



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN CREB-CRE EN LA SINCRONIZACIÓN
DEL RITMO CIRCADIANO DE LOCOMOCIÓN DEL ACOCIL *PROCAMBARUS*
*CLARKII***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. CARINA MICHELLE MARTÍNEZ AMBRÍZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO. AGOSTO, 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN CREB-CRE EN LA SINCRONIZACIÓN
DEL RITMO CIRCADIANO DE LOCOMOCIÓN DEL ACOCIL *PROCAMBARUS*
*CLARKII***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. CARINA MICHELLE MARTÍNEZ AMBRÍZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO. AGOSTO, 2016



OFICIO FCIE/DEP/432/2016

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **23 de mayo de 2016** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **MARTÍNEZ AMBRÍZ CARINA MICHELLE** con número de cuenta **305193092** con la tesis titulada "**Papel de la vía de señalización CREB-CRE en la sincronización del ritmo circadiano de locomoción del acocil *Procambarus clarkii***", realizada bajo la dirección del (la) **M. EN C. JULIO ALEJANDRO PRIETO SAGREDO**:

Presidente: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
Vocal: DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ
Secretario: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Suplente: DRA. TATIANA FIORELISIO COLL
Suplente: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 4 de agosto de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo No: 178526.

Al comité tutorial por sus comentarios y observaciones del presente trabajo de tesis.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Ciencias.

Al laboratorio de Neurofisiología Comparada.

A los miembros del jurado por la revisión del trabajo.

A la administración del Posgrado en Ciencias Biológicas.

A los acociles que hicieron posible el trabajo experimental.

DEDICATORIAS:

Gracias al universo por los elementos adecuados para obtener una consciencia más amplia y aspirar a integrar o fortalecer valores básicos para el crecimiento de la parte más trascendente del humano, entre tales valores se encuentra la compasión, perdón y tolerancia.

Por otra parte, se agradece infinitamente a personas que me han apoyado anímica y profesionalmente: Mis papás (Javier y Carina), a mis amigos y contactos.

A la Dra. Gonsebatt, Dra. Roció Salceda, Dra. Tatiana Fiordelisio, Dr. Manuel Miranda, y Dra. Leticia Verdugo por el interés y correcciones del trabajo.

Al Dr. Raúl Aguilar por su interés y observaciones puntuales en los tutorales.

A la Dra. Ma. Luisa Fanjul por ser un ejemplo de luz y profesionalismo.

A la coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas.

A los pequeños (Cocodrila, Pedrito Guzmán, Trufa, Vaka, Patricia y Joaquín), por su compañía

Con aprecio.

Carina Michelle Mtz. Ambríz.

Abreviaciones.

AMPc	Monofosfato de adenosin cíclico
CBP	Proteína de unión a CREB
CREB	Proteína de unión a CRE
CRE	Elemento de respuesta al AMPc
CRF	Curva de Respuesta de Fase
CT	Tiempo circadiano
db-AMPc	Dibutiril AMPc
DD	Oscuridad constante
ERG	Registro electrorretinográfico
LD	Fotoperiodo de Luz/Oscuridad
PKA	Proteína cinasa A
SG-OX	Sistema de la glándula sinusal y órgano X

Índice

1. Resumen.....	14
2. Introducción.....	16
2.1-Ritmos biológicos.....	16
2.2-Sincronización del reloj a señales externas.....	19
2.3-Curva de Respuesta de fase (CRF).	21
2.3.1-Construcción de una CRF.....	22
2.4.-Acocil <i>Procambarus clarkii</i>	25
2.5.- Sistema circadiano del acocil <i>Procambarus clarkii</i>	26
2.5.1. Retina del ojo de <i>P. clarkii</i>	26
2.5.2. Sistema del tallo ocular y mediadores de la ritmicidad circadiana del acocil.....	26
2.5.3. Fotorreceptores caudales del ganglio abdominal terminal del acocil.....	28
2.5.4. Fotorreceptores cerebrales extrarretinianos del acocil.....	28
2.6.-Actividad locomotora del acocil <i>Procambarus clarkii</i>	28
2.7.-Modelo circadiano del reloj molecular de <i>Drosophila melanogaster</i>	29
2.8.-Modelo circadiano del reloj molecular del acocil <i>Procambarus clarkii</i>	31
2.9-Vía de señalización CREB-CRE.	31
2.9.1- Adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPC).....	31
2.9.2- Proteína de unión en respuesta a CRE (CREB).....	32
3. Objetivos.	34
3.1 Objetivos particulares.	34
4. Antecedentes.	34
5. Hipótesis.....	35

6. Metodología.....	35
6.1- Registro de la Actividad locomotora.....	35
6.2-Preparación de los fármacos.....	35
6.3- Construcción de la CRF en actividad locomotora.	36
6.4-Tratamiento con luz en los registros de actividad locomotora.	36
6.5-Tratamiento de db-AMPC en los registros de actividad locomotora.	36
6.6-Tratamiento de H89 + Luz en los registros de actividad locomotora.	37
6.7-Análisis de los datos.	37
6.7.1- Actividad locomotora.	37
6.7.2- Análisis estadístico de los periodos de actividad locomotora.	37
7. Resultados.	38
7.1. Experimentos con luz.	39
7.1.1. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con el tratamiento de luz en el CT 13.	40
7.1.2. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con el tratamiento de luz en el CT 10.	42
7.1.3 Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con el tratamiento de luz en el CT 23.	44
7.2. Experimentos con db-AMPC.....	46
7.2.1. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con el tratamiento de db-AMPC en el CT 13.	47
7.2.2 Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con el tratamiento de db-AMPC en el CT 10.....	49
7.2.3 Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con el tratamiento de db-AMPC en el CT 23.....	51
7.3. Experimentos con H89+luz.	53
7.3.1. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con el tratamiento de H89 + Luz en el CT 13.	54

