunter-Enson y colaboradores produjeron un anticuerpo policlonal que reconoce a la proteína TIM de *Drosophila melanogaster* con un peso molecular de 180 KDa. El peso molecular para ambas proteínas que se identificó en este trabajo se sitúa entre los 60 y 80 KDa en tanto las bandas de GAPDH se situaron por encima de los 30 KDa aproximadamente (figura 9).

Aréchiga y Rodríguez-Sosa (1988) reportaron inmunopositividad a PER en los fotorreceptores, la lámina y los núcleos de los rabdomos de *P. clarkii*. En este trabajo se encontró inmunopositividad a esta proteína en el pedúnculo ocular. La oscilación de PER en el ciclo LO 12:12 no presenta una oscilación significativa (ver figura 10), mientras en condiciones constantes (24 y 72 horas en OO) presenta oscilaciones circadianas como sucede en los marcapasos de *Drosophila y Mus musculus* (Dunlap, 1999). También se encontraron atrasos de fase en los máximos de la abundancia relativa en los ciclos de PER (figuras 10, 11 y 12).

Por otra parte, los resultados indican que los niveles más bajos de TIM en el ciclo LO 12:12 del pedúnculo ocular se encuentran en las primeras horas después del encendido de la luz (figura 10). El efecto de la luz en el pedúnculo ocular del acocil posiblemente disminuye la abundancia TIM ciclo LO 12:12 y su máxima abundancia ocurre en la fase de oscuridad, disminuyendo en las últimas horas de la noche. Lo cual también ha sido reportado en *Drosophila* (Hunter-Ensor, *et al.* 1996), la oscilación de TIM ajusta su fase a la luz por lo tanto también actúa en el acocil como una posible proteína sincronizadora de los marcapasos circadianos, como sucede en el marcapaso de *Drosophila* (Hunter-Ensor, *et al.* 1996; Meyers *et al.* 1996; Dunlap, 1999), además TIM mantiene su oscilación en condiciones de 24 horas y 72 horas en oscuridad constante por lo tanto en este tejido podría encontrarse alguna estructura marcapaso capaz de

sostener esta oscilación. La amplitud de la oscilación de TIM en el pedúnculo óptico disminuye en las primeras 24 horas de oscuridad constante y se recupera en las siguientes 72 horas en OO a la amplitud que se obtuvo en LO 12:12 (tabla 3) por lo tanto esta oscilación es un transitorio, en cambio el mesor de la oscilación se incremento durante las 24 horas en OO, y en las siguientes 72 horas de OO se recuperó a un valor muy cercano al mesor de LO12:12, en tanto el porcentaje rítmico se incremento después de las 72 horas OO. También se destacan (figuras 10, 11 y 12) atrasos de fase de los máximos de la abundancia relativa de TIM en las tres condiciones experimentales de la condición LO 12:12 a 24 horas en OO y de está a 72 horas en OO.

El efecto de la luz en la abundancia de TIM del ganglio cerebroide también actúa como lo hace en el pedúnculo ocular, porque en las primeras horas de luz disminuye y después se incrementa cuando se apaga la luz (figura 13) entonces TIM podría ser degradado por la luz. La oscilación de TIM no es estadísticamente significativa en la condición de 24 horas de oscuridad constante (figura 14), mientras la oscilación en la condición de 72 horas en OO es circadiana (figuras 14 y 15), entonces en esta estructura TIM, también aporta información para corroborar que hay un marcapaso circadiano en el ganglio cerebroide. La amplitud de la oscilación de TIM en 72 horas en OO se recupera con respecto a la amplitud que se obtuvo en el ciclo LO 12:12. En tanto, la participación de PER en el ganglio cerebroide no presenta cambios diarios ni circadianos por lo tanto su participación en la generación circadiana en esta estructura no es clara.

En el ganglio cerebroide ambas proteínas muestran adelantos de fase en los máximos de la abundancia relativa de las condiciones experimentales (figuras 13, 14 y 15).

En la cadena ganglionar el porcentaje del ritmo de PER en la condición de 24 horas en OO se incrementa por el doble del encontrado en la condición LO 12:12. PER presentó un ritmo diario con atrasos en la fase del máximo de la abundancia en las diferentes condiciones.

