



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DEL mRNA DE LA HORMONA
HIPERGLUCEMIANTE DE CRUSTÁCEOS, EN EL
ACOCIL *Procambarus clarkii*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

JANIKUA FLORITTA NELSON MORA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada,
Facultad de Ciencias, Universidad nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue financiado por: PAPIIT IN207008.

CARACTERIZACIÓN DEL mRNA DE LA HORMONA HIPERGLUCEMIANTE DE CRUSTÁCEOS, EN EL ACOCIL *Procambarus clarkii*.



Janikua F. Nelson Mora

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

2011

Tutora: María Luisa Fanjul Peña

Lab. Neurofisiología Comparada

Facultad de Ciencias

UNAM

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno:</p> <p>Nelson Mora Janikua Floritta 56 08 84 32 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de ciencias Biología 303312855</p>
<p>2. Datos del tutor</p> <p>Dra. María Luisa Fañjul Peña</p>
<p>3. Datos del sinodal 1</p> <p>Dra. Rocío Salceda Sacanelles</p>
<p>4. Datos del sinodal 2</p> <p>Dr. Alejandro Zentella Dehesa</p>
<p>5. Datos del sinodal 3</p> <p>M. en C. Alfonso José Vilchis Peluya</p>
<p>6. Datos del sinodal 4</p> <p>Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal</p>

CONTENIDO

1. RESUMEN	7
2. Introducción	8
2.1 Generalidades de los ritmos biológicos.	9
2.1.1 Características del reloj Biológico.	11
2.1.2 Componentes del reloj.....	16
2.2 <i>Procambarus clarkii</i> como modelo de estudio.	19
2.3 Relojes y el sistema endocrino de los crustáceos	19
2.4 La hormona hiperglicemiante de los crustáceos.....	22
2.4.1 Funciones asociadas a la CHH	23
2.4.2 Fisiología de la CHH	25
2.4.3 Isoformas de la CHH	26
2.4.4 Aspectos rítmicos de la hormona hiperglicemiante de los crustáceos.....	28
3.....	29
Planteamiento del problema.....	29
4.....	32
Hipótesis	32
5.....	33
OBJETIVOS.....	33
6.....	34
Material y método.....	34
6.1 Animales y diseño experimental:	35
6.2 Diseño de cebadores:	35
6.3 Extracción de RNA	36
6.4 RT-PCR.....	37
6.5 Purificación del cDNA.....	39
6.6 Análisis de secuencias	40
6.7 Analisis de ritmicidad.....	41
7.....	43
Resultados	43

7.1 Extracción de RNA	44
7.2 Estandarización de las condiciones para la RT-PCR	44
7.3 Análisis de los fragmentos obtenidos	49
7.4 Análisis de Ritmicidad	52
8.....	58
Discusión y conclusiones	58
8.1 Análisis de secuencias	59
8.2 PCR semicuantitativa y análisis funcional	60
8.3 Conclusiones:	63
8.4 Perspectivas	64

1. RESUMEN

El sistema del órgano X y glándula sinusal (OX-GS) en el tallo ocular del acocil forma parte del sistema neuroendocrino y se encarga de producir y secretar las hormonas peptídicas necesarias para la regulación del metabolismo del animal. La hormona hiperglicemiante de los crustáceos (CHH, por sus siglas en inglés) es una de ellas y se sabe que su liberación rítmica está controlada por el sistema circadiano del animal. La CHH participa en el mantenimiento de los niveles de glicemia.

Trabajos previos, mediante técnicas de inmunoquímica y ensayo hemolítico inverso (Escamilla-Chimal et al, 2002) han permitido caracterizar la oscilación circadiana del péptido maduro de la CHH, así como su secreción rítmica en el complejo XO-SG del acocil *Procambarus clarkii*. El XO-SG es una estructura propuesta como marcapaso circadiano en esta especie. El objetivo de este trabajo fue investigar si la síntesis, del RNA mensajero de la CHH, del tallo ocular de esta especie presenta una ritmicidad diaria.

Para llevar a cabo lo anterior, se extrajo RNA total de diferentes horas del día: 03:00h, 07:00 h, 11:00h, 13:00h, 15:00h, 19:00h, 23:00h. Fueron realizadas reacciones de RT-PCR para las cuales se diseñaron cebadores a partir de la secuencia de la CHH del acocil *Procambarus clarkii* (Gene Bank Acc. No. AB027291). Como control interno se usaron cebadores para amplificar un producto de β -Actina. Los amplicones obtenidos se purificaron y secuenciaron. Una vez identificados los fragmentos del mRNA de CHH, se realizaron reacciones de RT-PCR semicuantitativo con el RNA total de las diferentes horas y se analizó la variación temporal en la expresión, mediante la cuantificación de la densidad de las bandas utilizando el sistema fotodocumentador Gel Logic 200 (Kodak) y el programa Kodak MI. Los resultados muestran que los fragmentos presentan una oscilación diaria bimodal, cuyo pico máximo se encuentra a las 07:00 h y el pico mínimo a las 15:00 h.

2.

Introducción

2.1 Generalidades de los ritmos biológicos.

Todos los seres vivos tienen algunas características en común, la más grande y tal vez sencilla es que todos los organismos habitamos en la tierra, que a su vez gira alrededor del sol en aproximadamente 365 días y alrededor de su propio eje cada 24 horas., esto es algo con lo que los organismo han tenido que lidiar desde que existen, aunque el periodo de rotación ha variado un poco a través del tiempo (Dennis *et al.* 2008, Refinetti 2006) , sin embargo la rotación de la tierra es una constante para los organismo que habitamos en ella, como consecuencia los seres vivos siempre hemos estado en contacto con cambios ambientales cíclicos, el más común de estos es el de día y noche, que conlleva cambios rítmicos diarios en la cantidad de luz y temperatura (Moore *et al.* 1982).

Por su parte los seres humanos desde tiempos inmemoriales han estado conscientes de las variaciones diarias ambientales debido a los cambios fisiológicos y conductuales que involucran ,como es tendencia de algunos animales a dormir durante el día o durante la noche (Moore, 1982) esto es el ritmo actividad -reposo, Probablemente las primeras observaciones sobre este fenómeno surgieron en el humano surgieron con fines de forrageo de amenaza, al tratar de identificar que animales podían ser presas o peligros potenciales a lo largo del día. De este modo podemos inferir que en el humano el reconocimiento de los ciclos de sueño y vigilia asociados a la ritmicidad del día y la noche, es antiguo; seguramente aun más antiguo es el reconocimiento de estos cambios diarios en nosotros mismos. (Refenetti 2006).A través de los siglos los seres humanos han mostrado un interés singular en el paso del tiempo y así han desarrollado instrumentos que les permitan medirlo cada vez con mayor precisión para poder predecir tanto el advenimiento del día y noche como la llegada de las estaciones (Dunlap et al., 2004). Los distintos tipos de relojes y la gran variedad de calendarios que

diferente civilizaciones a lo largo del espacio y tiempo han tanto inventado como empleado son una clara consecuencia de lo anterior.

Uno de los primeros registros de observaciones realizadas por humanos con respecto a los cambios cíclicos y como los seres vivos interactúan con ellos data del siglo IV a.c. cuando Andróstenes de Tasus, capitán de un barco que estaba bajo el comando de Alejandro Magno, registró sus observaciones del movimiento diario en algunas plantas, Andróstenes observó a lo largo de su viaje por el norte de África e India el movimiento diario de las hojas del árbol del tamarindo (*Tamarindus indica*), él notó que estas plantas mostraban un impresionante ciclo diario de movimiento, las hojas se movían hacia arriba en el día y hacia abajo durante la noche (Refinetti, 2006, Bretzl, 1903, citado por Moore-Ede, 1982).

Nuevas investigaciones motivaron la inserción de antiguas observaciones en relaciones lógicas, que permitieron descubrir que las actividades recurrentes de los seres vivos poseen periodos que difieren en una escala muy amplia. Algunas de estas actividades, suceden con las frecuencias de milésimas de segundo, otras cada segundo o cada hora. Algunos otros ritmos, más amplios, comprenden periodos aproximados a las 24 horas, existen ritmos semanales, mensuales, anuales o incluso algunos que ocurren cada 17 años. (Ward 1977 citado por Moore-Ede, 1982) se los ha visto y documentado en células solitarias, tejidos, órganos en organismos completos o incluso en poblaciones (Aschoff 1984).

Tanto si el organismo encuentra biológicamente útil repetir un hecho cada milésima de segundos como si lo efectúa cada 17 años es evidente que solo podrá hacerlo en el momento requerido si tiene la capacidad de calcular el paso del tiempo (Ward, 1977 citado por Moore-Ede, 1982). El que los organismos sean capaces de cumplir exitosamente esta tarea de medición genera varias preguntas: ¿Dónde está ubicado el reloj? ¿Cómo trabaja? Y ¿Qué ventajas confiere al organismo?

Durante muchos siglos se asumió que los ritmos biológicos eran una consecuencia de los cambios ambientales periódicos, hasta que Jean Jacques d'Órtous de Mairan realizó un experimento clave en 1729. Este experimento consistió en seguir el

movimiento de una *Mimosa pudica*, aislada de estímulos luminosos, él encontró que la planta en ausencia de estos estímulos continuaba abriendo sus hojas durante el día y cerrándolas durante la noche, De Mairan, creyó que la temperatura podría actuar como sincronizador, 30 años después Duhamel du Monceau demostró que el movimiento de las hojas no era debido a las variaciones de temperatura; *M. púdica* demostró durante los experimentos ser capaz de mantener ese movimiento de apertura y cierre foliar a pesar de encontrarse en condiciones constantes, lo que sugirió la existencia de un reloj sugirió que el reloj endógeno; esto quiere decir que el movimiento foliar era originado por un proceso que tomaba lugar dentro del organismo y que es capaz de persistir aun en ausencia de los ciclos ambientales diarios (Moore-Ede, 1982).

En 1832 Agustin De Candolle descubrió que el movimiento diario de las hojas de *Mimosa pudica* no solo persistía en constante obscuridad sino que el periodo que presentaba era no de 24 horas sino de entre 22 y 23 horas. Los fenómenos rítmicos observados en *Mimosa púdica*, no son únicos desde entonces la ritmicidad se ha demostrado en muchos otros organismos de todos los reinos, incluyendo los procariontes.

2.1.1 Características del reloj Biológico.

La selección natural ha jugado un papel importante en la elección de mecanismos significativamente diferentes para lograr que exista un acoplamiento entre los procesos fisiológicos en los organismos vivos y las claves ambientales, de modo que para el estudio formal de los ritmos biológicos fue necesario definir criterios que permitieran identificar cuando una oscilación era producida por un reloj biológico y cuando se trataba únicamente de un algún otro tipo de acoplamiento al ambiente (Seghal, 2004). Para su estudio los ritmos circadianos han sido definidos mediante criterios ampliamente observables y establecidos científicamente. Esto es para definir a una oscilación diaria como un ritmo producido por un reloj biológico es necesario que posea algunas propiedades como: ser endógeno, tener un periodo cercano a 24 horas en

oscilación espontánea, tener la capacidad de compensar la temperatura y de sincronizarse con las señales ambientales.

Características Endógenas

Cuando existe una verdadera ritmicidad endógena, se puede observar que los ritmos persisten en oscilación espontánea (free running en inglés), es decir en ausencia de señales ambientales que le permitan sincronizarse (Strauss, 2010), los ritmos endógenos:

- 1- Son ubicuos en la inmensa mayoría de las especies biológicas (Pittendrigh, 1981).
- 2- Se mantienen por períodos prolongados de aislamiento ambiental: si se tratara de un fenómeno pasivo, al suprimir la influencia externa la ritmicidad debería desaparecer.
- 3- Se observa una gran variabilidad intraespecífica de τ (periodo del sistema circadiano), sin embargo esta es siempre constante para los distintos ritmos del mismo individuo, habiéndose eliminado la fuente de variación ambiental, la variabilidad de τ sólo puede explicarse por diferencias genéticas.
- 4- El período de oscilación libre es cercano pero no igual a 24 h, tiene poca variación a lo largo de series de tiempo prolongadas, como consecuencia de un proceso que cuenta con mecanismos de regulación (Aschoff, 1969; Aschoff, 1981).
5. el periodo compensa la temperatura, es decir su periodo no varía al variar ésta dentro de ciertos intervalos.
6. Se pueden sincronizar a fenómenos periódicos externos al organismo y “ponerse a tiempo” o sincronizarse con la hora local

Los ritmos endógenos:

Son cercanos a 24 horas

La mayoría de los organismos tienen un periodo en oscilación libre de entre 23 y 25 horas; un individuo con un periodo de 23 horas 31 min, comenzará su actividad 29 minutos más temprano cada día. El que un organismo tenga un periodo ligeramente mayor o menor de 24 horas, le permite sincronizarse a las condiciones ambientales con más facilidad, el acoplamiento entre dos osciladores es más sencillo si los periodos de ambos son muy parecidos; cada especie tiene un rango de sincronización por ejemplo la mayoría de los organismos pueden ser sincronizados a periodos entre 23 h y 25 h, pero no a periodos de 5 h o 39 h. , sin embargo el rango de sincronización puede ser ampliado si la frecuencia del sincronizador es un múltiplo o submúltiplo de la frecuencia circadiana (24h) (Refinetti, 2006).

La Tierra tarda 24 horas en girar sobre su propio eje y el resultado de este movimiento es el ciclo día y noche. Los organismos han tratado de acoplarse a este periodo, por lo tanto, lo mejor es que sus ritmos sean cercanos 24 horas. El que un organismo tenga un periodo ligeramente mayor o menor de 24 horas, le permite sincronizarse a las condiciones ambientales con facilidad (Seghal, 2004). Jürgen Aschoff uso el termino zeitgeber (dador de tiempo, en alemán) para denominar una señal ambiental periódica que sincroniza el tiempo de un ritmo circadiano. Los cronobiólogos se refieren al tiempo definido por un ciclo ambiental como zeitgeber time (ZT) (Seghal, 2004).

Cuando los organismos son mantenidos en condiciones de obscuridad constante y se expresa la condición endógena de un ritmo ya que continúa oscilando libremente, el periodo es medido en “tiempo circadiano” (TC) que es el tiempo del reloj interno, que al ser ligeramente diferente de 24 horas no es el mismo que el ZT. El tiempo circadiano se calcula mediante la relación entre el periodo del zeitgeber o ciclo externo T y τ .