7.3.2. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con el tratamiento de H89 + Luz en el CT 10.	56
7.3.3. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con el tratamiento de H89 + Luz en el CT 23.	58
7.4. Curvas de respuesta de fase por cada tratamiento experimental. ..	59
7.5. Análisis estadístico con prueba de t de Student entre las medias de los periodos por cada tratamiento experimental.	62
8. Discusión.....	65
8.1.- Efecto de los pulsos de luz y la aplicación de db-AMPC sobre las fases de los ritmos de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i>	65
8.2.-Efectos del H89+ luz sobre las fases del ritmo de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i>	66
8.3.- Efecto del AMPc y H89 en otro ritmo de salida (ERG).....	68
8.4.-Genes reloj y vía de señalización CREB-CRE.	75
9. Conclusiones.	77
10. Anexo.	78
10.1- Detalles de los fármacos utilizados	78
10.2.- Periodograma de χ^2	79
11. Literatura citada.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que muestra los parámetros representativos de los ritmos biológicos	17
Figura 2.. Esquema que representa los componentes de un sistema circadiano.	19
Figura 3. Ejemplo esquemático de una CRF con pulsos de luz.....	23
Figura 4. CRF de actividad locomotora con estimulación fótica y no fótica.	24
Figura 5. Acocil <i>Procambarus clarkii</i>	25
Figura 6. Esquema del sistema nervioso circadiano del acocil <i>Procambarus clarkii</i>	27
Figura 7. Modelo canónico molecular del asa de retroalimentación negativa de <i>Drosophila melanogaster</i>	30
Figura 8. Esquema que explica la acción de los aumentos de AMPc a nivel intracelular en la vía de señalización CREB-CRE.....	33
Figura 9. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con un pulso de luz en el CT 13	40
Figura 10. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con un pulso de luz en el CT 10	42
Figura 11. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con un pulso de luz en el CT 23	44
Figura 12. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con un pulso de db-AMPc en el CT 13.....	47
Figura 13. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con un pulso de db-AMPc en el CT 10	49
Figura 14. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con un pulso de db-AMPc en el CT 23.....	51
Figura 15. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con un pulso de H89 + luz en el CT 13.....	54

Figura 16. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con un pulso de H89 + luz en el CT 10.....	56
Figura 17. Registro de actividad locomotora de <i>P. clarkii</i> con un pulso de H89 + luz en el CT 23.....	58
Figura 18. CRF's por cada tratamiento experimental.....	60
Figura 19. Prueba de t de Student entre las medias de los periodos por cada tratamiento experimental.....	63
Figura 20. Registro ERG de un acocil <i>P. clarkii</i> con aplicación de db-AMPc.....	70
Figura 21. Registro ERG de un acocil <i>P. clarkii</i> con aplicación de db-AMPc.....	71
Figura 22. Registro ERG de un acocil <i>P. clarkii</i> con aplicación de db-AMPc y H89.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Medias de los cambios de fase provocados por la aplicación de cada tratamiento experimental en los diferentes CT.....	61
Tabla 2. Medias de los periodos de las partes controles y experimentales de los registros de actividad locomotora por cada tratamiento experimental.....	64

1. Resumen

Estudios recientes en diversos vertebrados muestran que la activación de la vía CREB-CRE (Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc/ elemento de respuesta al AMPc) induce cambios en la sincronización del ritmo de actividad locomotora a través de aumentos intracelulares del nucleótido cíclico AMPc (monofosfato de adenosin cíclico), provocando cambios en la expresión circadiana de genes reloj (*per1* y *tim*) dentro del oscilador principal (núcleo supraquiasmático) ubicado en el cerebro de mamíferos. En invertebrados, se desconoce la acción de tal vía sobre los ritmos circadianos de locomoción. En el presente trabajo, se utilizó una especie de crustáceo (acocil *Procambarus clarkii*), teniendo como hipótesis que la vía de señalización CREB-CRE participa en la sincronización del ritmo de actividad locomotora de *P. clarkii*. El objetivo principal es observar cambios de fase provocados por tres diferentes tratamientos experimentales. Se registró la actividad locomotora de los acociles, para aplicar, ya sea: un tratamiento de luz (300 Lux) por 1 hora, 10 μ M de db-AMPc, o 9 μ M de un inhibidor de la PKA (H89) más un pulso de luz por una hora. Cada tratamiento experimental se aplicó a grupos de acociles en diferentes tiempos circadianos (CT 13, CT 10 y CT 23). Se estimó el desfase producido en el ritmo de actividad locomotora y se construyeron curvas de respuesta de fase (CRF) por cada tratamiento experimental. La aplicación de luz en el CT 13 provocó atrasos de fase promedio de 2.2 horas, mientras que en el CT 23 se presentaron adelantos de fase promedio de 3.2 horas. El tratamiento de db-AMPc causó cambios de fase similares a los provocados por el tratamiento de luz, mientras que la aplicación de H89+luz provocó arritmias en la mayoría de los registros. Los resultados llevan a concluir que la vía de señalización CREB- CRE, activada a través de aumentos intracelulares de AMPc o bien, bloqueada a través del fármaco H89, produce cambios en la transcripción de los genes reloj involucrados en la sincronización del ritmo de actividad locomotora de *P. clarkii*, en donde la PKA es un elemento crucial en la activación de tal vía de señalización. Por otro lado, se concluyó que el AMPc actúa como un mimetizador lumínico, ya que la luz y el AMPc provocan cambios de fase y cambios en los periodos de los ritmos similares (dependiendo de la hora circadiana en que se aplicaron tales tratamientos).

1.-Abstract.