En la cadena ganglionar la oscilación de TIM no es significativa en la condición LO 12:12 y la máxima abundancia se encontró durante las primeras horas de la fase de luz en tanto la mínima abundancia se encuentra en el apagado de la luz por lo tanto TIM no es degradado por la luz, a diferencia de lo que ocurre en pedúnculo ocular y el ganglio cerebroide (figura 16). TIM presenta oscilaciones significativas en 24 y 72 horas en OO y puede estar relacionada con el ritmo de actividad espontánea que se ha reportado en el sexto ganglio (Prieto-Sagredo y Fanjul-Moles, 2001; Rodríguez-Sosa, 2008) y el ritmo de actividad locomotora (Bernal-Moreno et al., 1996; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987).

Los atrasos en las horas de la máxima abundancia de TIM y PER en pedúnculo ocular y en la cadena ganglionar, y los adelantos de TIM y PER en el ganglio cerebroide sugieren que las oscilaciones se generan por dos vías efectoras o incluso por dos distintos osciladores porque los adelantos o atrasos de la proteína dependen del órgano en el que se encuentran.

# 9. Conclusión.

1) Las proteínas PER y TIM se encuentran presentes en las tres estructuras que se han propuesto como marcapasos circadianos en el acocil *Procamabarus clarkii*. Estas proteínas tienen un peso molecular entre los 60 y 80 KDa.

2) PER y TIM presentan ritmos circadianos en el pedúnculo ocular.

3) La oscilación en el ganglio cerebroide no es estadísticamente significativa en 24 horas de OO pero si es significativa en 72 horas en OO por lo tanto la oscilación de TIM en el ganglio cerebroide puede ser de naturaleza circadiana.

4) Los cronogramas muestran cambios no significativos de la abundancia de PER en el ganglio cerebroide, por lo que su participación en el marcapaso no es clara.

5) En la cadena ganglionar PER tiene variaciones diarias, en tanto las oscilaciones de TIM podrían ser de naturaleza circadiana.

6) Estos resultados sugieren que la formación del heterodímero PER/TIM en ciclos de LO 12:12 puede ocurrir a las 15:00 horas, en el ciclo de 24 horas en OO cerca de las 19:00 horas y en 72 horas en OO el tiempo podría formarse es entre las 23:00 y 3:00 horas en el pedúnculo ocular; en el ganglio cerebroide en el ciclo de LO 12:12 puede ocurrir cerca de las 19:00 horas, en 24:00 horas en OO entre las 15:00 y 19:00 horas y en 72 horas después de las 07:00 horas o a las 19:00 horas; en la cadena ganglionar en LO 12:12, 24 y 72 horas en OO podría formarse a las 03:00 horas. Aún falta conocer en que zonas de cada estructura se expresan ambas proteínas lo que sugeriría la localización de los posibles osciladores y su identificación nuclear y citoplasmática, además falta la caracterización de la estructura molecular de ambas proteínas en el acocil.

# 10. Referencias.


- **Ashmore L.J. y A. Sehgal (2003)** A fly's eye view of circadian entrainment. Journal Biological Rhythms. 18(3):206-216.
- **Aréchiga H. y L. Rodríguez-Sosa (1998)** Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. Proc. R. Soc. 265:1819-1823.
- **Aréchiga H, F. Fernández-Quiroz, F. Fernández de Miguel y L. Rodríguez-Sosa (1993)** The circadian system of crustaceans. Chronobiol. Int 10:1-19.
- **Aréchiga H. y L. Rodriguez-Sosa (2002)** Distributed circadian rhythmicity in the circadian nervous system. En: Konrad Wiese (ed.) The crustacean nervous system. Springer. Berlin, Germany. 113-122.
- **Aschoff J. (1981)** A survey in biological rhythm. En: Handbook oh behavioral neurobiology. Biological rhythms. Plenum Press. New York.4:3-10.
- **Avault J.W. Jr. y M. Brunson (1990)** Crawfish forage and feeding systems. Acuatic Sciences. 3:1-10.
- **Barrera-Mera B. y Block G.D. Block. (1990)** Protocerebral circadian pacemarkers in crayfish: evidence mutually coupled pacemarker. Brain Research. 522(2):241-245
- **Baylies MK, TA Bargiello, F.R. Jackson y M.W. Young (1987)** Changes in abundance or structure of the *per* gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. Nature. 326(6111): 390-2.
- **Baylies M.K., L Weiner, L.B. Vosshall, L. Saez y M.W. Young (1993)** Genetic, molecular and cellular studies of the *per* locus and its products in *Drosophila melanogaster*. En: Molecular genetics of biological rhythms. Young M.W. (ed.) CRC Press. 123-153.