Compensan los cambios de temperatura

El periodo circadiano se mantiene constante a través de un amplio intervalo de temperatura. Si el mecanismo subyacente a la manifestación de los ritmos es de naturaleza bioquímica, los cambios en la función de las proteínas a diferentes

temperaturas debería alterar la tasa de la reacción de la que depende la periodicidad de los ritmos (Seghal, 2004). Sin embargo esta periodicidad está compensada.

Esto significa que el periodo del reloj es aproximadamente el mismo bajo diferentes condiciones ambientales de temperatura, siempre dentro de cierto intervalo óptimo, esto no es lo mismo que decir que son insensibles a la temperatura; de hecho los ciclos de temperatura ambiental pueden sincronizar al reloj. La compensación de temperatura en un organismo en oscilación libre existe pero la fase del reloj puede modificarse por transiciones de temperatura. La compensación de temperatura ayuda a que el trabajo del reloj sea más estable, de este modo la velocidad del reloj biológico no cambia al aumentar la temperatura durante el día, ni disminuye con la disminución de temperatura durante la noche. La compensación de temperatura en los relojes circadianos significa que el periodo del reloj es aproximadamente el mismo bajo diferentes condiciones ambientales.

Se sincronizan a señales ambientales

Existen varias señales ambientales que son capaces de sincronizar el reloj, entre ellas se encuentran la luz, la temperatura, los estímulos sociales y la disponibilidad de alimento, entre otros. Sin embargo el más importante es la luz (Kyriacou et. al., 2000).

Se puede decir que un oscilador se ha sincronizado a un zeitgeber cuando al cambiar el periodo de éste último, el ritmo biológico cambia su periodo para ajustarse y hacerse igual al del zeitgeber.

Existe un fenómeno llamado enmascaramiento que ocurre cuando el zeitgeber impone cambios directos sobre la variable de salida, por ejemplo, algunos animales diurnos reaccionan ante la luz con actividad locomotora espontánea; mientras que en algunos nocturnos se suprime la actividad. Un organismo que presenta actividad locomotora en un fotoperiodo luz-oscuridad (LO), podría aparentar la existencia de un ritmo endógeno, que sin embargo está desencadenado por los cambios luminosos, es decir, es exógeno. La sincronización de fase de ritmo endógeno está caracterizada por la anticipación del zeitgeber.

Un ritmo, entonces, puede ser definido como un cambio que se repite con un patrón, periodo y probabilidad similares (Koukkari, 2006). La idea de ritmicidad transmite la noción de ocurrencia regular y predecible de un evento (Dunlap et al., 2004) si la variable que cambia es biológica y endógena (pertenece a un ritmo biológico) (Koukkari, 2006). Dado que los ritmos biológicos son eventos rítmicos como el movimiento de las olas en la superficie del océano, pueden ser esquematizados a partir de una serie de descripciones registradas de manera regular llamadas series de tiempo. Las series de tiempo incluyen algunos parámetros importantes: amplitud y período, su recíproco, la frecuencia y la fase (Dunlap et al., 2004)

El periodo (τ) es el tiempo requerido para completar un ciclo, que puede ser de milisegundos o tomar siglos enteros. Frecuencia (f) es el número de ciclos en una unidad de tiempo y corresponde al inverso del periodo ($f= 1/\tau$). Por ejemplo una hoja que se mueve hacia abajo 4 veces en una hora, tiene una frecuencia de cuatro ciclos por hora, que es lo mismo que un periodo de 15 minutos (Koukkari, 2006).

La amplitud es la extensión de un movimiento oscilatorio medido entre los puntos significativos extremos, (Dunlap et al., 2004) en ella se ve reflejado el nivel de expresión de un ritmo (Hardin 2008). La relación entre dos ritmos sincronizados mutuamente es expresada en términos de diferencia de fase, (Dunlap et al., 2004). Las variables anteriores pueden ser expresadas numéricamente y de este modo permiten dar un significado cuantificable a los ritmos. (Koukkari, 2006).

Los ritmos biológicos pueden agruparse dependiendo de la longitud de su periodo, los ritmos cercanos a 24 horas son llamados circadianos por su raíz latina *circa*, que significa “alrededor de”. Por ejemplo, el ritmo de la temperatura corporal en humanos es cercano a 25 horas en condiciones de aislamiento.

Existen otros ritmos cuyo periodo es menor de 24 horas, éstos son llamados ritmos ultradianos (<20 h) y aquellos ciclos con periodos mayor a 24 horas se denominan infradianos (>28 h) (Koukkari, 2006).

2.1.2 Componentes del reloj

En la actualidad se reconoce a los ritmos circadianos como salidas de diversos sistemas que tiene como función la medición del tiempo (Cloudsley, 1980). Estos sistemas de medición de tiempo son llamados relojes circadianos. La mayor parte del conocimiento de estos sistemas se basa en observaciones a los ritmos circadianos que están directa o indirectamente ligados al control de un marcapaso, por ejemplo, la actividad locomotora de un organismo; sin embargo estos ritmos no constituyen todo el reloj, la mayoría de estos ritmos son más bien variables de salida del reloj. El sistema que mide el tiempo regula diversos ritmos circadiano, y está conformado de osciladores, marcapasos, y variables de salida (Dunlap et al., 2004).

El reloj es un mecanismo que mide el tiempo y que está compuesto por osciladores. (Dunlap et al., 2004; Hardin, 2008). Un oscilador es un sistema de componentes que interactúan para producir un ritmo con un periodo definible. Un oscilador circadiano puede conducir una salida rítmica, pero requiere de un marcapaso para sincronizarse. El oscilador circadiano, por lo tanto, puede auto sostenerse; pero no puede funcionar correctamente con independencia de otros osciladores (Hardin 2008,).

Un marcapaso circadiano es un oscilador que tiene la capacidad de sincronizarse con señales ambientales, el marcapaso es un oscilador que dirige o pone tiempo a otros osciladores, los marcapasos circadianos pueden actuar directamente o a través de otros osciladores. (Dunlap et al., Hardin 2008), Los marcapasos han sido identificados en vertebrados e invertebrados con ritmos circadianos endógenos (Strauss 2010).

Los criterios para que un conjunto de células sean llamadas marcapasos son los siguientes:

- Actividad oscilatoria circadiana autónoma en condiciones de luz u oscuridad constantes.
- Ser capaz de sincronizarse a claves externas, parámetros ambientales como luz y temperatura para ajustar la fase.

- Pérdida del comportamiento circadiano rítmico después de la ablación de un grupo específico de células o de tejido en la que está contenido.
- Reactivación de la ritmicidad después del trasplante de esas mismas células específicas.
- Actividad circadiana autónoma in-vitro del tejido del marcapasos por un tiempo razonable (Strauss 2010).

Cuanto más complejas son las funciones fisiológicas a regular, más grande es la necesidad de tener relojes específicos para cada órgano o sistema, de modo que cada reloj se haga cargo de una pequeña parte y en conjunto se produzca una ritmicidad robusta. La pregunta que surge entonces es si todos los relojes son iguales o si existe un reloj maestro o central que controle a todos los demás pequeños relojes, de existir un reloj maestro este se ubica generalmente en el sistema nervioso, particularmente en cerebro. El resto de los pequeños relojes en el cuerpo son llamados osciladores periféricos (Shegal, 2004). Aún no es claro cuántos osciladores existen en cada modelo animal ni como están acoplados entre ellos (Strauss, 2010); el grado de autonomía de estos relojes periféricos varía dependiendo tanto de la especie como del oscilador. Los insectos, por ejemplo, tienen muchos osciladores que son autónomos de los marcapasos circadianos o sistemas que medición del tiempo. Con respecto a las señales ambientales como la fotorrecepción, en *Drosophila melanogaster* existe al menos un oscilador que es parte del marcapaso central, aunque este podría ser capaz de tener fotorrecepción directa (Shegal, 2004).

Actualmente se sabe que las bases de la actividad del reloj biológico dependen de la actividad oscilatoria de expresión de algunos genes. (Allada et al. 2001; Yung y Kay, 2001) estos genes del reloj forman asas de retroalimentación con elementos positivos y negativos (Hardin et al., 1990), que les permiten regular su propia actividad transcripcional. El modelo genético del sistema circadiano consiste entonces de la sucesiva transcripción y traducción de un gen a proteína, la cual inhibe o promueve su

propia transcripción, el ciclo reinicia cuando la proteína se degrada. (Roenneberg y Merrow, 2003)

Como señalé anteriormente, la luz es el principal sincronizador ambiental del reloj circadiano. Muchos organismos tienen pieles o recubrimientos que no permiten el paso de la luz a todas las estructuras del organismo; sin embargo, algunos organismos tienen estructuras que funcionan como receptores fóticos que envían información a los marcapasos. Los marcapasos, a su vez, envían esta información a los osciladores periféricos a través de neuropeptidos y hormonas, que son la fuente más importante de comunicación de los marcapasos (Seghal, 2004). Los mamíferos, por ejemplo, poseen un reloj maestro multicelular ubicado en el hipotálamo que es llamado núcleo supraquiasmático (SCN), éste es el único oscilador en el cuerpo además del reloj en el ojo que recibe información fótica. Los osciladores periféricos en los mamíferos no pueden percibir la luz y deben ser sincronizados por estímulos fisiológicos como son las hormonas, que pueden ser controladas por el SCN o pueden actuar de forma independientemente sobre los osciladores periféricos.

Los neuropeptidos son moléculas señaladoras secretadas por las terminales nerviosas de células del sistema nervioso (Alberts, 1996), estos han sido ampliamente estudiados por que ejercen efecto en una amplia gama de tejidos que puede o no ser de origen nervioso. Las funciones que se han asociado a los neuropeptidos son muy diversas entre ellas se encuentran: regulación de la reproducción, control gastrointestinal y respiratorio, metabolismo del agua y la sal, control de la temperatura e incluso algunos componentes conductuales. Los neuropeptidos pueden ser vistos como los mensajeros del reloj que distribuyen señales específicas, en el momento adecuado a los órganos blanco.

Se ha reportado que algunas familias de neuropeptidos poseen motivos estructurales comunes, esto permite que una misma clase de neuropeptidos sirva a funciones fisiológicas o conductuales distintas, dificultando la comprensión de la función fisiológica de algunos neuropeptidos (Fanjul-Moles, 2006). Sin embargo algunas de las modificaciones que sufren los neuropeptidos son mejor comprendidas, por ejemplo, los

neuropéptidos que regulan los ritmos motores requieren de la amidación del extremo carboxilo para que se exprese el ritmo locomotor.

2.2 *Procambarus clarkii* como modelo de estudio.

En este trabajo el modelo de estudio es un acocil *Procambarus clarkii* que pertenece a la clase Malacostraca, orden Decapoda, suborden Pleociemata, infra orden Astacidae (Holdich, 2002), *P. clarkii* (Girard, 1852), es un crustáceo dulceacuícola, originario del sur-centro de Estados Unidos y del noreste de México, pero dada su importancia económica ha sido introducido en Europa, África, en el sudeste de Asia y en el centro y sur de (Huner, 1988). *Procambarus clarkii* ha causado problemas serios a los ecosistemas de aguas dulces donde ha sido introducido (Castañón-Cervantes et al., 1996; Li SC, 2005).

Los acociles han sido estudiados en diversos campos de la investigación tales como: oncología, la neurofisiología, para la conservación biología y para la sistemática (Sinclair, 2004). Por lo tanto, en muchos aspectos puede considerarse como un organismo modelo (Crandall, 2002).

Especialmente importantes han sido los estudios en organismos modelo, que ofrecen poderosos enfoques genéticos y sistemas más simples que los de los vertebrados más complejos. (Seghal, 2004)

2.3 Los Relojes y el sistema endocrino de los crustáceos

Los ritmos circadianos en crustáceos son controlados también por marcapasos internos que de manera autónoma controlan los niveles de actividad celular y de ese modo regulan eventos fisiológicos y de comportamiento en un patrón oscilatorio. Al igual que en muchos taxones de otros animales (Vansteensel, 2008), los osciladores en los

crustáceos se encuentran ubicados principalmente en el sistema nervioso (Aréchiga, 2002).

Como he mencionado antes, los ritmos circadianos a nivel celular se encuentran ubicados en una red restringida de células que se comunican entre sí, estas células han sido identificadas como células del reloj, en vertebrados e invertebrados los experimentos realizados hasta el momento sugieren que estas células pueden estar ubicadas en tejidos neurales separados y formar interacciones complejas entre ellos (Aréchiga, 2002). En los crustáceos los centros del reloj se encuentran ubicados principalmente en el sistema nervioso e incluyen al cerebro, la retina del ojo, el pedúnculo ocular, y el fotorreceptor caudal (Strauss y Dircksen, 2010). Sin embargo aun no se sabe con precisión cuántos osciladores están presentes en los crustáceos, ni como se encuentran acoplados y cuáles son los mediadores, para producir un ritmo.

El acocil adulto como todos los crustáceos tiene un sistema nervioso central de tipo ganglionar, formado por dos cordones nerviosos ventrales que unen varios ganglios en forma de escalera; un ganglio cerebroide (ganglio supraesofágico), un ganglio subesofágico, cinco ganglios torácicos y cinco ganglios abdominales, de cada ganglio salen nervios que inervan diferentes apéndices (Maynard, 1965). El ganglio cerebroide se divide en tres regiones: A) protocerebro, que inerva la región óptica, b) deutocerebro, que inerva las anténulas, y c) tritocerebro que inerva las antenas y el intestino.

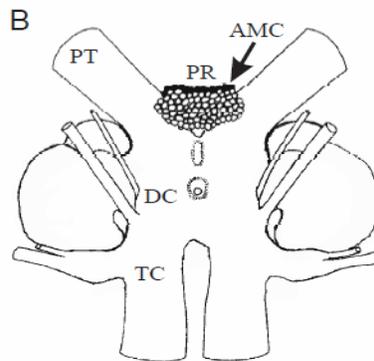


Fig 1. representación esquemática del cerebro de *P. clarkii*. PR, protocerebro; PT, tracto protocerebral; AMC, grupo neuronal anteromedial del protocerebro; DC, deutocerebro; TC, tritocerebro. (tomado de Fanjul *et al.* 2004)

En los crustáceos de la clase malacostraca el sistema neuroendocrino se encuentra ubicado en el tallo ocular, y ganglios torácico, abdominal y subesofagico, (Fanjul-Moles et al., 2006) a lo largo del sistema nervioso central (de Kleinj, 1995). Este está formado por agregaciones de células neuroendocrinas (que forman órganos neuroendocrinos) como el complejo órgano-X- glándula sinusal (XO-SG), el órgano pericardico (PO) y el órgano post comisural (PCO). Estos órganos producen neurohormonas que son vertidas a través de los axones terminales de las células neuroendocrinas, a órganos neurohemales; en estos órganos las neurohormonas son modificadas o almacenadas.