Recent studies in vertebrates show the CREB-CRE (CRE response element binding protein -- cAMP response element) signaling pathway as an important activator by intracellular increases of the cyclic nucleotide, adenosine monophosphate (cAMP), yielding changes in the circadian clock gene expression (*per1* and *tim*) within the main oscillator (suprachiasmatic nucleus, located in the mammalian brain), inducing changes in the locomotor activity rhythm entrainment. The role of the CREB-CRE signaling pathway on the circadian locomotor activity rhythms is unknown in invertebrates. In this work, I used a crustacean specie (crayfish *Procambarus clarkii*). The hypothesis of this work is: The CREB-CRE signaling pathway plays a major role in the locomotor activity rhythm entrainment. The main objective was observing induced phase shifts, either by a light pulse, an application of a cAMP analogue (db-cAMP) or an inhibitor of protein kinase A (PKA). Locomotor activity was measured for the subsequent application of the three treatments (10 μ M db-cAMP, 9 μ M of an inhibitor of the PKA (H89) + light and a light exposure treatment (300 Lux) for 1 hour. The above treatments were applied at three different circadian times (CT 13, CT 10, CT 23). The phases shifts were estimated then, the phase response curves (PRC) were constructed for each experimental treatment. The light treatment applied at the CT 13 caused phase delays about 2.2 h, instead the light pulse at CT 23, where we obtained phase advances about 3.2 h. The db-cAMP and the light treatment caused similar PRC at the different circadian times. The H89+light treatments caused arrhythmias in most locomotor activity recordings. These results lead to the conclusion that the CREB-CRE signaling pathway (activated by intracellular cAMP increases or blocked by the PKA inhibitor) probably yields changes in the clock genes transcription involved in the *P. clarkii* locomotor activity rhythm entrainment, where the PKA is a crucial element in the activation of this signaling pathway. cAMP acts as a light mimetic element, since light and cAMP caused similar phase shifts and periods changes after the application of the treatments at the three circadian times.

2. Introducción.

2.1-Ritmos biológicos.

Desde sus inicios, la vida ha estado sujeta a cambios ambientales cíclicos, resultado de los movimientos de rotación y translación del planeta, por lo que prácticamente todos los hábitats muestran fluctuaciones periódicas predecibles y recurrentes en las que se alternan la luz y oscuridad, el frío y el calor, la sequía y humedad, la presión atmosférica, la disponibilidad de alimento, así como las interacciones sociales (Fanjul e Hiriart, 2010). Pittendrigh (1993) propuso a los cambios ambientales cíclicos como una presión adaptativa, siendo factores importantes en la evolución. Así, mediante la selección natural, el carácter predecible de los ciclos ambientales indujo en los organismos primitivos un “programa temporal” que, al integrarse al genoma, dio lugar a una organización temporal endógena capaz de anticipar los cambios cíclicos externos (Fanjul e Hiriart, 2010).

En general, un ritmo biológico se define como la ocurrencia de cualquier evento dentro de un sistema biológico en intervalos de tiempo más o menos regulares (Kalmus, 1935). Entre los criterios para identificar un ritmo biológico se consideran:

- 1) La frecuencia.
- 2) El sistema biológico donde se expresen tales ritmos.
- 3) El tipo de proceso que genera a los ritmos.
- 4) La función que el ritmo desempeña (Aschoff, 1984).

Los parámetros básicos que definen a un ritmo biológico son:

- 1) Periodo (τ): Representa el tiempo requerido para completar un determinado ciclo. Este puede presentar una duración de milisegundos hasta años.
- 2) Frecuencia (f): Se define como el número de ciclos en una unidad de tiempo, y es el recíproco del periodo ($f = 1/\tau$). (Koukkari y Sothorn, 2006), por lo que, si el periodo se alarga, la frecuencia del ritmo disminuye y viceversa (Fanjul e Hiriart, 2010).
- 3) Fase (φ): Se define como el estado espontáneo de la oscilación representando cada punto que constituye al ciclo. Para caracterizar la fase, lo más usual es determinar el momento (hora del día) en el que la

variable estudiada alcanza su valor máximo o mínimo a lo largo del ciclo periódico. Al punto máximo de una oscilación se le denomina acrofase, mientras que al punto mínimo en que la variable muestra su menor amplitud se le denomina batifase, (Cardinali et al., 1994). (Ver figura 1). Para comparar entre organismos diurnos y nocturnos, se ha definido que el CT 12 corresponde al inicio de actividad locomotora (o su marcador de fase equivalente) para cada especie, donde la actividad del ritmo rebasa la media de la oscilación. También se puede considerar al Mesor como un parámetro importante, ya que se define como el nivel medio de la oscilación de un ritmo (Fanjul e Hiriart, 2010).

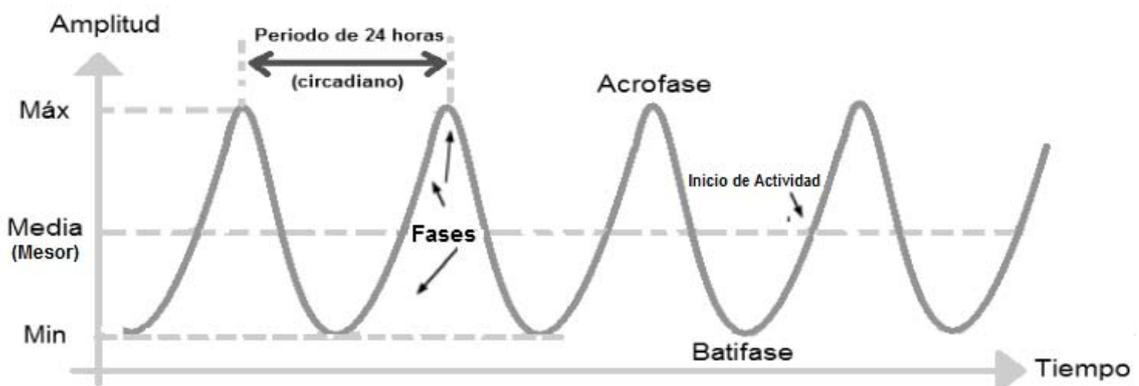


Figura 1. Esquema que muestra los parámetros representativos de los ritmos biológicos. En el eje de las ordenadas se muestran los valores máximos, medios (mesor) y mínimos de la amplitud de la oscilación de la variable estudiada, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestra el tiempo en el que transcurre la oscilación de la variable estudiada. (Modificado de Cardinali, et, al, 1994).