- **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. Biol. Rhythm Res. 27:299–301.

- **Bernhards H. (1916)** Der Bau des komplexauges von *Astacus flaviatilis*. Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie. 116: 649-707.

- **Bradford, M. (1976)** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

- **Brady J. (1979)** Biological clocks. The Camelot Press Ltd, Southampton.Baltimore University. Institute of biology's Studies in Biology. Segunda Edición. Great Britain. 1-59.

- **Brusca R.C. y G.J. Brusca (2002)** Invertebrates. Second edition. Sinauer Associates. EUA. 514-534.

- **Campos M.R. (2005)** *Procambarus (Scapulicambarus) clarkii* (Girard, 1852), (Crustacea: Decapoda: Cambaridae). Una langostilla no nativa en Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 29 (111):295-302.

- **Cooke I.M. y R.E. Sullivan (1981)** Hormones amd Neurosecretion. En: The Biology of crustacea. Bliss D.E., H.L. Atwood y D.C. Sandeman (eds.) Academic Press. New York. 206-278.

- **Collins B.H., E. Rosato y C.P. Kyriacou (2004)** Seasonal behavior in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadina clock and phospolipase C. PNAS. 101(7); 1945-1950.

- **Correira A.M. (2002)** Niche breadth and trophic diversity: feeding behaviour of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) towards environmental availability of aquatic macroinvertebrates in a rice field (Portugal). Elsevier. Acta Oecologica. 23(6): 421-429.

- **Cyran S.A., A.M. Buchsbaum, K.L. Readdy. L.Meng-Chi, N.R.J. Glossop, P.E. Hardin, M.W. Young, R.V. Storti y J. Blau (2003)** *vrille*, *pdf1*, and *dclock* form a secund feedback loop in the Drosophila circadian clock. Cell. 112: 329-341.

- **Darlington T.K., K. Wager-Smith, M.F. Cereani, D. Stankis, N. Gekakis, T.D.L. Steeves, C.J. Weitz, J.S. Takahashi y S.A. Kay (1998)** Closing the circadian loop: CLOCK induced transcription of its own inhibitors, *per* and *tim*. Science. 280:1599-1603.

- **DeCoursey P.J. (2004)** The Behavioral Ecology and evolution of Biological Timing. En: Cronobiology. Biological Timekeeping. Dumlap J.C., j.J. Loros, P.J. DeCoursey. Sinauer Associates, Inc. Publishers. USA. 51-53.

- **Derby C.D. y D.N. Blaustein (1988)** Morphological and physiological characterizacion of individual olfatory interneurons connting the brain and eyestalk ganglia of the crayfish. J. Comp. Neurol. 318:277-290.

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

- **Edery I., L.J. Zwiebel, M.E. Dembinska y M. Rosbash (1994)** Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 91(6):2260-2264.

- **Elofsoon R. (1986)** The nervous system and its transmitters in the crayfish. Freshwater crayfish. 6:24-29.

- **Escamilla-Chimal, E. G., C. C. García-Rivera, M. Aguilar-Morales, V. Romero-Díaz, M. L. Fanjul-Moles (1998)** The retina of crayfish Procambarus clarkii during development shows serotonin and tryptophan hydroxylase-like immunoreactivity daily changes. Biol. Rhythm Res. 29:471–479.