En el sistema endocrino también hay glándulas endocrinas no neurales que secretan sus productos directo a la hemolinfa, los órganos endocrinos son el órgano mandibular (MO), órgano-Y y la glándula adrenogénica.

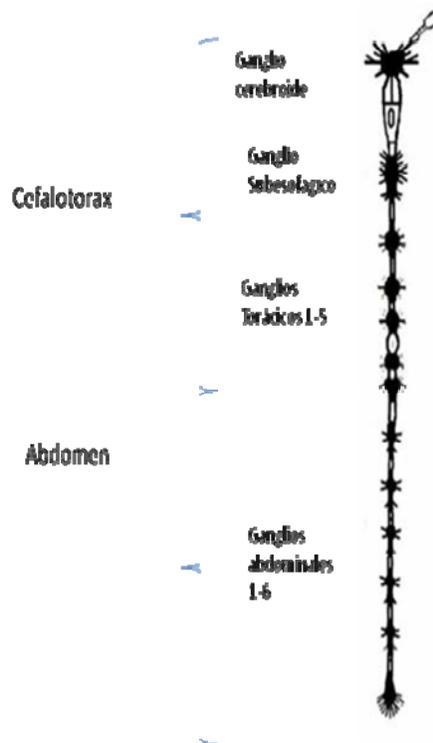


Figura 2. Esquema del ganglio cerebroide y la cadena ganglionar del acocil. (Modificado de Aréchiga *et al.*, 1993)

Las hormonas liberadas por los órganos endocrinos y neuroendocrinos incluyen: péptidos, esteroides, aminas, terpenoides y diferentes tipos de prostaglandinas (Vogt 2002).

El complejo órgano-X, glándula sinusal (OX-GS) parece ser el sistema neuro-regulador más importante, (de Kleinj 1995). Este complejo es considerado la glándula maestra del sistema neuroendocrino y su función es análoga a la de la glándula pituitaria en vertebrados (Fanjul-Moles 2006).

El complejo (XO-SG) se encuentra ubicado en el tallo ocular, en la superficie del ganglio óptico en la porción dorsolateral entre la medula externa e interna. El órgano X (XO) está localizado en el córtex lateral anterior de la medula terminalis, cerca del cuerpo hemielipsoidal y está conformado por un grupo de 150-200 células neurosecretoras, que tiene entre 30-70 μm de diámetro, sus axones corren alrededor de la medula terminalis y cruzan hasta el lado opuesto, (Fanjul-Moles 2006) donde sus terminales axónicas, se unen a algunas del cerebro y con las de otras neuronas cercanas a la arteria oftálmica para dar forma a la glándula sinusal (SG) (Strauss y Dircksen 2010). La glándula sinusal es un órgano neurohemal que secreta hormonas a la hemolinfa, (Vogt 2002). La glándula sinusal es reconocida como una estructura superficial iridiscente presente entre la medula interna y medula externa de cada tallo ocular.

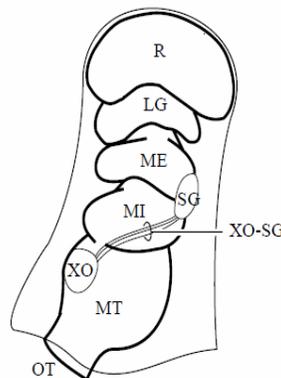


Fig 3. Sección horizontal del Pedúnculo ocular de *P. clarkii* : R, retina; LG, lámina ganglionaris; ME, médula externa; MI, médula interna; MT, médula terminalis; SG glándula sinusal; XO, órgano-X; XO-SG, tracto órgano X-glándula sinusal; OT, tracto óptico (Tomado de Escamilla-Chimal, *et al.* 2001)

2.4 La hormona hiperglicemiante de los crustáceos

La hormona hiperglicemiante de los crustáceos (CHH) es uno de los neuropéptidos más abundantes en el tallo ocular; en el acocil el XO tiene 35 células productoras de CHH, localizadas en la parte rostro-distal y lateroventral de la medula terminalis, en el órgano X. La CHH puede ser observada mediante microscopia de fluorescencia con apariencia granular, y puede ser detectada en el cuerpo celular, axones y terminales axónicas, mediante microscopia electrónica (Kallen 1981). En los acociles los niveles de glucosa y lactato en la hemolinfa están bajo la regulación directa de la CHH (Fanjul-Moles, 2006); esta hormona tiene como una de sus funciones principales incrementar los niveles de glucosa en la hemolinfa, actuando sobre el hepatopáncreas (Komali 2005).

2.4.1 Funciones asociadas a la CHH

Aunque la CHH tiene como papel central el control de los niveles de glucosa en hemolinfa han sido descritas otras importantes funciones fisiológicas para ella, por ejemplo se sabe que está involucrada con funciones como la muda, reproducción, inhibición de ecdisteroides en cangrejos *Carcinus maenas*, metabolismo de lípidos, consumo de agua, y tal vez sea el péptido osmorregulador en *C. maenas*, además de poseer un rol como hormona involucrada en la respuesta adaptativa al estrés. Incluso se ha propuesto que la CHH afecta cada aspecto de la fisiología de los crustáceos (Fanjul 2008).

La función de la CHH durante periodos de estrés ha sido medida en diferentes crustáceos (*Homarus americanus*, *Nephrops norvegicus*, *Palaemon elegans*), las pruebas han sido realizadas sometiendo a los organismos diferentes tipos de estrés ambiental como: hipoxia, cambios térmicos, salinidad, parasitismo, exposición a contaminantes como: metales pesados y liposacáridos. Se ha observado que después del contacto con alguno de estos factores de estrés se produce un incremento en los niveles de CHH en, hemolinfa y tallo ocular (Webster, 1996; Chang et al., 1998, Stentiford et al., 2001). Se cree que la liberación de la CHH en el sistema nervioso durante los periodos de estrés es importante para la reunión de los requerimientos metabólicos de las células neuronales o que puede jugar un papel neuromodulatorio

agregado a funciones endocrinas (Chang et al., 1999). Cuando se observa el efecto de los contaminantes ambientales como metales pesados sobre los niveles de glucosa en la hemolinfa durante un periodo de tiempo, se observa un incremento de glucosa como respuesta al estrés (Lorenzon et al., 2000, 2004). La CHH tiene la capacidad de regular el equilibrio de iones y agua incrementado los potenciales diferenciales transepiteliales y los influjos de sodio provenientes de las agallas de los cangrejos (Morris, 2001; Spanings-Pierrot et al., 2000) y y de los acociles (Serrano et al., 2003). Su función osmorregulatoria parece estar relacionada con algunos ciclos de muda.

La CHH pertenece a una familia de hormonas que llevan el mismo nombre, la familia de la CHH, en esta han sido agrupadas hormonas que están genéticamente relacionadas y que comparten algunos motivos así como un péptido señal; las hormonas en esta familia pueden a su vez ser agrupadas en dos subfamilias, de acuerdo a su función y a los motivos estructurales que los péptidos comparten.

En la subfamilia I o de la CHH solo se encuentra esta hormona que ha sido caracterizada como una secuencia de entre 72 y 73 aminoácidos que posee un conjunto de motivos invariables que la distinguen, como las seis cisteínas que forman tres puentes disulfuro en las posiciones 7-43, 23-29 y 25-52 (Böcking et al., 2002. (Soyez, 1997; Ollivaux and Soyoz, 2000; Serrano et al., 2003, 2004; Chen et al., 2004); la amidación en el extremos C-terminal, que se ha asociado con la presencia de actividad biológica en la CHH [30,31]; otra característica exclusiva de la subfamilia I es la presencia de un péptido precursor, localizado entre el péptido señal y la hormona (Giulianini et al., 2002; Ollivaux et al., 2006). La secuencia invariable en el extremo N-terminal: pGlu-Val-Phe-Asp-Gln. Y la presencia de un piroglutamato bloqueando la posición N-terminal (Ollivaux et al., 2006).

La subfamilia II o subfamilia de las MIH/GIH, en la que se encuentran agrupadas: la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora del crecimiento (GIH), la hormona inhibidora de la vitelogénesis (VIH) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (Keller, 1992; de Kleijn and Van Herp, 1995; Lacombe et al, 1999; Bulau et

al., 2005). Todos los péptidos de esta subfamilia, tienen un residuo de glicina en la posición 12, que se encuentra bloqueado en todas las CHHs, esta diferencia podría ser una pieza calve para entender las divergencias estructurales y funcionales entre las subfamilias (Katayama y Nagasawa, 2004).

Muchos grupos de trabajo coinciden con la idea de que los péptidos pertenecientes a la familia de la CHH son polimórficos, debido a pueden presentar isomerización L-D y poseen frecuentes las variaciones en sus secuencias. La CHH que es miembro de esta familia no es la excepción, hasta el momento se han reportado alrededor de 40 genes en diferentes especies de, camarones, cangrejos, acociles y langostas, sin embargo el número total de genes codificantes para esta proteína no ha sido aun determinado. En algunos de estos grupos se ha identificado más de una isoforma para la CHH (Chan et al., 2003).

2.4.2 Fisiología de la CHH

La CHH actúa mediante diferentes mecanismos sobre los órganos blanco. Algunos de los órganos blanco bien caracterizados son el hepatopáncreas y el musculo, donde la CHH activa a la glucógeno fosforilasa (Keller & Sedlmeier, 1988). La CHH provee glucosa y lípidos para mantener los requerimientos energéticos de órganos y tejidos (Kummer and Keller, 1993). También juega un papel importante en la regulación de los ácidos grasos y fosfolípidos en la hemolinfa mediante el catabolismo de los almacenes de lípidos del intestino medio (Kummer and Keller, 1993; Santos and Keller, 1993a; Santos et al., 2001).

El proceso de movilización de glucosa y lípidos es regulado por dos asas de retroalimentación, en la primera asa la regulación curre del siguiente modo: Cuando los niveles de glucosa en la hemolinfa son bajos y se produce hipoglucemia, las células secretoras de CHH se despolarizan induciendo la secreción de CHH a la hemolinfa y la movilización de glucosa a partir de los reservorios de glucógeno; cuando los niveles de glucosa aumentan en la hemolinfa se forma D-glucosa que inhibe la liberación de CHH

por medio de una corriente de K⁺, que producen una hiperpolarización de la membrana (Glowik et al., 1997).

La segunda asa de retroalimentación es positiva, en ella el lactato producido por el aumento del flujo glucolítico estimula la liberación de CHH que estimula a su vez la glucogenolisis (Fanjul-Moles et al., 2006) Durante el transporte de los órganos neurohemales a los órganos blanco en la hemolinfa , la CHH esta unida a subunidades de heomocianina (Kallen et al., 1990),

Se ha propuesto que la serotonina tiene un papel importante en la regulación de la glicemia de los crustáceos (Bauchau and Mengeot, 1966) debido a que produce liberación de CHH presente en la glándula sinusal, de lo que resulta un aumento de glicemia (Strolenberg and Van Herp, 1977; Martin, 1978). Se ha comprobado que las células productoras de CHH en el órgano X del acocil poseen también terminales sinápticas serotoninérgicas, (Van Herp and Kallen, 1991; Escamilla-Chimal et al., 2001). En el caso particular de *P. clarkii* se ha demostrado mediante pruebas *in vitro* que la concentración de serotonina (5-HT) aumenta la secreción de CHH de manera dosis-respuesta (Escamilla-Chimal et al., 2002).

2.4.3 Isoformas de la CHH

La CHH ha demostrado ser una hormona plurifuncional y polimórfica, a pesar de que es el complejo OX-GS el locus principal de producción de esta, no es el único órgano en el que la CHH ha sido encontrada, en diferentes crustáceos por medio de pruebas inmunohistoquímicas también ha sido identificada en el ganglio torácico y el ganglio subesofágico de *Homarus* (Chang, 1999), en paraneuronas del intestino anterior y posterior en *Carcinus* (Chung, 1999; Webster, 2000), en el órgano pericárdico (PO), la glándula sinusal (SG) y el plexo cardiaco anterior (Hsu 2006). En algunas especies de cangrejos (*Cancer antennarius*, *C. anthonyi*, *C. borealis*, *C. gracilis*, *C. irroratus*, *C. magister*, and *C. productus*), y en la retina de *Procambarus clarkii* (Escamilla-Chimal et al., 2002).

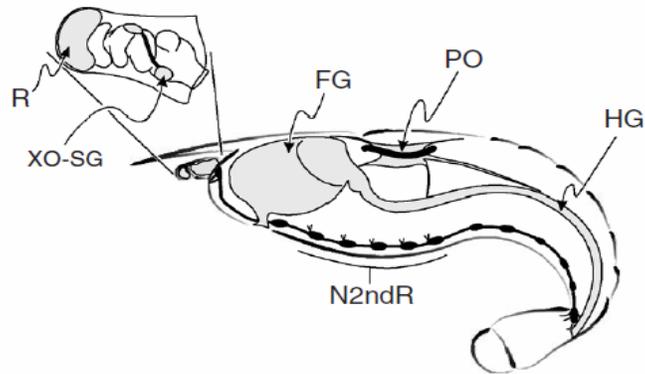


Fig. 4 Esquema que ilustra los diferentes sitios propuestos para la producción en decápodos. R, retina; XO-SG, órgano-X- glándula sinusal; FG, intestino anterior; HG, intestino posterior; N2ndR, neuronas de la segunda raíz torácica; PO, órgano pericárdico. (Tomado de Fanjul *et al.* 2006)

Las isoformas de la CHH tienen actividad glicémica diferente, se han identificado más de diez productos provenientes de diferentes genes se ha propuesto que los polimorfismos de la CHH en el mismo animal son el resultado de procesos de duplicación y mutación además de las modificaciones postraduccionales (Chen *et al.*, 2004) específicas realizadas en cada grupo de células en que las CHH es sintetizada. En acociles y langosta se ha observado que la isomerización postraduccionaL/D afecta la actividad biológica de la CHH (Toullec, 2006) y la hidrofobisidad (Fanjul-Moles *et al.*, 2006).