Los ritmos biológicos se clasifican usualmente a través de la duración del periodo que presentan. Se encuentran por ejemplo los ritmos ultradianos, los cuales tienen una frecuencia inferior a 20 horas, los ritmos circadianos, con una duración aproximada a 24 horas, los ritmos infradianos, con periodos mayores a 28 horas, los ritmos circanuales que presentan periodos de un año, los ritmos infranuales, con periodos mayores a un año (Koukkari y Sothern, 2006).

2.1.1-Ritmos circadianos.

Una de las modalidades más estudiadas de los ritmos biológicos son los ritmos circadianos. Como se mencionó anteriormente, estos presentan periodos cercanos a 24 horas ("circa", cercano, "diem", día). Una característica importante de los ritmos circadianos observados en organismos tan diversos como las algas, moscas de fruta y humanos es que estos, más allá de tener

una respuesta a los cambios de 24 horas en el ambiente físico provocados por los mecanismos celestiales, también poseen un reloj interno o reloj biológico que permite al organismo predecir y prepararse ante los cambios del medio ambiente (noche y el día). De ese modo, se adaptan los organismos tanto conductual como fisiológicamente ante los retos asociados con los cambios diarios en el ambiente externo. A sí mismo, el reloj biológico provee una organización interna temporal para asegurar una sincronización interna entre la gran variedad de sistemas fisiológicos y bioquímicos de los organismos. (Pittendrigh, 1993).

Las siguientes propiedades definen a los ritmos circadianos:

- 1) Son ubicuos en toda la escala filogenética
- 2) Poseen una naturaleza endógena, es decir, que dependen de la existencia de osciladores o marcapasos internos capaces de generar una actividad rítmica autónoma genéticamente determinada. Esto se prueba al colocar al organismo en condiciones constantes.
- 3) Se sincronizan a cambios periódicos ambientales a través de señales externas.
- 4) El periodo en condiciones constantes es diferente y cercano a 24 horas. El valor del periodo compensa cambios de temperatura. (Fanjul e Hiriart, 2010).

Todos los ritmos diurnos que se manifiestan bajo condiciones naturales, mantienen su expresión en condiciones de laboratorio a través de señales de tiempo externas impuestas en el ambiente, sin embargo, en un ambiente bajo condiciones constantes, el periodo del ritmo raramente es exactamente igual a 24 horas, ya que suele cambiar a un periodo cercano a 24 horas. Tal diferencia del periodo externo con el interno se debe a un proceso fisiológico que permite a los organismos sentir y anticiparse a las variaciones estacionales, dándole un carácter adaptativo a este proceso (Strauss y Dirksen, 2010).

Los osciladores son grupos de neuronas centrales que oscilan autónomamente midiendo el tiempo formando en conjunto al marcapasos. Los osciladores se especializan en conferir la ritmicidad y modular (si es que es el caso) osciladores periféricos secundarios que intervienen en funciones circadianas, como la ingesta de alimento. Los marcapasos se han identificado tanto en vertebrados como en invertebrados haciendo posible una actividad oscilatoria endógena, poniendo a tiempo diversas funciones del organismo. El reloj se

conforma por el oscilador, marcapasos, junto con las vías de entrada (órganos sensoriales) y vías de salida (Fanjul e Hiriart, 2010). Ver figura 2.

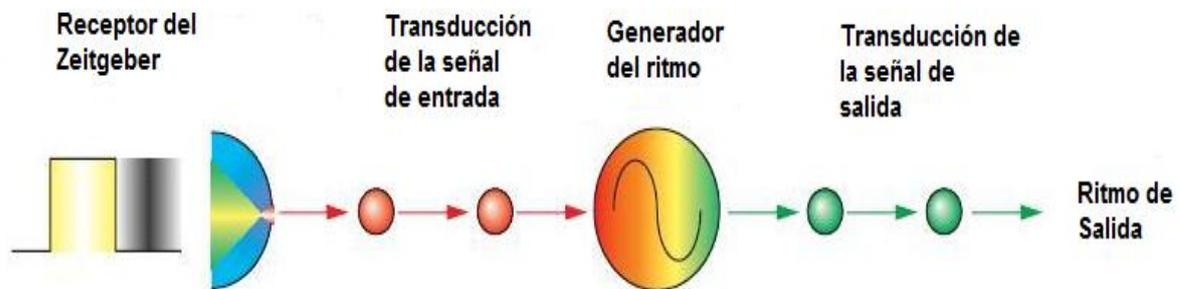


Figura 2. Esquema que representa los componentes de un sistema circadiano. Todo sistema circadiano contiene al menos tres elementos: Una o varias estructuras anatómicas que capten la señal ambiental externa (zeitgeber) para ser captado por el marcapasos circadiano para su sincronización, un marcapasos circadiano que genera la oscilación, y una o varias vías de salida del marcapasos a través de la cual éste dirige la expresión de varios ritmos. (Segarra, 2006).

Los criterios que definen la función de un oscilador principal son:

- 1) Actividad oscilatoria autónoma en condiciones de oscuridad o luz constante.
- 2) Sincroniza a través de señales ambientales externas para ajustar la fase a los cambios ambientales periódicos, (por ejemplo, ciclos de luz y oscuridad).
- 3) Al momento de realizar una lesión o ablación en el oscilador principal, se pierde la ritmicidad circadiana total.
- 4) Al trasplantar el conjunto de células de un oscilador principal, se recupera la ritmicidad.
- 5) Al aislar al oscilador principal en condiciones *in vitro*, se mantiene la ritmicidad del conjunto de células que lo componen, por un lapso de tiempo considerable.

(Strauss y Dirksen, 2010).

2.2-Sincronización del reloj a señales externas.