- **Escamilla-Chimal E.G., F. Van Herp y M.L. Fanjul- Moles (2001)** Daily variations in crustacean hyperglycemic hormone and serotonin immunoreactivity during the development of crayfish. Journal of Experimental Biology. 204:1073-1081.}

- **Fanjul-MolesM.L., Escamilla-Chimal E.G., A. Gloria-Soria, G. Hernández-Herrera (2004)** The crayfish *Procambarus clarkii* CRY shows daily and circadian variation. J. Exp. Biol. 207:1453-1460.

- **Fuentes-Pardo B. y V. Inclán-Rubio (1987)** Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish-I. Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms. Comp. Biochem. Physiol. 86A:523-527.

- **Gekakis N., L. Saez, A.M. Delahaye-Brown, M.P. Myers, A sehgal, M.W. Young y Ch. J. Weitz (1995)** Isolation of *timeless* by PER protein interaction: Defective interaction between *timeless* protein and Long-Period Mutant $PER^{L}$. Science. 270:811-815.

- **Gekakis N., D. Staknis, H.B. Nguyen, F.C. Davis, L.D. Wilsbacher, D.P. King, J.S. Takahashi, y Ch.J. Weitz (1998)** Role of the CLOCK protein in the Mammalian Circadian Mechanism. Science. 280:1564-1569.

- **Hardin P.E., J.C. Hall y M. Rosbash (1990)** Feedback of the *Drosophila period* gen product on circadian cycling of its messenger RNA levels. Nature. 343:536-540.

- **Hardin P.E. (2005)** The circadian timekeepting system of *Drosophila*. Current Biology, 15(17):R714-R722.

- **Hastings M. y E.S. Maywood (2000)** Circadian clocks in the mammalian brain. Bio. Essays. 22:23-31.

- **Hanström B. (1924)** Untersuchungen über das Gehirn, insbesodnere die Sehganglion der Crustaceen. *Ark. Zool.* 16:1-117.

- **Holdich D.M y L.D. Reeve (1988)** Functional morphology and anatomy. En: Freshwater Crayfish Biology. Crom Helm. Timber Press. London. 11-51.

- **Holdich D.M. (2002)** Background and Functional Morphology. En: Biology of Freshwater Crayfish. Holdich D.M. (ed.). Blackwell Science EUA. 3-26.

- **Hoobs H.H. Jr. (1989)** An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae y Plarastacidae). Smithsonian Contributions to Zoology. 480:1-236.

- **Hunter-Ensor M, A. Ousley y A. Sehgal (1996)** Regulation of the Drosophila Protein Timeless Suggests a Mechanism for Resetting the circadian Clock By Light. Cell. 84:677-685.

- **Jackson F.R, T.A. Bargiello, S-H Yun y M.W. Young (1986)** Product of *per* locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. Nature 320:185-188.

- **Keim, W. (1915)** Das Nervensystem von Astacus fluviatilis (*Potamobius astacus L.*) Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie, 113, 485-545. En: Biology of Freshwater Crayfish. Holdich D.M. (ed.) Blackwell Science. London.

- **Ko C. H. y J. S. Takahashi (2006)** Molecular Components of the Mammalian Circadian Clock. Human Molecular Genetics. 15(2): R271–R277.

- **Konopka R.J. y S. Benzer (1971)** Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68(9):2112-2116.

- **Kume K., M.J. Zylka, S. Sriram, I.L.P. Shearman, D.R. Weaver, X. Jin, E.S. Maywood, M.H. Hastings y S.M. Rappert (1999)** *mcry1* and *mcry2* are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. Cell. 98:193-205.

- **Lee D.O'C. y J.F. Wickins (1992)** Crustacean Farming. Oxford. Backwell Scientific Publications. Great Britain. 361:1-19.

- **Lee C., K. Bae y I. Edery (1998)** The Drosophila CLOCK protein undergoes daily rhythms in abundance phosphorylation and interactions whit PER-TIM complex. Neuron. 21:857-867.

- **Lee C. Bae y I. Edery (1999)** PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a Drosophila CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. Mol. Cell. Biol. 19:5316-5325.

- **McClung C. R. (2006)** Plant circadian rhythms. The plant cell. 18:792-803.