Se ha propuesto que las isoformas de CHH secretadas fuera del tallo ocular no intervienen en el aumento de glicemia en la hemolinfa, podrían únicamente incrementando los niveles de glucosa a nivel local cuando los niveles de CHH son bajos en la hemolinfa (Chang *et al.*, 2001) o influenciando la actividad de la melatonina, una bien conocida señal circadiana, (Pevet, 2003).

En *P. clarkii* se han identificado al menos dos variantes de CHH, la CHH I y CHH II, que pueden ser separadas por medio de (RP-HPLC) (Yasuda *et al.*, 1994). Existen algunas diferencias estructurales entre las isoformas por ejemplo, la isomerización L o D de la posición 3 de fenilalanina, además de algunas diferencias en las secuencias que resultan en actividades hiperglicémicas distintas, sin embargo ambas variantes

producen una banda que migra con un peso molecular aparente de 8 kDa. (Escamilla-Chimal et al., 2001) y tienen 72 aminoácidos con 3 uniones disulfuro en las posiciones 7-43, 23-29 y 25-52 (Soyez, 1997; Ollivaux and Soyez, 2000; Serrano et al., 2003, 2004; Chen et al., 2004).

2.4.4 Aspectos rítmicos de la hormona hiperglicemiante de los crustáceos

La ritmicidad de la CHH ha sido estudiada en los órganos identificados como productores o secretores de esta hormona. El OX, en condiciones experimentales presenta la aparición de gránulos en el citoplasma de la proteína CHH dos horas antes del periodo de oscuridad, según pruebas inmunohistoquímicas, los gránulos de CHH son transportados a la SG donde ocurre un rompimiento exocitótico justo en el momento del apagado de la luz, que libera la CHH por un periodo de 3 h a la hemolinfa, produciendo el aumento en la glucosa. El mismo proceso pero con menos intensidad es repetido al inicio de la fase de luz y causa un segundo aumento de glucosa en la hemolinfa pero de menor intensidad (Gorgels and Voorter, 1985, Escamilla et al., 2000).

En la retina existen variaciones circadianas diarias en la expresión de CHH; La expresión de CHH en esta estructura es afectada por la cantidad de luz en fotoperiodo LD (Fanjul-Moles, 2005), como ha sido demostrado para otros ritmos endógenos (Yamada et al., 1988; Binkley, 1990; Honma et al., 1992).

Según pruebas inmunohistoquímicas, los cambios circadianos en la abundancia relativa de CHH en retina y tallo ocular, son controlados endógenamente, ya que estos continúan corriendo libremente después de 72 horas de oscuridad y tiene un periodo cercano a 24 h (Escamilla-Chimal et al., 2001).

3.

Planteamiento del problema

Parte de la actividad rítmica y metabólica, de los crustáceos decápodos depende de la concentración de glucosa que circula en la hemolinfa, esta, presenta variaciones diarias, debidas a la secreción de CHH (una hormona similar al glucágon de los vertebrados) en el tallo ocular.

El ritmo que de glucosa en la hemolinfa en los decápodos está caracterizada por bajas concentraciones de glucosa en durante el día y un pico de alta concentración unas horas antes del anochecer (Hamann, 1974), el ritmo de la glucosa y el del lactato presentan oscilaciones circadianas de naturaleza endógenas, es decir se encuentran bajo el control del reloj circadiano (Aréchiga et al., 1985; Kallen et al., 1990).

El ritmo de la glucosa en hemolinfa coincide con los periodos de actividad y reposo observados en el acocil, aunque los ciclos de glucosa son dependientes de la especie, generalmente existe un incremento en la concentración de glucosa en la hemolinfa durante las horas pico de actividad locomotora (Hamann, 1974; Kallen et al., 1988, 1990). Debido a que el la producción de lactato en los músculos aumenta con el incremento en la actividad locomotora, su concentración en la hemolinfa igual que la concentración de glucosa, ciclan bajo condiciones normales, en animales no estresados (Chang & O'Connor, 1983).

Pruebas inmunoquímicas e inmunohistológicas han demostrado incrementos en la secreción de CHH entre 2-4 horas antes del aumento en los niveles de glucosa en la hemolinfa (Gorgels-Kallen & Voorter, 1985; Van Herp & Strolenberg, 1980). Lo anterior indica que este ritmo presenta un patrón similar al de la glucosa en la hemolinfa aunque anticipado ya que la secreción de esta ocurre un par de horas antes (Kallen 1990). En el caso particular de *P. clarkii* los niveles de secreción de CHH son más bajos durante el día e incrementan durante las primeras horas de la noche, como fue reportado para los géneros *Orconectes* y *Astacus* (Fanjul-Moles et al., 2010). Por otra

parte se ha comprobado que el ritmo de la CHH esta sincronizado con los ciclos de luz oscuridad (Kallen et al., 1988).

Sin embargo a pesar que la expresión como la secreción de CHH en En *P. clarkii* en el tallo ocular ha sido demostrada , no existen pruebas moleculares funcionales que avalen la ritmicidad diaria y /o circadiana de su síntesis; en este trabajo se trató de identificar tanto el mensajero de la CHH como su posible funcionalidad diaria , el conocer si el mensajero de CHH es sintetizado rítmicamente ayudará a comprender los mecanismos circadianos que regulan la síntesis y liberación de esta hormona .

4.

Hipótesis

La expresión del RNAm de la hormona hiperglicemiante de crustáceos presenta una ritmicidad diaria sincronizada a los ciclos de luz-oscuridad.

5.

OBJETIVOS

- General:
 - A partir de cDNA, identificar si el RNAm de la CHH, presente en el tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii*, se expresa constitutivamente o si presenta oscilaciones diarias.
- Particulares:
 - Diseñar un conjunto de cebadores que amplifiquen el RNAm de la CHH
 - Purificar y secuenciar los productos amplificados.
 - Analizar la identidad de la secuencia obtenida con la previamente reportada por Yasuda-Kamatani (2000) para la CHH de la glándula sinusal.

Por medio de RT-PCR semicuantitativa comparar la expresión de *chh* en diferentes horas del día.

6.

Material y

método

6.1 Animales y diseño experimental:

Se emplearon 78 acociles *Procambarus clarkii* adultos, sin distinción de sexo, en intermuda, colectados en Chihuahua, México. Los animales se dividieron en dos lotes de 39 animales; el lote 1 se mantuvo en fotoperiodo LD 12:12 (07:00 h = zt 0) y el lote 2 en fotoperiodo invertido DL 12:12 (19:00 h = zt 0), con el objeto de poder extraer las muestras del día y de la noche en el mismo momento. Ambos lotes se mantuvieron con los fotoperiodos antes descritos, en condiciones de laboratorio, dentro de acuarios, a una temperatura de 20° y alimentación *ad libitum* durante 12 días con el objeto de sincronizarlos.

Los animales de ambos lotes se subdividieron en tres grupos de 13 animales cada uno, para la disección. A las 7:00h se realizó la disección de los grupos 1 y 4 que correspondían a los zt 0, y zt 12 respectivamente, a las 11:00h la disección de los grupos 2 y 5 (zt 4, zt 16) y a las 15:00 h la disección de los grupos 3 y 6 (zt 8 y zt 20).

6.2 Diseño de cebadores:

En la base de datos de Gene Bank, se buscaron las secuencias en pares de bases y aminoácidos, para la CHH y sus isoformas, reportadas en diferentes especies de crustáceos entre ellas: *Callinectes sapidus* (Gene Bank: CHH AAS45136), *Homarus americanus* (Gene Bank: CHH AAS45136), *Macrobrachium rosenbergii* (Gene Bank: Mar-CHH AAL40915), *Nephrops norvegicus a y b* (Gene Bank: CHH AAS45136) (Gene Bank: CHH AAS45136), *Orconectes limosus* (Gene Bank: Ori-CHH CAA56674), *Procambarus bouvieri* (Gene Bank: Prb-CHH P55845), *Procambarus clarkii* (Gene Bank: Prc-CHH BAA89003.1).

Las secuencias fueron alineadas en el programa ClustalW2 (EMBL-EBI) para detectar homologías entre las pares de bases o entre los aminoácidos, con base en las regiones más conservadas y utilizando una tabla de preferencia de codones para el acocil *P*.

clarkii, se diseñaron cebadores sentido y anti sentido, con el programa Oligo (v. 4.1, National Bioscience Inc). Los criterios que se siguieron para generar los cebadores fueron, (T_M) alta (entre 60 y 70 °C), que el perfil del cebador presentara una buena estabilidad interna, además de una baja probabilidad de formación de dímeros. Se sintetizaron los cebadores previamente reportados con los que se habían logrado obtener fragmentos de CHH en otros organismo como *Homarus* y *Orconectes limosus* (Giulianini del 2002 y de Kleinj, 1994, respectivamente).

6.3 Extracción de RNA

Se extrajo el RNA total del tallo ocular de los diferentes grupos de tiempos circadianos (03:00 h, 07:00 h, 11:00 h, 15:00 h, 19:00 h, 23:00 h). Los del lote 1 (grupos 1, 2 y 3) para las extracciones del día y los del lote 2 (4, 5 y 6), con fotoperiodo invertido, para las extracciones de la noche.

Los animales se sacrificaron por decapitación, lo más rostralmente posible, con el propósito de evitar que los líquidos estomacales se derramaran sobre el resto de los tejidos. La disección se hizo sumergiendo los tejidos en una solución estabilizadora RNA (RNAlater, Ambion).

Una vez disectados los 13 animales el tejido se pesó (150 mg) se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 250 μ l de Tripure (Roche), este reactivo permite aislar DNA, RNA y proteínas de la misma muestra siguiendo el método de Chomczynsky (1993).

Los tejidos se homogenizaron, primero cortando con una tijeras finas previamente esterilizadas y posteriormente con un homogenizador de pistilo plástico estéril. La mezcla se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4° C. el sobrenadante que contenía a las proteínas, DNA y RNA fue transferido a un nuevo tubo estéril, al que se agrego 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de TriuPure usado. La muestra se incubó 15 min a temperatura ambiente y después se centrifugó 12,000 x g por 15 min a 4° C.

En el tubo se formaron tres fases. La fase inferior es el extracto clorofórmico que, contiene el DNA la fase blanquecina que le sigue contiene las proteínas y la fase

acuosa superior contiene al RNA. La fase traslucida fue transferida a un nuevo tubo, al que se agregaron 0.5 ml de isopropanol al 100% (a 4°C) por cada ml de TriPure usado, se mezcló por inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente 10 min., después que se comprobó que el RNA se precipitó, se centrifugó 10 min. La pastilla (pellet de RNA total), fue lavada y resuspendiéndola en etanol al 75%, se centrifugó y se retiró el exceso de alcohol, se resuspendió con 20 µl de agua estéril, desionizada, libre de RNAsas (tratada con DEPC) a 60° C.

La cantidad de RNA obtenida se cuantificó espectrofotométricamente (Ultrospec 200, Amersham Pharmacia Biotech) , diluyendo 2 µl de muestra en 500 µl de agua desionizada, la cantidad de RNA se calculó con la relación de Sambrook (Martinez-Perez; 2005) donde:

$$1 \text{ unidad de densidad óptica: } DO_{\text{Abs}260} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml de RNA}$$

por lo tanto: $\text{RNA ng}/\mu\text{l} = (DO_{\text{Abs}260}) \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml/Fd}) \times 1000.$

Posteriormente se calculó la relación entre $DO_{\text{Abs}260}$ y $DO_{\text{Abs}280}$ para verificar que la extracción no tuviera proteínas; también la relación de $DO_{\text{Abs}260}$ y $DO_{\text{Abs}230}$ para determinar si la muestra presentaba contaminación por fenol, ya que este puede bajar el rendimiento de la reacción durante la PCR o inhibir la actividad de la *Taq* (Davalieva, 2010).

Para confirmar los valores de la cuantificación se corrió un gel desnaturalizante de agarosa de 40ml al 1.2%. Con 4 ml de MOPS 10X y 6.6 ml de formaldehído. Las muestras se prepararon con 2 µl de MOPS 10X, 3 µl de formaldehído y 3 µl de formamida. Los geles se corrieron a 50 V por 90 min.

6.4 RT-PCR

Con 2 µg de RNA total del tallo ocular de las 03:00 h, 07:00 h, 11:00 h, 15:00 h, 19:00 h, y 23:00h, Se corrieron reacciones de transcripción reversa (RT-PCR) , a partir del RNA total, utilizando el kit SuperScript III (Invitrogen) que tiene una concentración de MgCl_2 25 mM y DNTP's 10mM, amplificando con cebador de oligos dT a una concentración

100 pM, que sintetizan cDNA a partir de las cadenas de poli A presentes en el mRNA presente en la muestra (Haddad, 2007). Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante del Kit y el programa fue corrido en un termociclador programado.

Se preparó un mix que contenía el RNA, el oligo dt y los DNTP's, y se calentó durante 5min a 65 °C con el fin de permitir la desnaturalización del RNA y un mejor alineamiento, la síntesis del cDNA se hizo a 50°C durante 50min, para terminar la reacción se dejó con un ciclo de 5 min a 65°C, 1 min 4°, 50 min a 50°C, 5 min a 85°C, se agregó la RNase H durante 20 min a 37°C que degrada el RNAm restante en la muestra.

Como control, para corroborar la calidad del cDNA producto de las reacciones de RT con el RNA de las diferentes horas, se corrieron reacciones de PCR utilizando cebadores para amplificar actina cuya secuencia y cebadores han sido reportados previamente para el acocil (Martínez Pérez, 2005). Esta amplificación sirvió como control de calidad del RNA y para determinar las mejores muestras para las reacciones de PCR.

Una vez que se comprobó la integridad del cDNA se corrieron reacciones de PCR de 10 µl, con los diferentes pares de cebadores en concentración 100 pM. Las condiciones de amplificación fueron 35 ciclos de: 95° C durante 30 segundos, 60° C durante 1min. 30 s. y 72° C 1min 30s.

Se realizó una electroforesis de las muestras amplificadas en un gel de agarosa 1.5%, TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio 1:10. Para aquellas combinaciones de cebadores que mostraron la amplificación de bandas, con un número de pares de bases (pb) similar al esperado las reacciones se rediseñaron, optimizando la concentración de Mg Cl (.5 – 2.5 mM) y la temperatura de alineación (T_m teórica \pm 5° C), la proporción de cebadores (1Up-.5Dwn, .5Up-.5Dwn, .5Up-1Dwn).

Usando la concentración de MgCl y la T_m optimizada se corrieron reacciones de 100µl, los productos fueron purificados y secuenciados.