Una oscilación circadiana puede sincronizarse a una señal externa periódica (zeitgeber). La sincronización se puede definir como el ajuste del periodo (τ) del sistema circadiano al periodo T del zeitgeber. Cuando ocurre un fenómeno de

sincronización, el sistema adopta una relación de fase específica con el zeitgeber donde el periodo del zeitgeber (T) se ajusta a un determinado ritmo circadiano, siendo equivalente el periodo de este ritmo en condiciones estables a τ ($T = \tau$). Se puede comprobar una sincronización verdadera a través de la posición de la fase del ritmo endógeno sincronizado, la cual es (aunque no necesariamente), caracterizada por la anticipación del zeitgeber. Si existe una re-sincronización luego de un episodio de oscilación libre, o luego de un cambio de fase del zeitgeber, la fase se caracteriza por algunos ciclos transitorios antes de que se alcance una sincronización estable. Otro criterio para verificar si existe un fenómeno de sincronización es que, en libre corrimiento en condiciones constantes, luego de la sincronización, el ritmo comienza desde el tiempo impuesto por el zeitgeber dado anteriormente. Este último criterio es la evidencia más importante de la existencia de una sincronización de un ritmo. La demostración experimental de una sincronización requiere, primeramente, que el ritmo biológico se registre tanto en presencia como en ausencia del zeitgeber. En la presencia del zeitgeber, el periodo podría ser idéntico al periodo de éste, mientras que en ausencia del zeitgeber, debe observarse un ritmo en oscilación libre. Cuando el periodo del zeitgeber se cambia, el ritmo biológico podría cambiar su periodo para que coincida con el periodo del nuevo zeitgeber, al menos en estado estacionario de sincronización. El segundo criterio para determinar si existe una sincronización es, que la oscilación circadiana, en la presencia del zeitgeber, se mantenga con una relación de fase única con tal zeitgeber. Esta fase se alcanza independientemente de la fase del sistema en donde se dio la primera señal. Un tercer criterio para comprobar si existe una sincronización es teniendo en cuenta al fenómeno del enmascaramiento que pudiera presentar un sistema circadiano en relación a lo que provocarían diversas variables ambientales, las cuales podrían enmascarar un proceso de sincronización (Takahashi, et. al, 2001).

2.3-Curva de Respuesta de fase (CRF).

A través de los experimentos de Pittendrigh (1958), se buscó tener un mayor entendimiento (cuantitativo) del proceso de sincronización. Tales experimentos tuvieron la finalidad de analizar la sensibilidad del sistema circadiano administrando al modelo de estudio, pulsos breves de luz en oscuridad constante en diferentes puntos de la oscilación para medir los cambios de fase provocados por tales pulsos. Con los anterior, se analizó la hipótesis de que cada zeitgeber provoca un cambio de fase instantáneo. Así, fue posible reducir el tiempo del marcapasos en diseños experimentales complejos. Cuando la fase cambia en respuesta a pulsos simples, los cambios se grafican en función de la fase del sistema circadiano en el tiempo en que se da el pulso. Así se obtiene una curva de respuesta de fase (Takahashi, et. al, 2001).

En general, una curva de respuesta de fase es una construcción gráfica que muestra la relación de los cambios de fase de un ritmo circadiano en función de la hora circadiana en la que se administra un estímulo (pulsos de luz, pulsos de temperatura o pulsos de fármacos o químicos). Existen dos tipos de curvas de respuesta de fase: Tipo 1 y Tipo 0. El tipo 1 muestra cambios de fase relativamente pequeños (usualmente menores a 6 horas), presentando una transición continua entre atrasos y adelantos, mientras que en el Tipo 0, se grafican como adelantos y atrasos, apareciendo usualmente una discontinuidad (punto de quiebre) en la transición entre los cambios de fase que presentan adelantos y atrasos. El término "Tipo 1 y Tipo 0" se refiere al promedio de la pendiente de la curva cuando se grafica la nueva fase obtenida respecto a la fase que se tenía anteriormente- (también llamada curva de transición de fase), mientras que la curva de respuesta de fase grafica el cambio de fase respecto a la fase antigua. El Tipo 1 se puede visualizar como una curva de transición de fase con una pendiente de 1 (con un ángulo de 45°), mientras que el Tipo 0 presenta una pendiente con un ángulo de 0° (Johnson, 1992). Ver Figura 3.

2.3.1-Construcción de una CRF.

La construcción básica de una CRF consiste en un gráfico, en el cual, en el eje de las abscisas se grafica al tiempo circadiano (CT) del estímulo, desde el CT 0 hasta el CT 24. La duración del periodo endógeno (τ) va desde el tiempo circadiano 0 hasta el CT 24. En condiciones LD 12:12, se toma para tener condiciones de sincronización estándares al tiempo circadiano 0 como el inicio del día subjetivo, mientras que el CT 12 es el inicio de la noche subjetiva. La ordenada es la magnitud del cambio de fase en horas circadianas. Los avances se grafican por encima de la abscisa como valores positivos, mientras que los atrasos son graficados por debajo de esta como valores negativos. Los avances o retrasos de fase se representan con el símbolo $\Delta\phi$, pudiendo representar minutos, horas o grados (Johnson, 1992). Ver Figura 3 y figura 4.

Los protocolos principales para realizar una curva de respuesta de fase son los siguientes:

- 1) El estímulo o pulso se aplica mientras que el oscilador se encuentra en libre corrimiento (por ejemplo, cuando se administra un pulso de luz a un organismo en oscuridad constante en libre corrimiento). En este caso, el organismo funciona como su propio control, donde la asignación exacta del tiempo circadiano del pulso depende del conocimiento de ϕ en un libre corrimiento. Usualmente el tiempo circadiano de ϕ se asigna a través de su fase en un ciclo de luz/oscuridad 12:12 (LD), pero es importante tener seguro que no existe algún enmascaramiento en la condición LD. La posibilidad de enmascaramiento se puede evaluar liberando al organismo de la condición LD a un libre corrimiento.
- 2) El estímulo se aplica en un libre corrimiento corto, después de la liberación en condiciones de sincronización (por ejemplo, un pulso de luz en oscuridad constante dentro de pocos ciclos después de la liberación de condiciones LD 12:12). Este es, probablemente el mejor método para percatarse de que existe un fenómeno de sincronización.
- 3) El estímulo se aplica a partir de una condición continua hacia otra (oscuridad constante hacia una condición de luz-luz).
- 4) La curva de respuesta de fase se puede estimar a partir del ángulo de fase asumido por el ritmo en diferentes ciclos T del estímulo. (por ejemplo, ciclos T de pulsos de luz). Un ejemplo de este método es el de Eskin (1971), donde comparó una curva de respuesta de fase, derivada del método 1 (descrito anteriormente) y del método 4, donde encontró equivalencias. El método 4 fue incapaz de producir una curva de respuesta de fase completa, ya que el ángulo

de la fase no es estable alrededor de la región del punto de quiebre de la curva de respuesta de fase durante la sincronización de los ciclos T (Johnson, 1992).