- **Maynard D.M. y A. Sallee (1970)** Disturbance of feeding behavior in the sping lobster, *Panulirus argus*, following bilateral ablation of the medulla terminalis. Z. Vergl. Physiology. 66:123-140.

- **Myers M.P., K. Wager-Smith, C.S. Wesley, M.W. Young y A. Sehgal (1995)** Positional cloning and of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. Science. 270:805-808.

- **Myers M.P., K. Wage-Smith, A. Rothenfluh-Hilfiker y M.W. Young. (1996)** Ligth-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. Science. 271:1738-1740.

- **Moore-Ede M.C., F.M. Sulzman y C.A. Fuller (1982)** The clocks that time us. Phisiology of the circadian timing system. Harvard University Press. England. 1-151.

- **Naidoo N., W. Song, M. Hunter-Ensor y A. Sehgal (1999)** A Role for the Proteasome in the Light Response of the Timeless Clock Protein. Science. 285:1737-1741.

- **Panda S, J.B. Hogenech y A.K. Steve (2002)** Circadian rhythms from flies to human. Nature. 417:329-335.

- **Park J.H., CH. Helfrich-Förster, G. Lee, L. Liu, M. Rosbash, y J.C. Hall (2000)** Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:3606-3620.

- **Pittendrigh C.L. (1981)** General perspective. En: Biological clock. Handbook of behavioral neurobiology. Aschoff J. (Ed.) Plenum Press. New York. 4:56-79.

- **Price J.L., J. Blaw, A. Ruthenfluh, M. Abodeely, B. Kloss y M.W. Young (1998)** *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. Cell. 94:83-95.

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

- **Prosser C.L. (1934)** Action potentials in the nervous system of the crayfish-11. Responses to illumination of the eye and caudal ganglion. J. Cell. Comp. Physiol. 4, 363-377.

- **Refeneti R. (2000)** Circadian physiology. CRC Press. 19-21.

- **Rodríguez-Sosa L., G. Calderón-Rosete, M. G. Porras Villalobos, E. Mendoza Zamora y V. Anaya González. (2006)** Serotonin modulation of caudal photoreceptor in crayfish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 142(3-4):220-230

- **Rodríguez-Sosa L., G. Calderón-Rosete y G. Flores (2008)** Circadian and Ultradian Rhythms in the Crayfish Caudal Photoreceptor. Synapse. 62:643–652.

- **Saez, L. y M.W. Young (1996)** Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins PERIOD and TIMELESS. Neuron. 17:911-920.

- **Sánchez J.A. y B. Fuentes Pardo (1977)** Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. Comp. Biochem. Physiol.56A: 601-606.

- **Sandeman D.C. (1982)** Organization of the central nervous system. En: Biology of crustacea. Neurobiology. Structure and function. Bliss D.E., Atwood H.L. y D.C. Sandeman (eds.) Academic Press. New York. 1-61.

- **Sandeman D.C., R.E. Sandeman y A.R. Aitken (1988)** Atlas of serotonin-containing neurons in the optic lobes and brain of the crayfish *Cherax destructor*. J. Comp. Neurol. 269:465-478.

- **Sandeman D.C., R.E. Sandeman y H.G. Couet (1990)** Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. Journal Neurobiology. 21:619-629.

- **Sandeman D.C., R.E. Sandeman, Ch. Derby y M. Schmidt (1992)** Morphology of the brain of crayfish, crabs and spiny lobsters: a common Nomenclature for homologous structure. Biol. Bull. 183, 304-326.

- **Sandrelli F., E. Tauber, M. Pegoraro, G. Mazzotta, P. Cisotto, J. Landskron, R. stanewsky, A. Piccin, E. Rosato, M. Zordan, R. Costa, Ch. Kyriacou (2007)** A Molecular Basis for Natural Selection at the timeless Locus in *Drosophila melanogaster*. Science. 316: 1898-1900

- **Schürmann F.W., R.E. Sandeman y D.C. Sandeman (1991)** Dense-core vesicles and non-synaptic exocytosis in the central body of the crayfish brain. Cell Tissue Res. 265:493-500.

- **Shaw S.R y S. Stowe (1982)** Photoreception. En: Biology of crustacea. Neurobiology. Structure and function. Bliss D.E., Atwood H.L. y D.C. Sandeman (eds.) Academic Press. New York. 291-367.