Para cada una de las horas circadianas se realizaron reacciones de PCR 10 μ l, con cada reacción de PCR se corrieron también reacciones de control negativo y positivo. En el control negativo se ponía a correr un mix sin cDNA, con el fin de identificar si alguno de los componentes de la PCR estaba contaminado; el control positivo se amplificaba con los cebadores de actina a una concentración de 100 pM, cuyo producto ya era conocido.

Las reacciones de PCR se probaron con el kit Gene Amp PCR Core Kit (Applied Biosystems), la Taq polimerasa (Altenzyme) convencional, y la taq Pfx platinum (Invitrogen), esta última es una enzima de alta especificidad que permite amplificar fragmentos con mayor fidelidad.

6.5 Purificación del cDNA

Los fragmentos amplificados se separaron de un gel preparativo de agarosa de baja temperatura de fusión, esto permitió la recuperación de ácidos nucleicos sin dañarlos después de la electroforesis. Para ello las bandas de interés se cortaron y colocaron en tubos de 1.5 ml a baño maría a 65° C, para derretir el gel. Las bandas se purificaron usando el kit QUIAEX II (QUIAGEN) que tiene perlas de sílica que se unen al DNA por adsorción en un medio salino a pH alcalino de 8.

Para ello se pusieron 300 μ l del buffer QX1 que solubiliza la agarosa y proporciona el medio para que las perlas de sílica se unan al DNA, después de mezclar por vortex se agregó la sílica y se dejó incubar 10 min a 50° C. la mezcla se centrifugó durante 30 s a 12,000 X, el sobrenadante compuesto por la agarosa y el buffer QX1 fue retirado del tubo, la pastilla se lavó con 500 μ l del mismo buffer y centrifugado 30 s adicionales para retirar la agarosa y contaminantes residuales, se hicieron dos lavados posteriores con 500 μ l de buffer PE que contiene etanol y remueve las sales contaminantes. Se dejó secar al pellet a temperatura ambiente para eliminar los restos de etanol presentes en la muestra que podían interferir con las reacciones de secuenciación, el cDNA fue resuspendido con vórtex en 20 μ l de agua estéril, desionizada, libre de RNAsas (tratada con DEPC) a 60° C. El producto se almacenó a -20° C.

La cuantificación del material purificado se realizó por medio de dos técnicas complementarias:

- 1) Cuantificación y cálculo del índice de pureza (Abs 260/Abs280) del DNA por espectrofotometría.
- 2) Electroforesis del gel de agarosa con un marcador de masa y peso molecular Axygen (100 bp-3000 bp), contra el cual se estimó la cantidad de nucleótidos en la muestra.

El resultado se comparo con el obtenido por el espectrofotómetro Ultrospec 200 (Amersham Pharmacia Biotech) diluyedo 2µl de muestra en 500µl de agua desionizada (Fd= 4), la cantidad se calculó utilizando la relación se Sambrook donde:

1 unidad de densidad óptica: DO_{260} (Abs. 260 nm)= 40 µg/ml de RNA

De modo que: $RNA\ ng/\mu l = (DO(Abs\ 260\ nm) \times 40\ \mu g/ml/Fd) \times 1000.$

Esta técnica nos permitió establecer si se contaba con la cantidad necesaria de DNA para determinar la secuencia y detectar la presencia de aminoácidos contaminando la muestra.

Los productos se secuenciaron en el Instituto de Biología de la UNAM con el apoyo de la Dra. Laura Márquez.

6.6 Análisis de secuencias

Se realizaron dos reacciones de secuenciación por cada producto purificado, una con el cebador sentido (Up) y otra con el cebador antisentido (Dwn). Las secuencias después se alinearon en el programa ClustalW2 y completaron entre sí para formar un marco de lectura más preciso. La traducción de pares de bases a aminoácidos se realizó en el programa Translate de la base de datos del EMBL. Las secuencias en pares de bases y

aminoácidos obtenidas se compararon con otras secuencias almacenadas en diversas bases de datos como GeneBank y EMBL.

Las secuencias en pares de bases y los 6 marcos de lectura abiertos se compararon con la secuencia, previamente reportada para CHH en *P. clarkii* y con otras secuencias reportadas para CHH en otros decápodos, utilizando el programa EMBOSS-water Pairwise Alignment Algorithms (EMBL-EBI), así se determinó que los cebadores diseñados estuviesen amplificando la secuencia de interés.

6.7 Analisis de ritmicidad

Para determinar si existen variaciones en la cantidad de mRNA, presente en el tallo ocular del acocil, se realizaron PCR semicuantitativas con cDNA de diferentes horas (03:00 h, 07:00h, 11:00h, 15:00h, 19:00h, y 23:00h). utilizando los cebadores de *P. clarkii*.

Además se hicieron pruebas control con cebadores de actina de modo que se pudiese establecer comparación para medir si los fragmentos identificados oscilaban.

Para establecer el intervalo de cuantificación lineal, es decir el número de ciclos donde no se satura la reacción pero el producto es visible claramente, se montaron 2 reacciones de PCR con distinto número de ciclos (20, 25, 30, 33, 35, 37,40) con los parámetros previamente optimizados de las 07:00 horas.

También se buscó un intervalo para el cDNA, debido a que la cantidad de RNA obtenido en cada extracción es pequeña, la cantidad de cDNA adecuada se definió cuantificando con espectrofotometría una muestra, de esta se hicieron varias diluciones (1:2, 1:4, 1:8 y 1:10) y con cada una de ellas se hizo una PCR, nuevamente se buscó que la banda se observara con claridad.

A pesar de que todas las RT comenzaron con 2µg de RNA totales, la formación de cDNA no fue idéntica en todos los tubos, para asegurar que la cantidad de cDNA en la PCR fuera idéntica se realizó un análisis espectrofotométrico para obtener la cantidad

de microgramos de cDNA presente en las RT de cada una de las horas utilizando la relación de Sambork para doble cadena.

1 unidad de densidad óptica: DO_{260} (Abs. 260 nm)= 50 μ g/ml de DNA

De modo que: DNA ng/ μ l= (DO(Abs 260 nm) X 50 μ g/ml/Fd) X 1,000.

Una vez establecidos el numero de ciclos y la cantidad de cDNA, se corrieron PCR para cada una de las horas, junto con las muestras de las diferentes horas se corrieron un control negativo, sin cDNA para corroborar que no hubiese cDNA preexistente en los reactivos empleados en la reacción y un control interno de actina este método permite una cuantificación más precisa de la cantidad de RNAm en cada hora circadiana.

La intensidad de las bandas se cuantificó con el fotodocumentador Gel Logic 200 (Kodak) y el software Kodak MI. Los datos fueron analizados por estadística descriptiva y graficados en un cronograma.

7.

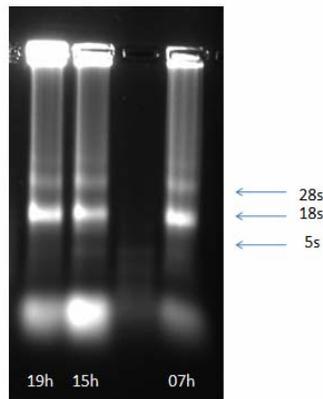
Resultados

7.1 Extracción de RNA

El análisis espectrofotométrico realizado en cada una de las extracciones señaló que existían entre 60 y 100 μg de RNA por cada extracción, las muestras presentaron una relación ($\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$) entre 1.4 y 1.8, y aquellas muestras que tenían una relación menor a 1.5 fueron descartadas.

El RNA fue observado en un gel desnaturalizante de RNA, donde mostro no estar degradado y estar presente en buenas cantidades ribosomales.

Fig 1. Extracción de RNA del tallo del acocil a las 19 h, 15 h y 07 h.



7.2 Estandarización de las condiciones para la RT-PCR

Debido a que la primeras extracciones realizadas correspondían a los ZT 0 y ZT 12 (7 h y 19 h), con estos se probó la amplificación de productos a través de los diferentes cebadores como la T_m teórica de los diferentes cebadores era muy cercana a los 59°C , se probó la amplificación de productos 58°C , 59°C y 60°C . Con base en la valoración visual de los productos se decidió con que cebadores y a que temperaturas se realizarían las reacciones subsecuentes.

El producto que mejor se amplificó fue el resultante de los cebadores diseñados para *P. clarkii* a 60°C .

Para el producto amplificado por los cebadores de Clarkii 1-2, dos enzimas se probaron, la Taq polimerasa de Applied Biosystems y Altezyme, para identificar cuál de ellas generaba una banda mejor definida al observarse en el fotodocumentador, la Taq de Altezyme mostro ser más eficiente, pues generó un mayor número de productos, aunque algunos de ellos se encontraban por encima del numero de pares de bases esperado (700 pb y 450 pb), la Taq de Aplied Biosystems amplificaba con menor intensidad las bandas de mayor número de pares de bases y con más intensidad la banda de 200 pb que esperábamos obtener.

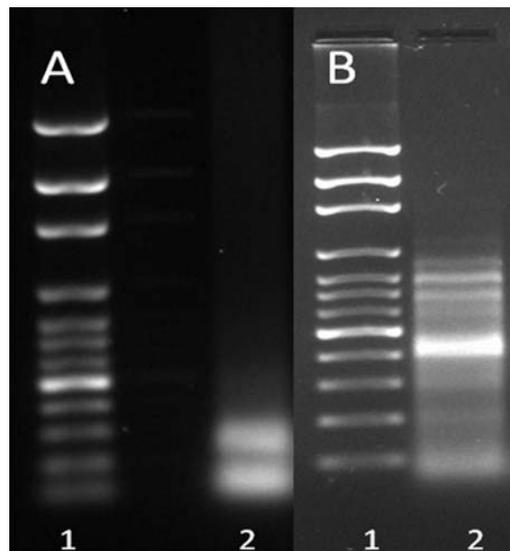


Fig. 2 PCR de tallo con cebadores Clarkii1-Clarkii2. A. PCR con Taq Aplied Biosystems 1) Marcador de masa y peso molecular,2) producto amplificado con los cebadores clarkii1-clarkii2. B. PCR con Taq de Altezyme 1) Marcador de masa y peso molecular,2) producto amplificado con los cebadores clarkii1-clarkii2.

Tomando estos producto se estandarizaron las proporciones de cebadores como ambos estaban hidratados en una concentración de 100 pM, se incluyó en el mix para la PCR una cantidad diferente de cebador UP y Dwn, se probaron combinaciones con mayor cantidad de up y menor de Dwn, (100 pM Up- 50 pM Dwn), proporciones iguales (50 pM Up- 50 pM Dwn), y menor cantidad de up y mayor de Dwn (50 pM Up-100 pM Dwn). No se mostró ninguna diferencia significativa en la amplificación del producto.

Se hizo también una curva de estandarización de magnesio, probando concentraciones que iban de 1 al 3.5 molar la concentración se probó aumentado 0.5 molar para cada mix, en el caso del producto para la Taq de Altezyme se observó que con una

concentración de 2 mM el producto esperado de 200 pb para los cebadores clarkii se amplificaba mejor sin embargo aun era posible amplificar la banda de 500 pb, por esta razón se seleccionó esta concentración para la amplificación de los productos.

Los productos producidos después de la optimización de los parámetros antes descritos para ambas Taq se purificaron y secuenciaron.

Los cebadores de *Orconectes* (Orc1 , Orc2) y *Homarus* (HH1, HH2) se probaron probados con las condiciones descritas en los artículos que fueron publicados, la Taq que se empleó fue la de Altezyme. Los productos obtenidos se sintetizan en la tabla 1.

Tabla 1. combinación de cebadores.

Combinación de cebadores	Secuencia de Cebadores	Producto esperado pb	Tm esperada	Productos obtenidos pb
Clarkii 1 y clarkii 2 (<i>Procambarus clarkii</i>)	Clarkii 1 5'ccaggcttgtaaaggaatatac-3'	198pb	58°C	<ul style="list-style-type: none"> • 500 pb • 200 pb
	Clarkii 2 5'acgagtaca ttccggc-3'			
Orc1 y Orc 2 (<i>Orconectes limosus</i>)	Orc 1 5'GGGAATTCARGTNTTYGAYCARGCNTG YAA-3'	150pb	60°C	<ul style="list-style-type: none"> • 500 pb • 130 pb
	Orc 2 5'CCGGATCCARRTTRTARCARTCYTCRC ANAC-3'			
Hachh1 y Hachh2 <i>Homarus americanus</i>	Hachh1 5'Cccaagcttgyaargghrtbtaygaymg-3'	162pb	62°C	No se logró amplificar
	Hachh2 5'ttymgncartgyybtgaygttgcttggg-3'			
Clarkii 1 y Orc 2	Clarkii 1 5'ccaggcttgtaaaggaatatac-3'	70pb	59°	No se logró amplificar
	Orc 2 5'CCGGATCCARRTTRTARCARTCYTCRC ANAC-3'			

Orc 1 y Clarkii 2	Orc 1 5'GGGAATTCARGTNTTYGAYCARGCNTG YAA-3'	294pb	60°	No se logro amplificar
	Clarkii 2 5'acgagtaca ttccggc-3'			
Clarkii 1 y Hachh2	Clarkii 1 5'ccaggctgtaaaggaatatac-3'	171 pb	60°C	<ul style="list-style-type: none"> • 400 pb • 600 pb
	Hachh2 5'tymgncartgyybtgaygttgcttggg-3'			
Hachh1 y Clarkii 2	Hachh1 5'Cccaagcttgyaargghrtbtaygaymg-3'	186 pb	61°C	<ul style="list-style-type: none"> • 600 • 900
	Clarkii 2 5'acgagtaca ttccggc-3'			

Con la mezcla de cebadores HH1 y HH2 no se logró amplificar ningún producto por lo que este conjunto de cebadores no se utilizó para la secuenciación de la CHH. Los productos resultantes de los cebadores; clarkii 1 y HH2; y HH1 y clarkii 2 no mostraron productos que concordaran con el número de pb esperado, por esta razón sus productos tampoco se purificaron ni secuenciaron.