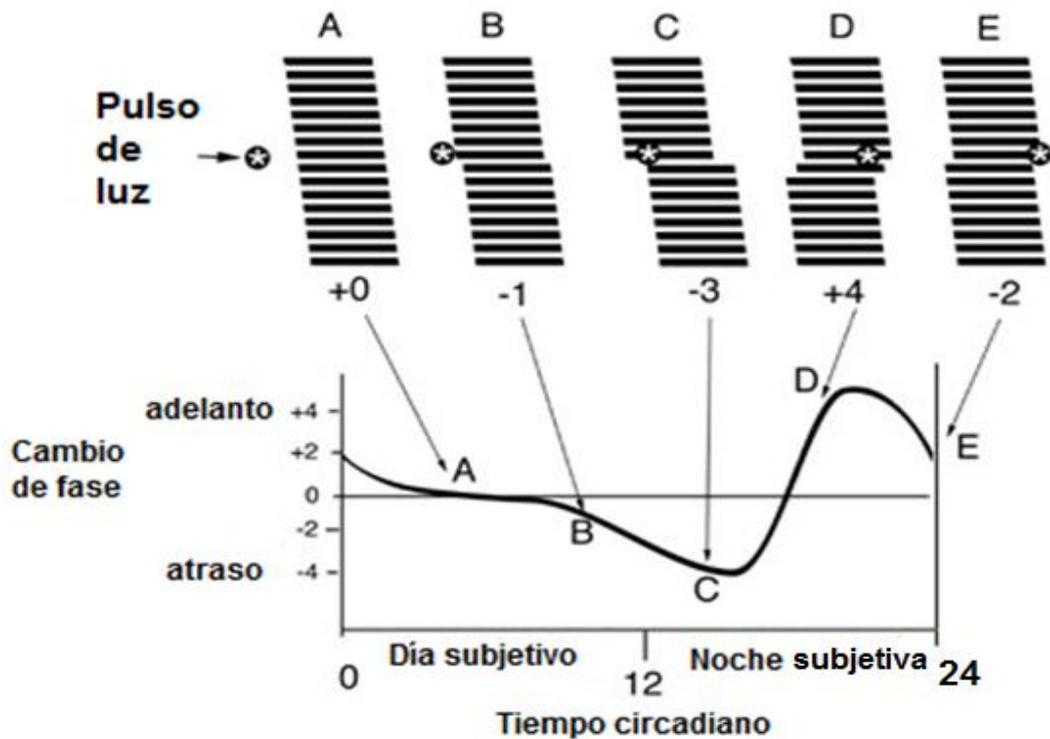


Figura 3. Ejemplo esquemático de una CRF con pulsos de luz. Los pulsos están representados por estrellas. El tiempo de los desfases de la actividad mostrada en los diferentes actogramas ha sido graficada en relación al día subjetivo y noche subjetiva del animal experimental. En el eje de las ordenadas del gráfico se muestran las horas de adelanto o de atraso que provocó el estímulo lumínico, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestran los tiempos circadianos de 0 a 24 horas (Tomado de Moore-Ede, 1982).

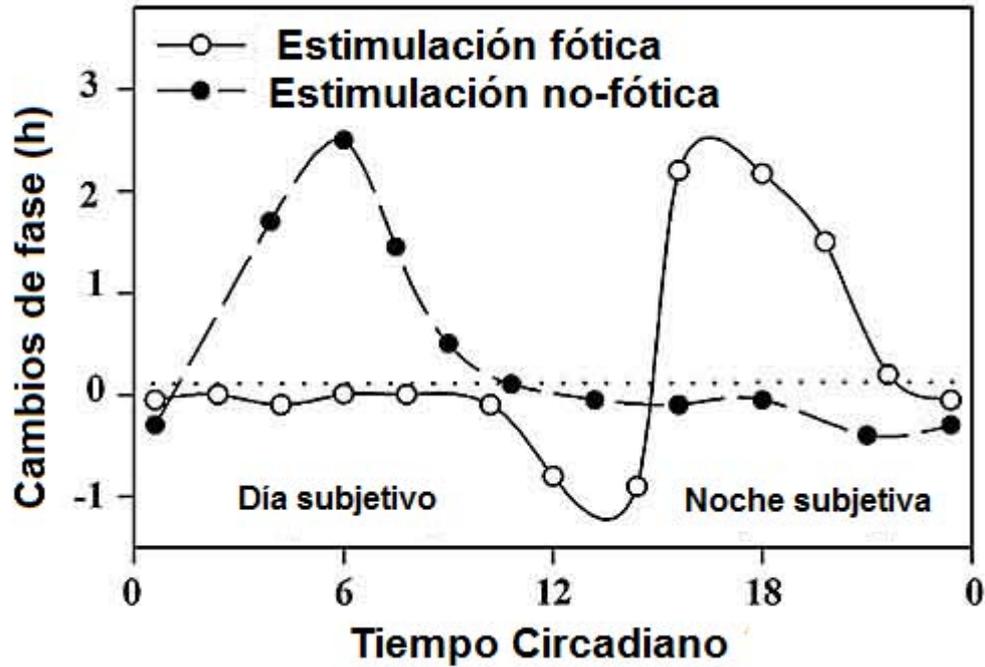


Figura 4. CRF de actividad locomotora con estimulación fótica y no fótica. En la estimulación fótica (marcada por la línea de círculos blancos) se observan adelantos de fase en la noche subjetiva tardía), mientras que, en la noche subjetiva temprana) se observan atrasos de fase. En el día subjetivo, no existen cambios de fase significativos. En la estimulación No Fótica marcada por la línea de círculos oscuros, al aplicar un pulso de oscuridad, existen adelantos de fase en el día subjetivo, mientras que, en la noche subjetiva temprana, no existen cambios de fase significativos, a diferencia de la noche subjetiva tardía, donde se presentan ligeros atrasos de fase. Tomado de Mrosovsky, 1996.