- **Shearman L.P., M.J. Zylka, D.R. Weaver, L.F. Kolakowski, Jr. y S.M. Reppert (1997)** Two Period Homologs: Circadian Expresión and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei. Neuron. Cell Press. 19:1261–1269.

- **Scholtz G. (2002)** Phylogeny and Evolution. En: Biology of Freshwater Crayfish. Holdich D.M. (ed.) Blackwell Science. London. 30-46.

- **Sehgal A.., J.L. Price, B. Man y M.W. Young (1994)** Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the Drosophila mutant timeless. Science. 263:1603-1606.

- **Sehgal A., A. Rothenfluh-Hilfiker, M.Hunter-Ensor, Y. Chen, M. Myers y M.W. Young (1995)** Circadian oscillations and Autoregulation of *timeless* RNA. Science. 270:808-810.

- **Siwicki K.K., C. Egstman, G. Petersen, M. Rosbash y J.C. Hall (1988)** Antibodies to the *period* gene product of *Drosophila* several diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. Nueron 1:141-150

- **Sullivan J.M y B. Beltz (2001)** Neural Pathways Connecting the Deutocerebrum and Lateral Protocerebrum in the Brains of Decapod Crustaceans. Journal Comparative Neurology. 441:9-22.

- **Stanewsk R., M Kaneko, P. Emery, B. Beretta, K. Wager-Smith, S. kay, M. Rosbash y J.C. Hall (1998)** The *cyb*$^{b}$ mutation identifies cryptocrome as a circadian photoreceptor in drosophila. Cell. 95:681-692.

- **Strausfeld, N. J., y D. R. Nässel (1981)** Neuroarchitectures serving compound eyes of Crustacea and insects. En: Handbook of Sensory Physiology. Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates, Autrum H. (ed.), Springer. New York. 6B:l-l32

- **Subramanian P. (2005)** Molecular bases of circadian rhythmicity in *Drosophila*. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. B71 (5 y 6):219-226.

- **Takumi T.K., Taguchi K., S. Miyake, Y. Sakakida, c. Matsubara, Y. Maebayashi, K. Okumura, S. Takekida y S. Yamamoto (1998)** A ligth independent oscillatory gene mPer in mouse SCN and OVLT. The EMBO Journal. 17(16):4753-4759.

- **Tosini G., A. J. Davidson, C. Fukuhara, M. Kasamatsu, y O. Castanon-Cervantes (2007)** Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. FASEB J 21:3866-3871.

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

- **Vogt G. (2002)** Funtional Anatomy. En: Biology of the freshwater Crayfish. Holdich D.M. (ed.) Blackwell Science. London. 130-140.

- **Wilkens L.A. (1988)** The crayfish caudal photoreceptor: Advances and questions after the first half century. Comp. Biochem. Physiol. 91C(1):61-68.

- **Young, M.W., K. Wager-Smith, L.Vosshall, L. Saez y M.P. Myers (1996)** Molecular anatomy of a light-sensitive circadian pacemaker in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 61:279-284.

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

- **Young M.W. (2002)** Circadian Rhythms. Encyclopedia of Life Sciencie. Macmillan Publishers Ltd. Nature. Publishing Group. USA. 1-6.

- **Young M.W y B.H. Judd (1978)** Nonessential Sequences, Genes, and the Polytene Chromosome Bands of *Drosophila melanogaster*. Genetics. 88(4):723-742.

- **Zheng X. y A. Sehgal (2008)** Probing the Relative Importance of Molecular Oscillations in the Circadian Clock. Genetics. 178(3):1147-55.

- **Zerr D.M., J.C. Hall, M. Rosbash, K.K. Siwick (1990)** Circadian fluctiations of period protein immunoreactivity in CNS and the visual system of *Drosophila*. J. Biol. Chem. 277:14048-14052.

- **Zylka M.J., L.P. Shearman, D.R. Weaver y S.M. Reppert (1998)** Three *period* homolog in mammals. Diferential ligth responces in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts per outside of brain. Neuron. 20:1103-1110.