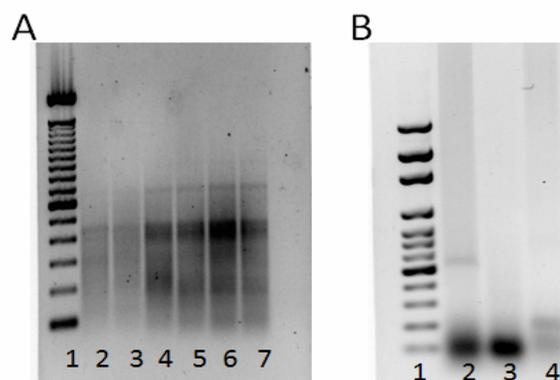


Fig. 3 A PCR CHH curva de optimización de Mg⁺⁺: 1) Marcador de masa y peso molecular, 2) 1 M, 3) 1.5 M, 4) 2 M, 5) 2.5 M, 6) 3 M, 7) 3.5 M, 7). B PCR amplificada con los diferentes pares de cebadores 1) Marcador de masa y peso molecular. 2) PCR amplificada con los cebadores Hachh1 y Hachh2, 3) Muestra amplificada con los cebadores Orc1 y Orc2, 4) muestra amplificada con los cebadores clarkii.

Las reacciones de PCR para los productos obtenidos con los cebadores Orc 1 y Orc 2 se optimizaron del mismo modo que los productos para *P. clarkii*, y los productos se purificaron.

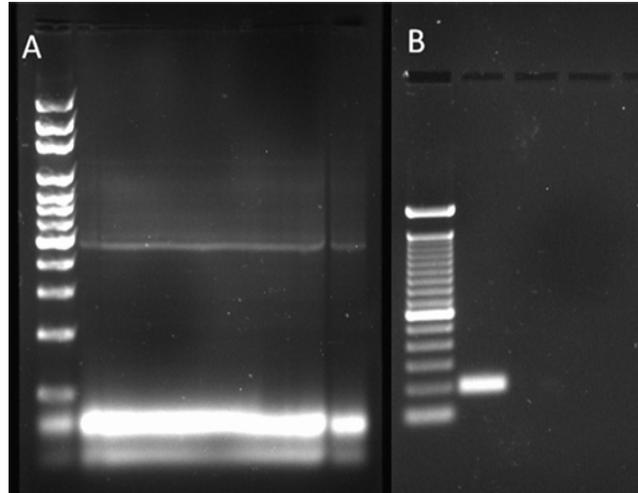


Fig. 4 A) gel preparativo al 2%, producto de 200pb amplificado con cebadores clarkii1-clarkii2. B) producto purificado a partir del gel de la figura A.

Se utilizó actina como un control positivo para las diferentes reacciones. Empleando para ello los siguientes cebadores upACpc (5' GCT GTG CTG TCC CTG TAC G 3') y lpACpc (5' GAT CTT CAT GAG GTA GTT GG 3'), publicados por Martínez-Pérez et al. (2005), el hepatopáncreas fue el tejido que se empleó para la optimización de las reacciones con este par de cebadores debido a que la extracción de cantidades grandes de mRNA es sencilla a partir de este tejido. La T_m teórica para estos cebadores es de 50 °C, sin embargo, para que funcionara como control positivo fue necesario amplificar los productos con la temperatura de alineación de la CHH 60° C, a esta temperatura en hepatopáncreas se obtiene una banda de 100 pb. En el tallo, que es el tejido de interés para este trabajo se probó la amplificación de actina una vez que se optimizaron las concentraciones de Mg^{++} y de cebadores, con una temperatura de alineación de 60° C se obtuvieron dos bandas una de 100 pb y otra de 250 pb.

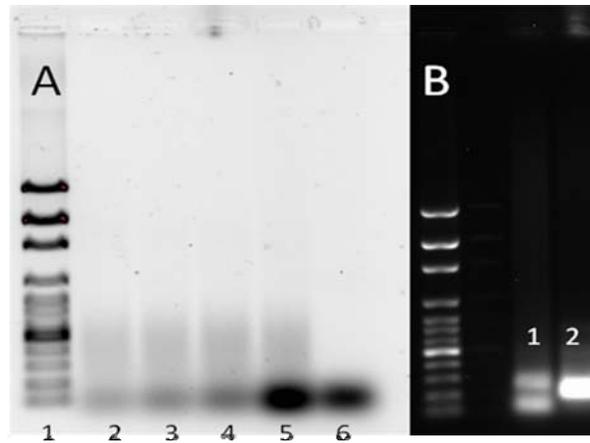


Fig.5 A) Curva de optimización Mg^{++} PCR, cebadores de actina (upACpc- lpACpc) 50 ° C. 1) Marcador de peso y masa molecular,; 2) 1 M, 3) 1.5 M, 4) 2 M, 5) 2.5 M, 6) 3 M. B) 1.producto de la amplificación de los cebadores de actina (upACpc- lpACpc) con 60° C, 2. PCR CHH en tallo 60°

Los geles preparativos para la purificación de los diferentes productos se hicieron con una concentración de agarosa del 2 %, esto me permitió distinguir mejor los productos cercanos a los 100 pb de los dímeros de cebadores, con un peso menor a este.

A pesar de que se lograron amplificar con éxito varias bandas no todas lograron ser secuenciadas con éxito, algunas de ellas generaron fragmentos muy cortos y con pares de bases indefinidos que dificultaron su alineación con las secuencias de CHH previamente publicadas. Sin embargo dos fragmentos fueron secuenciados con éxito aquel que provenía de los cebadores Orc1-Orc2, y el proveniente de los cebadores clarkii1 y clarkii2.

7.3 Análisis de los fragmentos obtenidos

Los cebadores Orc1-Orc2 permitieron secuenciar un producto de 130 pb, que no mostró identidad con la secuencia de *P. clarkii*, sin embargo el Blast mostró diversas coincidencias de la secuencia obtenida y la subunidad 28s de RNA ribosomal de diversos crustáceos decápodos, entre ellos *Panulirus argus* con 83 % de similitud y *Homarus americanus* 77%.

La secuencia obtenida fue la siguiente:

>rRNA 28s Clarkii 1-2

```
AAGAAAAAAA CAATCGCGA GTGCGAAAGC CCGGGACTTC GTCCCGGAAA ATAACCCTAG
CCAGAAGAAT GCCGATCACA AAACACCGGG TCTCCA ACTC TTTACGCTTG GCTTGACGCC
TGGCTTATAA ACTGGGCGCC CCGCTCGTCG CTCATCGCCC TTCCGCCGCT TAGGGCTCTC
CTAGGAGGTA CTCCCACGTG GGGAAACTCC GATTCAGCCT CTCCGAGTAC
ATTTCCGGCGA.
```

La secuencia obtenida se comparó con otros fragmentos de rRNA 28s de crustáceos disponibles en las diferentes bases de datos disponibles en los distintos bancos virtuales ,entre ellos *Procambarus clarkii.*, El análisis de alineación (Clustal W) del fragmento encontrado en el laboratorio con los reportados para *P. clarkii* indico un Score o puntuación entre 81% y 59% de identidad sin embargo al analizarlo con otro programa más minucioso EMBOSS (water) se obtuvieron índices de identidad menores entre 37.9 y 43. 7.

```
>[gb|AY210834.1] Panulirus argus 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1582

Score = 86.0 bits (94), Expect = 9e-14
Identities = 70/84 (83%), Gaps = 1/84 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 146   GTCGCTCATCGCCCTTCCGCCGCTTAGGGCT-CTCCTAGGAGGTACTCCACGTGGGGAA 204
          ||||| |
Sbjct 1501   GTCGGTTCATCGCCCTTCCGCCGCTTAGGGCTAGAAACAGGAGACACTCCCGCGTGGGGAA 1442

Query 205   ACTCCGATTGAGCCTCTCCGAGTA 228
          ||||| |
Sbjct 1441   GCTCCGATTCCGTCTCACCAGTA 1418
```

Fig. 6 Alineación del fragmento rRNA 28s obtenido, con un fragmento de rRNA 28 s de *Palinurus argus* .obtenido del BLAST realizado en la página de NCBI.

Tabla 2. Fragmentos amplificados y coincidencias encontradas en el BLAST

cebadores	Tamaño en pb	Tamaño de secuencia (pb)	BLAST		
			Similitud (Blast)	Máxima identidad	E value
Orc1- Orc2	150pb	130	AY210834.1 <i>Panulirus argus</i> 28S rRNA	83%	9e-14
clarkii1- clarkii 2	200pb	172	AB027291 <i>Procambarus clarkii</i> mRNA for hyperglycemic hormone precursor.	98%	3e-75

Los cebadores Clarkii1 y Clarkii 2 permitieron secuenciar un producto de 172 pares de bases:

CHH tallo clarkii

```
AAGAAGAGCC ATCTTCAGAG CTTGACCGAG TGTGTGAAGA TTGTTACAAC TTGTACCGTA
AACCTACGT CGCCACCACC TGCAGACAAA ACTGCTATGC CAATTCCGTC TTTCGTC AAT
GCCTTGACGA CTTTCTCTTG ATAGACGTTG TTGACGAGTA CATTTCGGC GA
```

Este producto de 172 pb, mostro una alta identidad con la secuencia de CHH reportada previamente para *P. clarkii*, el Blast mostro una coincidencias del 98% y un valor de E muy pequeño 3e-75,, el fragmento además de mostrar coincidencias para CHH de *P. clarkii*, mostro coincidencias para CHH de otros crustáceos decápodos del infraorden Astacidea, entre ellos: *O. limosus*, *Procambarus bouvieri*, *Homarus americanus*, *Homarus gammarus* y *Nephrops norvegicus*.

Al igual que con el fragmento de rRNA 28 s la secuencia obtenida fue comparada con otros fragmentos de CHH disponibles en la red, principalmente con aquella que había

sido previamente reportada para *P. clarkii*, el alineación en ClustalW, mostro una puntuación del 98 %; El alineación también se realizó con el programa EMBOSS (water), que mostró una identidad de 98.2% y una similitud de 98.2% a lo largo de 169pb de los 172pb de la secuencia obtenida.

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	AB027291	1399	2	CHH	172	98.0


```

AB027291      TCATCGTCGGAACCTCTCAGCTTCCTCTCCCAAGACCAGAGCGTCAACAAGCGACAGGTG 300
CHH           -----AAGA----- 4
                                     ****
                                     AB027291
TTCGACCCAGGCTTGTAAGGAATATACGACAGAGCCATCTTCAAGAAGCTTGACCGAGTG 360
CHH           -----AGAGCCATCTTCAG--AGCTTGACCGAGTG 32
                                     *****
AB027291      TGTGAAGATTGTTACAACCTTGTACCGTAAACCTACGTCGCCACCACCTGCAGACAAAAC 420
CHH           TGTGAAGATTGTTACAACCTTGTACCGTAAACCTACGTCGCCACCACCTGCAGACAAAAC 92
                                     *****
AB027291      TGCTATGCCAATTCCGTCTTTCGTCAATGCCTTGACGACCTTCTCTTGATAGACGTTGTT 480
CHH           TGCTATGCCAATTCCGTCTTTCGTCAATGCCTTGACGACCTTCTCTTGATAGACGTTGTT 152
                                     *****
AB027291      GACGAGTACATTTCCGGCGTCCAAACTGTCGGCAAGTAAGGTGACAGATCTGTCCACCTG 540
CHH           GACGAGTACATTTCCGGCGA----- 172
                                     *****

```

Fig.7 Alineación (Clustal W) entre la secuencia reportada en Genebank para la hormona hiperglucemnante de crustáceos de *P.clarkii* (no. Acceso. AB027291) y la secuencia obtenida en el laboratorio con los cebadores Clarkii 1 y clarkii 2. En color gris claro se marcan las regiones en que los cebadores fueron diseñados, los (*)resaltan los pares de bases idénticos.

7.4 Análisis de Ritmicidad

El proceso de amplificación de la PCR ha sido descrito mediante una ecuación $Y_n = (1 + R)^n$ donde Y_n es el factor de amplificación después de n ciclos y R es la eficiencia de la amplificación de cada ciclo (Ferre, 1992), como consecuencia la amplificación teórica con una eficiencia de 100%, debería duplicar la cantidad de amplicones en cada ciclo;

sin embargo en la mayoría de las PCR muestran una eficiencia entre 70% y 80% entre los 15 y 30 ciclos (Ferre, 1992).

El crecimiento de amplicones se mantiene exponencial solo durante un número determinado de ciclos, después de este punto se el crecimiento exponencial decrece y se forma una meseta. Se ha descrito que algunos factores como el agotamiento de los cebadores con respecto a su constante de afinidad por el cDNA, la saturación de la enzima y la separación incompleta de las cadenas de los productos influyen que este fenómeno de meseta se presente.

La fase de meseta también se caracteriza por que el crecimiento de los amplicones deja de ser proporcional con respecto a la cantidad inicial del transcrito de interés. Por esta razón para emplear a la PCR como una técnica cuantitativa es necesario encontrar el punto donde la amplificación deja de ser exponencial.

A la ventana de ensayos donde la cuantificación es significativa se le conoce como intervalo de amplificación lineal (Ferre; 1992), este intervalo se definió mediante la cuantificación de brillantez de las bandas de reacciones sometidas a distintos números de ciclos (20, 25, 30, 33, 35, 37, 40). La elección del número de ciclos para la PCR-semicuantitativa se hizo determinando el número de ciclos mínimo para que el brillo de la banda fuera visible (33), y el número de ciclos para llegar a la saturación (37), un número de intermedio, 35 ciclos fue elegido para la semi-cuantificación.

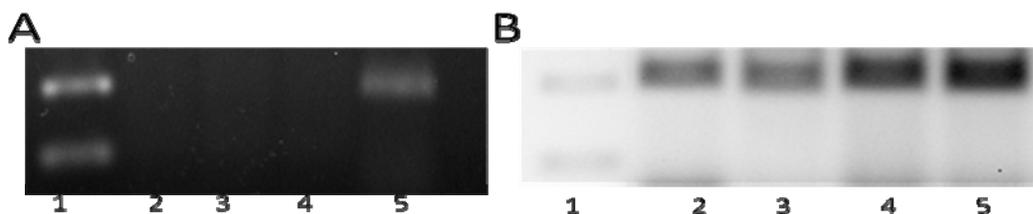


Fig. A) CHH curva de ciclos: 1) Marcador de masa y peso molecular, 2) PCR CHH 20 ciclos, 3) PCR CHH 25 ciclos, 4) PCR CHH 30 ciclos 5) PCR CHH 35 ciclos. B) CHH curva de ciclos: 1) Marcador de masa y peso molecular, 2) PCR CHH 33 ciclos, 3) PCR CHH 35 ciclos, 4) CHH PCR CHH 37 ciclos, 5) PCR CHH 40 ciclos.