2.4.-Acocil *Procambarus clarkii*.

El acocil forma parte de un grupo de crustáceos que habitan en diversos ambientes, tanto en ambientes lóticos, como en ambientes lénticos. Los acociles son organismos cosmopolitas, presentando un amplio rango de tolerancia a diferentes condiciones ambientales. Se conocen aproximadamente 600 especies de acociles en todo el mundo, con aproximadamente 100 especies en Australia, cerca de 300 en América, mayormente, un 85% en Norteamérica y Centroamérica. Las especies en México, incluyen una del género *Orconectes*, 10 en el género *Cambarellus* y 44 del género *Procambarus*, este último se distribuye mayormente en zonas como Belice, Honduras y Estados Unidos (Villalobos, 1948; Rojas, 1998; López, 2006). El género *Procambarus* habita en cuerpos de agua temporales. Durante la estación seca, pueden encontrarse en pequeños hoyos del suelo que se conectan a través de túneles y cámaras subterráneas contando con la humedad necesaria para la supervivencia de estos organismos (López, 2008). El acocil *P. clarkii* (ver figura 5), se ha adaptado y colonizado dentro de una gran variedad de hábitats. Los acociles *P. clarkii*, como otros crustáceos decápodos, tienen algunas características biológicas que los vuelven potencialmente importantes en la acuicultura, lo que incluye su alta adaptabilidad en cautiverio, lo que les ha permitido alimentarse de una amplia gama de alimentos. Así, estos animales pueden adaptarse a condiciones ambientales extremas, asegurando su reproducción y progenie ante tales condiciones, siendo una especie de crustáceo que ha provocado pérdidas económicas como especie invasora, provocando daños en cosechas en países como China. (Hernández y Pérez, 2012).



Figura 5. Acocil *Procambarus clarkii*.

2.5.- Sistema circadiano del acocil *Procambarus clarkii*.

Existe una gran cantidad de estudios cronobiológicos en crustáceos, de los cuales gran parte se han realizado en acociles *Procambarus clarkii*, *Cherax destructor* y *Procambarus bouvieri*; muchos de esos estudios se enfocan en el ritmo de actividad locomotora. Los ritmos circadianos en los acociles, y en general en crustáceos, persiste en libre corrimiento, incluso sin señales de sincronización ambientales. Esta ritmicidad se controla a través de osciladores internos, los cuales controlan los niveles de actividad celular y, por lo tanto, regulan eventos fisiológicos y conductuales manifestándose en un patrón oscilatorio. Como en otros modelos animales, tales osciladores están principalmente localizados en el sistema nervioso de estos crustáceos. (Strauss y Dirksen, 2010).

2.5.1. Retina del ojo de *P. clarkii*.

Una característica filogenética importante en algunos grupos de animales (insectos y crustáceos) son los elementos retinianos del ojo compuesto, donde las omatidias contienen una cutícula derivada de la córnea y un aparato de lentes dióptrico con ocho células rabdómicas y células sensoriales pigmentadas, rodeadas de células pigmentadas no neurales que inervan adaptaciones dinámicas para ajustarse a las condiciones lumínicas del ambiente a través de cambios en los pigmentos. La participación de la retina de los ojos como sensor de luz para regular funciones circadianas es necesaria para la adaptación hacia los cambios de luz/oscuridad del ambiente de los organismos. Las ablaciones de la retina de estos animales provocan aumentos de la actividad locomotora, lo cual indica la gran importancia de la retina como sensor de luz (Fanjul y Prieto, 2003). Ver figura 6.

2.5.2. Sistema del tallo ocular y mediadores de la ritmicidad circadiana del acocil.

El tallo ocular de los crustáceos está formado por neurópilos o ganglios visuales, conteniendo también estructuras como la lámina ganglionaris, la médula externa, la médula interna y la médula terminallis, la cual, es de hecho parte del protocerebro. El tallo ocular es una importante fuente de neuropéptidos y moduladores como la serotonina y melatonina involucrados en la regulación circadiana, los cuales afectan al ritmo de actividad locomotora, la distribución de los pigmentos y la sensibilidad del ojo. La mayoría de la neurosecreción de los ganglios del tallo ocular que participa en la regulación circadiana, es dada por el aparato de la glándula sinusal y el órgano X (SG-OX). El órgano X se localiza en la corteza lateral anterior de la medula terminalis, próximo al cuerpo hemilipsoidal mientras que, la glándula sinusal se ubica adyacente al borde medio entre la medula externa y la medula interna,

formado por terminales axónicas del sistema del SG-OX y otras neuronas que conectan alrededor de la arteria óptica (Ver figura 6). Se liberan así diversos neuropéptidos del ya mencionado sistema SG-OX, como son: la hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH), la hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH), hormona inhibidora de la muda (MIH), hormona inhibidora de la vitelogénesis/gónadas (VIH/GIH) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH) (Dirksen y Straus, 2010).