La prueba de concentración mínima de cDNA para la amplificación visible del producto, mostró que a partir de la dilución 1:10 de cDNA era posible amplificar una banda

fácilmente observable. La dilución 1:10 era equivalente a poner 0.295 µg/µl de cDNA, esta fue la cantidad de cDNA que se incluyó en los mix de PCR de las diferentes horas.

Tabla 3. de ponderación de µg empleados para amplificar las PCR-semicuantitativas.

Hora	µg/µl de cDNA totales en la RT	µl de cDNA que se usaron para amplificar CHH (.295 µg)	µl de cDNA que se usaron para amplificar Actina (1.51 µg)
03:00	1.16	0.5	2.60
07:00	1.51	0.39	2.00
11:00	1.125	0.52	2.68
15:00	0.88	0.67	3.05
19:00	1.31	0.45	2.30
23:00	1.33	0.44	2.27

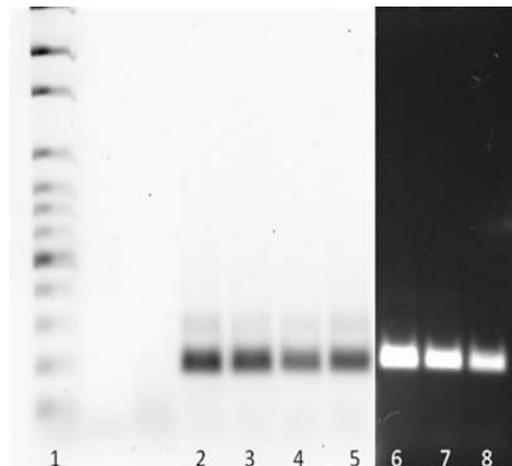
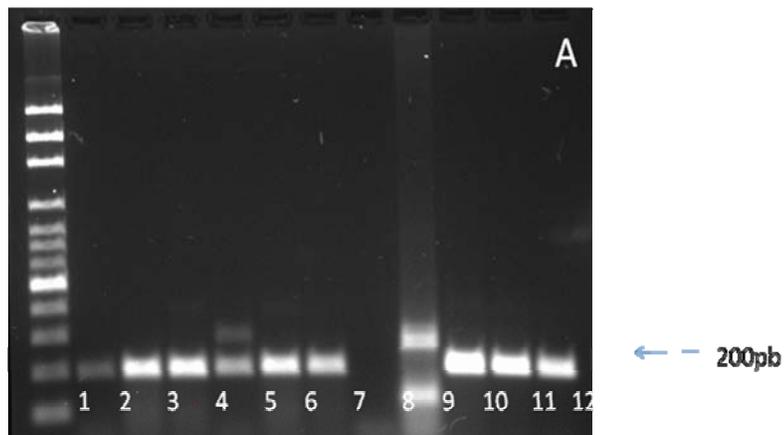


Fig.8 PCR de tallo, cebadores clarkii1-clarkii2; curva de concentración mínima de cDNA para la amplificación del producto. 1) marcador de masa y peso molecular, 2) stock (2.36 µg), 3) dilución 1:2 (1.18 µg), 4) dilución 1:4 (0.59 µg), 5) dilución 1:8 (0.295 µg), 6) dilución 1:8 (0.295 µg), 7) dilución 1:16 (0.147 µg), dilución 1:32 (0.073 µg)

Para la actina no se hizo la prueba de concentración de mínima cDNA, sin embargo a lo largo de las pruebas experimentales se observó que la concentración de 1.51 µg amplificaba de un producto fácilmente visible en el foto-documentador, por esta razón se utilizó esta concentración de cDNA para las reacciones de control de las diferentes

horas, estas reacciones de hicieron con cDNA proveniente de tallo pero con el programa de PCR diseñado para los cebadores de actina 50° C.

La PCR semi-cuantitativa revelo que la producción de mRNA de CHH presenta variaciones a lo largo del día, Se observó una oscilación bimodal. El pico máximo se encontró a las 7h (ZT0), la expresión del mensajero decae un poco para las 11h (ZT 4) del día, sin embargo los niveles de mRNA a esta hora continúan siendo elevados; el pico mínimo del mensajero es a las 15h (ZT 8), los niveles de mensajero vuelven a aumentar hacia el momento del apagado de la luz. A las 19 h (ZT 12) el mRNA muestra un segundo pico de expresión menor que el primero y al igual que 12 horas antes los niveles del mensajero descienden hacia las 23h (ZT 16), el mRNA muestra una tendencia a disminuir durante la fase oscura hasta las 3h (ZT 20) donde se encuentra el segundo pico mínimo, conforme se acerca el día los niveles de mensajero comienzan a elevarse y para las 7 de la mañana, que es el momento del encendido de las luces el nivel del mensajero se encuentra en su máxima concentración.



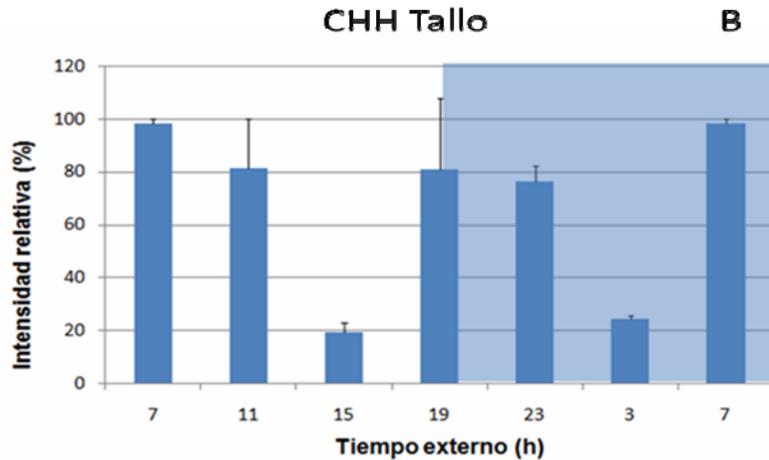


Fig. 9 A. PCR semicuantitativa para el amplicon de CHH, gel de agarosa al 2% 1) Marcador de masa y peso molecular. Del 2 al 7 PCR semicuantitativa del mRNA de CHH 35 ciclos. 2) 03:00 h, 3) 07:00h, 4) 11:00h, 5) 15:00h, 6) 19:00h, 7) 23:00h. 8) control negativo (sin cDNA), 9) control positivo PCR de actina de tallo de las 07:00, amplificado a 60 ° C. Del 10 al 12 curva de cDNA 10) dilución 1:10, 11) dilución 1:12, 12) dilución 1:14. B Cronograma de la expresión del mRNA de CHH en el tallo ocular, (LO 12:12). n= 2 PCR de distintos lotes.

La PCR de actina en tallo a las diferentes horas mostro también una oscilación diaria por lo que su uso como control para este experimento se descarto. El pico máximo de producción de la actina es a las 15h, y el mínimo a las 19h.

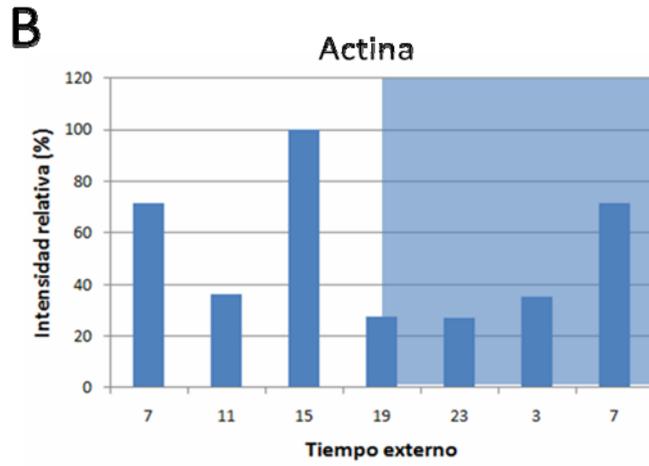
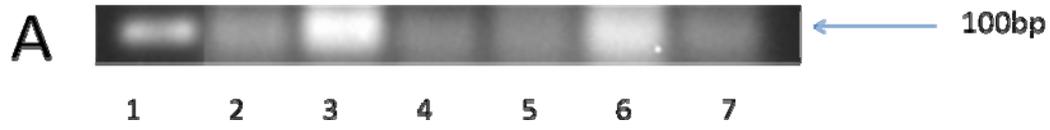


Fig.10 Gel de agarosa al 2% 1) Marcador de masa y peso molecular. Del 2 al 7 PCR semicuantitativa del mRNA de Actina 35 ciclos, amplificado con el programa de termociclador descrito por Martínez-Pérez, 2) 03:00 h, 3) 07:00h, 4) 11:00h, 5) 15:00h, 6) 19:00h, 7) 23:00h.

8.

Discusión y conclusiones

8.1 Análisis de secuencias

El fragmento de 200pb amplificado a partir de los cebadores clarkii1-clarkii2 que fue secuenciado y posteriormente analizado con el programa EMBOSS (water) tiene una identidad del 98.2% con la secuencia reportada en Genbank para el mRNA de la CHH. En el BLAST este fragmento mostró altos grados de identidad con mRNA de la CHH de otros crustáceos cercanos filogenéticamente a *P. clarkii*, como *P. bouvieri* con quien comparte genero; *O. limosus*, *Pontastacus leptodactylus* *Nephrops norvegicus* con quienes comparte infraorden; y *Homarus americanus*, *Cherax quadricarinatus* con quienes comparte genero.

El BLAST también mostró coincidencias con secuencias reportadas para la MIH que sabemos es una hormona altamente emparentada con la CHH, estas hormonas comparten familia y las secuencia en pares de bases también son similares. Debido a las coincidencias que mostró la secuencia obtenida con otros fragmentos publicados en red podemos asegurar que el fragmento amplificado con los cebadores clarkii1-clarkii2, es parte del RNA mensajero de esta proteína.

Se logro la secuenciación de un fragmento de rRNA 28S que no había sido previamente reportado en la red, aunque este fragmento no era el que deseábamos amplificar, considero que vivimos en un momento en el que la biología molecular cobra cada día mayor importancia y la posibilidad de generar una base datos del cDNA de *P. clarkii*, que es un organismo ampliamente estudiado, permite la posterior comparación, complementación y estudio de productos empleados en investigaciones por grupos de trabajo en diferentes lugares del mundo.

8.2 PCR semicuantitativa y análisis funcional

La oscilación del mRNA fue deducida a partir de dos lotes de mRNA obtenidos a diferentes horas del día, aunque la *N* pudiera parecer pequeña se debe tomar en cuenta que 15 animales fueron empleados para extraer el RNA de 1 hora. El que se haya mantenido una tendencia en el momento de producción máxima del mensajero muestra que la técnica es reproducible.

Como se mencionó en las secciones anteriores la oscilación circadiana y diaria de la proteína de la CHH ha sido descrita anteriormente por algunos autores (Kallen et al 1985, Kallen et al 1990, Escamilla-Chimal et al 2001) Pruebas de Westernblot en el 2010 revelaron que la proteína CHH en el tallo ocular de *P. clarkii*, presenta una oscilación diaria bimodal con picos a las 4h y a las 20h, los mínimos se encuentran a las 12h y 00h (Fanjul-Moles, 2010), Un ritmo bimodal de la secreción de CHH también había sido reportado en otros organismos como *Astacus leptodactylus* por Kallen 1985, este autora hizo la caracterización de las variaciones diarias en el empaquetamiento de gránulos de la CHH en el axón terminal y la variación en el número de células productoras de CHH, ambos estudios fueron hechos a partir de una muestra de 5 animales y con muestreos cada 2h, le permitieron los autores esbozar el ritmo diario de la proteína de la CHH. La formación de gránulos en XO asociados a la exportación de esta hormona se produce a las 18h, el transporte de estos gránulos hasta la glándula sinusal toma alrededor de 2h y la liberación de la CHH a la hemolinfa ocurre entre las 19 y 20h, un segundo pico menor en la exocitosis de gránulos fue encontrado a las 7h. Este segundo pico permite la hiperglicemia durante algunas horas más (Strauss 2010). El ciclo descrito para *Astacus leptodactylus* coincide con los datos encontrados por Fanjul-Moles et al. en 2010 para *P. clarkii*.

La oscilación encontrada en este trabajo presenta algunas similitudes con la oscilación de la CHH reportadas para *P. calrkii*, ambas oscilaciones son bimodales, además existe una relación de fase de 9h entre el pico de las 7:00 h de mRNA y el pico reportado a las 16:00 h de CHH en tallo por técnicas de Western-blot. La oscilación encontrada en este

trabajo muestra un segundo pico de expresión de mRNA 12h después del primero a las 19:00 h que también guarda una relación de fase de 9h con el segundo pico (04:00 h) reportado para la CHH por Western-blot. Lo anterior podría representar modificaciones post transcripcionales o traduccionales de la hormona. Es posible observar que hay una correspondencia en el periodo (de 12 h) de la oscilación bimodal de ambas variables. Hay que considerar que esta relación de fase no indica el tiempo entre el pico de síntesis de mRNA de la proteína y la exocitosis de el péptido maduro, ya que la técnica de Western-blot permite identificar la presencia de la proteína en la estructura, pero no es capaz de discriminar entre los gránulos presentes en el XO y los que están cercanos a ser exocitados en la SG. Sin embargo la correspondencia en los periodos de ambas oscilaciones podría indicar que la síntesis de CHH está regulada, por una ritmicidad en la expresión de su RNA mensajero.

Dado que el mRNA presenta una oscilación que puede ser relacionada con los cambios periódicos de producción del péptido maduro, es posible que la expresión del mRNA de CHH sea el componente que está siendo controlado por el reloj circadiano, serán necesarios estudios posteriores con diferentes protocolos luminosos para esclarecer si este ritmo es realmente circadiano y los mecanismos por los que el reloj circadiano ejerce su control sobre este sistema.

La oscilación encontrada sugiere la existencia de mecanismos de regulación transcripcional que generan la diferencia temporal entre el pico de producción del mensajero y el pico de producción de la proteína. El desfase de 9h entre las oscilaciones podría ser el resultado del tiempo de la traducción del mRNA, sin embargo es largo y no se puede descartar que el reloj este actuando sobre este punto regulando la traducción del mRNA a través por ejemplo de la transcripción de RNA antisentido, complementario a la secuencia de mRNA de la CHH. Existen casos tanto en eucariontes como en procariontes en los que se sintetiza un fragmento corto de RNA de una sola hebra, que es complementario a una región en un mRNA, y que al unirse a él previene la traducción del mensajero. Esta inhibición depende de la formación dímeros de RNA y puede ocurrir dentro del núcleo o en el citoplasma (Lewins, 2006).

Hasta ahora diversas pruebas inmunohistoquímicas, inmunológicas (ELISA) y algunos análisis morfométricos (tinciones y análisis con microscopía electrónica) habían permitido caracterizar la oscilación circadiana del péptido maduro de la CHH, el estudio realizado en este trabajo permitió observar el comportamiento de la CHH a un nivel distinto, la producción del mensajero de la hormona, que después cambios postraduccionales se convierte en una proteína con actividad hiperglucemiante. Antes de concluir creo que es necesario hacer algunas consideraciones sobre la técnica de cuantificación empleada. En este estudio se utilizó a la PCR-semicuantitativa para determinar la expresión del mRNA, la PCR ha mostrado tener un sólido poder cuantitativo (Ferre 1992), sin embargo a alta eficiencia del proceso puede generar que pequeñas variaciones en los componentes de la reacción resulten en grandes cambios en la amplificación de un producto, estas variaciones pueden ser controladas estandarizando al máximo los experimentos (Ferre, 1992; Dukas 1993), por esta razón gran parte del tiempo que se empleó para el desarrollo de este trabajo fue destinado a este propósito.

La expresión de RNA puede ser medida por otras técnicas como northern blots o análisis de protección de la RNasa, sin embargo una limitante para emplearlos en este estudio es que requieren de grandes cantidades de RNA (Haddad F; 2007), que es difícil de obtener a partir de estructuras pequeñas como el tallo ocular del acocil. La RT-PCR en cambio permite medir y detectar patrones de expresión de mRNA en pequeñas cantidades de tejido (Ferre, 1992).

Para estimar la cantidad de producto amplificado se empleó un marcador de peso molecular y masa (100 bp ladder, 100-3000 bp, 500 ng, Axygen). Con ayuda del programa Molecular Imaging (Kodak), se construyó una curva de más. E contra la intensidad neta, y se calculó la cantidad en ng de cada producto. Para la comparación entre diferentes geles, se usó la metodología propuesta por Dukas *et al.* 1993. Estos autores proponen el uso de una banda conocida y cercana en peso a la banda de interés, para comparar la intensidad neta o la cantidad en nanogramos de dicha banda, entre geles de diferentes muestras o lotes experimentales. Esta metodología facilita el

establecimiento de un control de carga cuando no se tiene un producto constitutivo que pueda correr en la misma reacción que el amplicón de interés.

Hasta ahora diversas pruebas inmunohistoquímicas, inmunológicas (ELISA) y algunos análisis morfométricos (tinciones y análisis con microscopía electrónica) habían permitido caracterizar la oscilación circadiana del péptido maduro de la CHH, el estudio realizado en este trabajo permitió observar el comportamiento de la CHH a un nivel distinto, la producción del mensajero de la hormona, que después cambios postraduccionales se convierte en una proteína con actividad hiperglucemiante.

La ritmicidad como una adaptación ecofisiológica involucra casi todas las facetas de la biología de crustáceos. La ritmicidad en las actividades puede ayudar a los individuos a ahorrar energía durante actividades locomotoras o reproductivas (Strauss 2010) La proteína de la CHH tiene un papel crucial en el control de los niveles de glucosa en la hemolinfa del animal, de hecho esta proteína en *P. clarkii* tiene un pico unas horas antes del anochecer, que coincide con los requerimientos de glucosa dados los hábitos nocturnos del animal, incluso se ha propuesto que la CHH juega un papel importante en las actividades migratorias estacionales, (Stephen et al. 2010) por esta razón el estudio de esta hormona podría ser importante para entender la ecología de este organismo.

8.3 Conclusiones:

.1.-Se amplificó un producto de 172 pb a partir de par cebadores diseñados sobre la secuencia reportada en Genbank para CHH en *P. clarkii*. La secuencia obtenida mostró una identidad del 98.2% con el fragmento publicado en Genbank para el mRNA de CHH.

2.- mediante a PCR semicuantitativa en condiciones LD se caracterizó una oscilación bimodal con un pico a las 7h que corresponden al ZT 0, que es el inicio del día subjetivo del acocil. A las 3h durante la noche subjetiva del acocil se encontró el mínimo de producción del mRNA de la CHH o.

3. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el mRNA de la actina oscila a lo largo del día.

8.4 Perspectivas

La PCR-semicuantitativa ha demostrado ser una herramienta eficiente para detectar variaciones en el nivel de producción de mRNA, sin embargo La alta eficiencia del proceso de la PCR pueden generar que pequeñas variaciones en la reacción generen grandes diferencias en la amplificación del producto, por esto es importante corroborar los datos obtenidos con alguna otra técnica menos sensible a pequeñas variaciones y más sensible a cambios pequeños en la concentración inicial del mensajero como la PCR-tiempo real.

A pesar de que se logro identificar un fragmento de 169pb que corresponde al RNA mensajero de la hormona hiperglucemiante de crustáceos, este fragmento no contiene los puentes disulfuro que son característicos de esta hormona, estos sitios son de vital importancia para posteriormente realizar estudios funcionales en esta hormona, ya que pequeñas mutaciones en estos sitios causan grandes efectos en la función glucemiante de la hormona, la mutación de estos podría ayudar a comprender mejor como interactúa este neurotransmisor con sus receptores en los diferentes órganos blanco. Es por esta razón que el amplificar un fragmento de mayor tamaño resulta importante para futuras investigaciones.

Como se menciona en la introducción existen varias Isoformas de la CHH, para algunas de ellas se ha logrado caracterizar el mRNA que indica la producción de esta hormona en tejidos diferentes al tallo ocular, este es el caso de la isoforma producidas en el órgano pericardico (PO) (Hsu 2006). Estudios inmunohistoquimicos han revelado la presencia de la proteína CHH en la retina del acocil *P. clarkii* (Escamilla 2002), sin embargo no se ha comprobado aun que esta hormona sea sintetizada en este órgano, durante la realización de este trabajo se lograron amplificar productos cercanos a los 200 pb a partir de RNA proveniente de la retina y del cerebro con los cebadores clarkii1-clarkii2, que probaron amplificar correctamente al mensajero de la CHH, los producto no

logro ser secuenciados, pero sin duda este trabajo abre el camino para explorar la producción de CHH en estos órganos; quizás en un futuro podamos conocer mejor el papel que juega la producción de esta hormona en órganos distintos al tallo ocular.

Bibliografía:

- Aréchiga H,F. Fernández-Quiroz, F. Fernández de Miguel y L. Rodríguez –Sosa (1993) The circadian system of crustaceans. *Crhonobiolo. Int* 10:1-19.
- Aréchiga (1996). Neuronal mechanisms of biological rhythms, en *Internal clocks and movemen.* Ed. Pastor MA. Artieda J; Elsevier Science.
- Aschoff J.(1981). A survey in biological rhythm. En: *Handbook of behaviorl neurobiology. Biological rhythms.* Plenum Press. New York 4:3-10.
- Bradley (1974). En *Handbook of behavioural neurobiology. Vol 4: Biological rhythms.* 1984, ed, J. Aschoff; Plenum Press: 2ed, pp: 125-140.
- Böcking D., Dircksen H. and Keller R.: The crustacean neuropeptides of the CHH/MIH/GIH family: Structures and biological activities. In: *The Crustacean Nervous System.* (Eds.): K. Wiese. *Springer*, Berlin, Heidelberg, 84-97 (2002)

- Chang ES, O'Connor JD. (1983). Metabolism and the transport of carbohydrates and lipids). In Bliss DE, Mantel LH (eds.). The biology of crustacea. New York: Academic Press, pp. 263–289.
- Chenna, Ramu, Sugawara, Hideaki, Koike, Tadashi, Lopez, Rodrigo, Gibson, Toby J, Higgins, Desmond G, Thompson, Julie D. Clustal W2 : Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. (2003). Nucleic Acids Res 31 (13):3497-500 PubMedID: 12824352.
- Chung J. S. and Zmora N. (2008) Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, *Callinectes sapidus* - the expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. *FEBS J* 275, 693-704
- De coursey P.J. (2004) The Behavioral Ecology and evolution of Biological Timing. En: Cronobiology. Biological Timekeeping. Dunlap J.C; J. Loros, P.J. Decoursey. Sinauer Associates, Inc. Publishers. USA. 51-53
- Dennis D. McCarthy, Christine Hackman, and Robert A. Nelson. (2008). THE PHYSICAL BASIS OF THE LEAP SECOND .The Astronomical Journal, 136:1906–1908.
- Dunlap J.C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. Sinauer Associates, Inc. Publishers. USA. 290.

- Dukas, K.P., et al., Quantitation of changes in the expression of multiple genes by simultaneous polymerase chain reaction, *Analyt. Biochem.* 215, 66-72 (1993).
- Enright (1981), *En Handbook of behavioural neurobiology*. Vol 4: Biological rhythms. 1984, ed, J. Aschoff; Plenum Press: 2ed, pp: 11-14.
- Escamilla-Chimal EG, Van Herp F, Fanjul-Moles ML. (2001). Daily variations in crustacean hyperglycaemic hormone and serotonin immunoreactivity during the development of crayfish. *J. Exp.Biol.* 204:1073–1081.
- Escamilla-Chimal EG, Hiriart M, Sánchez-Soto MC, Fanjul-Moles ML. (2002). Serotonin modulation of CHH secretion by isolated cells of the crayfish retina and optic lobe. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125:283–290.
- Fanjul-Moles ML, Escamilla-Chimal EG. (2005). The retina of crayfish shows crustacean hyperglycaemic hormone daily and circadian variations. Abstracts of the 37th Annual General Meeting of the European Brain and Behavior Society. *Acta Neurobiol. Exp.* 65 (Suppl.):45.
- Fanjul-Moles ML. (2006). Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycaemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. *Comp. Biochem. Physiol. — C Toxicol. Pharmacol.* 142:390–400.
- Fanjul-Moles M. L., Escamilla-Chimal E. G., Salceda R., Giulianini P. G. and Sanchez-Chavez G. (2010). Circadian modulation of crustacean hyperglycemic hormone in crayfish eyestalk and retina. *Chronobiol Int* 27,34-51.
- Ferre. (1992). Quantitative or Semi-Quantitative PCR: Reality Versus Myth. *Genome Res.* No 2;pp; 1-9.

- Haddad, Quin, Giger, Guo y Baldwin. (2007) Potential pitfalls in accuracy of analysis of natural sense-antisense RNA pairs by reverse transcription-PCR. BMC Biotechnology. 1472-6750; pp:7:21.
- Hardin, Hall y Rosbash.(1990)Feedback of Drosophila period gene on circadian cycling of its messenger RNA levels. Nature 345, pp: 536-540.
- Hardin. (2000) From biological clock to biological rhythms. Genome Biology, Vol. 4; No. 1.
- Herzog. (2007). Neurons and networks in daily rhythms. Nature Review; vol. 8. pp 790-802.
- Huner JV. Procambarus in North America and elsewhere. In: *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*. Edited by Holdich DM, Lowery RS. Portland: Timber Press; 1988:239-261.
- Kallen JL, Rigiani N, Trompenaars HJAJ. (1985). Aspects of entrainment of CHH cell activity and hemolymph glucose levels in crayfish. Biol. Bull. 175:137–143.
- Kallen JL, Abrahamse SL, Van Herp F. (1990). Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the hemolymph of the crayfish. Biol. Bull. 179:351–357.
- Kallen J. and Meusy J. J. (1989): Do the neurohormones VIH (vitellogenesis inhibiting hormone and CHH (crustacean hyperglycemic hormone) of crustaceans have a common precursor? Immunolocalization of VIH and CHH in the Xorgan sinus gland complex of lobster *Homarus americanus*. *Invert Reprod Dev* 16, 43-52

- Koukkari y Southern. (2006). Introducing biological rhythms. Springer ed; E.U.; 650p.
- Lewin, B. (2008). Genes IX. Jones and Bartlett publishers. U.S.A.. 910 P.
- Li SC, Xu YX, Du LQ, Yi XL, Men XD, Xie JY. Investigation on and analysis of alien invasions in Chinese farming industry. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 2005, 21(6):156-159.
- Martinez-Perez, S.Zinker, Aguilar, Valdes y Arechiga. (2005) Circadian oscillations of RPCH gene expression in the eyestalk of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Peptides*; 26;pp : 2434-2444.
- Moore-Ede M.C; F.M. Sulzman y C.A. Fuller (1982) The clocks that time us. Physiology of the circadian timing system. Harvard University Press. England 1-151.
- Ollivaux C., Vinh J., Soyez D. and Toullec J. Y. (2006) Crustacean hyperglycemic and vitellogenesis-inhibiting hormones in the lobster *Homarus gammarus* – Implications for structural and functional evolution of a neuropeptide family. *FEBS J* 273, 2151-2160
- Pittendrigh C.L. (1981) General perspective. En: Biological clock. Handbook of behavioral neurobiology. Aschoff J. (1984) Plenum Press. New York 4:56-79.

- Refinetti R. (2006) Circadian physiology. 2a ed. CRC Press. Boca raton, EUA. 689 pp.
- Roenneberg y Merrow (2003) The network of time: understanding the molecular circadian system; Currente Biology; Vol. 13 pp: 198-207.
- Santos EA, Keller R. (1993a). Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycaemic hormone: Evidence for a dual feedback control system. J. Comp. Physiol. B. 163:374–379.
- Saunders. (2002) Insect cloks. 3rd ed.; El Sevier; Amsterdam; pp: 551.
- Sehgal A., A. Rothernfluh- Hilfiker, M. Hunter-Ensor, Y. Chen, M. Myers y M.W. Young (1995) Circadian oscillations and Aautoregulation of *timless* RNA. Science. 270:808-810.
- Seghal (2004) en molecular Biology of Circadian Rhytms. Ed. Amita Sehgal; John Wiley & Sons, Inc; pp: 3-16.
- Strauss J, Dircksen H. (2010) Circadian clocks in crustaceans: identified neuronal and cellular systems. Frontiers in Bioscience 15, 1040-1074.
- Towns-Alonso VS, 2010. Identificación del RNA mensajero de dos genes del reloj circadiano en el acocil *Procambarus clarkii*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

- Velázquez Amado RM, 2009. Variaciones diarias de las proteínas PER y TIM en el sistema nervioso del acocil *Procambarus clarkii*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Yasuda, Yasuda Y., Fujita T. and Naya Y. (1994) Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions. *Gen Comp Endocrinol* 95, 387-398