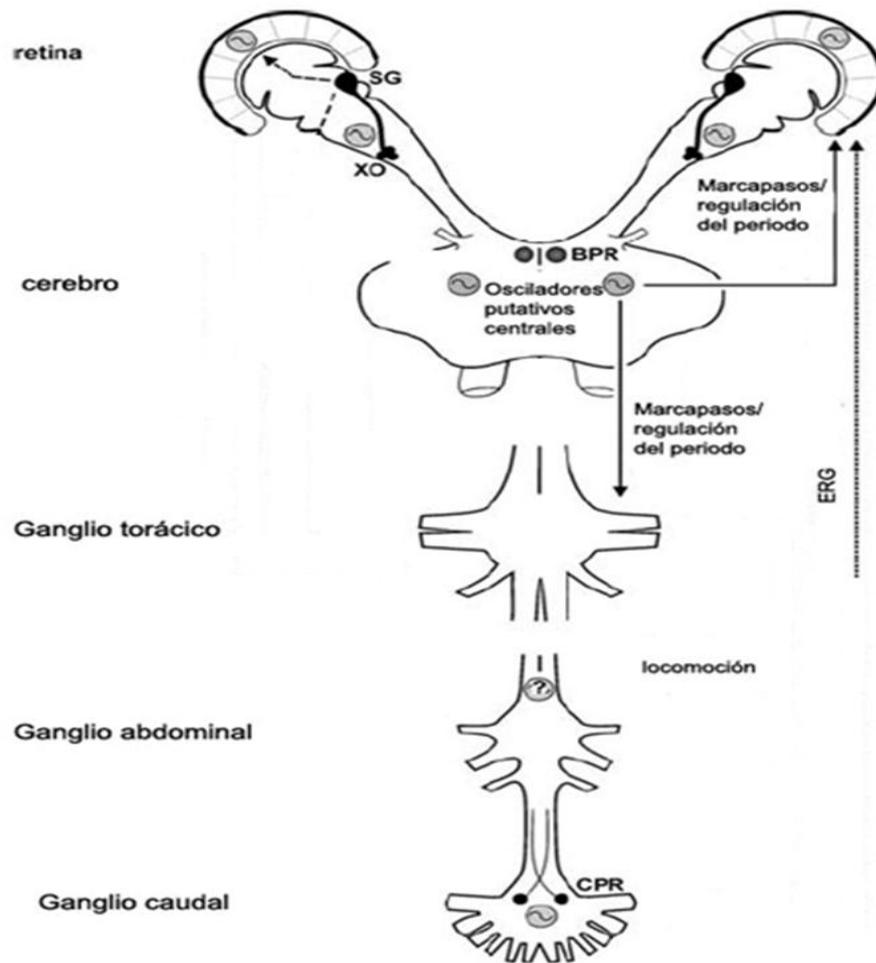


Figura 6. Esquema del sistema nervioso circadiano del acócil *Procamburus clarkii*. Se hacen evidentes los osciladores principales que participan en la ritmicidad circadiana. En la parte superior se muestra a la retina, seguida del tallo ocular que contiene al sistema de la glándula sinusal y órgano X y Glándula sinusal (SG-OX). En la sección anatómica del cerebro, se señalan a los fotorreceptores cerebrales (BPR) junto con los osciladores centrales putativos del protocerebro. Fotorreceptores cerebrales; Finalmente, en la sección anatómica del ganglio caudal se muestra la ubicación de los

fotorreceptores caudales (CPR), los cuales promueven la ritmicidad circadiana de la actividad locomotora. Tomado de Strauss y Dircksen, 2010.

2.5.3. Fotorreceptores caudales del ganglio abdominal terminal del acocil.

Un par de neuronas (fotorreceptor caudal) se ha propuesto como un regulador circadiano, funcionando como una interneurona que sensa directamente estímulos de luz, a través de procesos de transducción que se llevan a cabo dentro de las dendritas. El fotorreceptor caudal se ubica en posición anterior lateral del sexto ganglio abdominal terminal, presentándose como un simple par de neuronas con largas ramificaciones intra-ganglionares, los cuales se extienden hasta los lóbulos de los neurópilos antenales y olfatorios del cerebro. El fotorreceptor caudal esta principalmente involucrado en el control de la locomoción, modulando conductas de evasión a la luz, incluso pudiendo responder a pulsos táctiles o corrientes de agua (Dircksen y Strauss, 2010). Ver figura 6.

2.5.4. Fotorreceptores cerebrales extrarretinianos del acocil.

La participación de fotorreceptores extrarretinianos se ha visto involucrada en la regulación circadiana de diversas especies de invertebrados. En crustáceos, se han hecho experimentos de ablación donde se concluye que los fotorreceptores que no son caudales o retinianos contribuyen en la regulación circadiana del ritmo ERG (electrorretinográfico) y el ritmo de actividad locomotora, donde, si se retira la retina junto con la lámina ganglionaris, persiste el ritmo (bajo iluminación monocromática de luz azul o roja). Los fotorreceptores cerebrales, localizados abajo de la zona frontal del cefalotórax del acocil, se han estudiado recientemente para concluir que están involucrados en la sincronización del ritmo de actividad locomotora de los acociles *P. clarkii* y *C. destructor* (Strauss y Dircksen, 2010). Ver figura 6.

2.6.-Actividad locomotora del acocil *Procambarus clarkii*.

El ritmo circadiano de actividad locomotora en acociles adultos se ha estudiado profundamente. Se han realizado experimentos que consisten en ablaciones para localizar marcapasos y mecanismos de sincronización responsables de provocar el ritmo de actividad locomotora en estos organismos. En 1938, Kalmus reportó que al remover el tallo ocular del acocil *Potamobius*, se provoca un incremento de la actividad locomotora y una pérdida de ritmicidad circadiana. Otros autores (Roberts, 1944; Schaleck, 1942), confirmaron tales resultados en *Cambarus*. Sin embargo, Page y Larimer (1975), demostraron en

Procambarus clarkii la persistencia de ritmicidad después de una ablación del tallo ocular, pero, el aislamiento neural de los centros motores del tórax (desde el ganglio supraesofágico hasta la conexión circumesofágica) provoca una conducta arrítmica. Tales autores propusieron al ganglio supraesofágico como el responsable del ritmo de actividad locomotora, el cual está relacionado con los centros de actividad locomotora a través de axones conectados con la zona circumesofágica. Controversialmente, Fuentes e Inclán (1981), reportaron la persistencia del ritmo de actividad locomotora en animales descerebrados. Existe escasa información de los fotorreceptores circadianos y vías de sincronización de la actividad rítmica del acocil (Fanjul y Prieto, 2003). Page y Larimer (1972, 1976), comprobaron que los fotorreceptores que participan en la sincronización, no se encuentran en la retina o en el ganglio caudal; propusieron que los elementos neurosecretores del tallo ocular no son necesarios para la expresión del ritmo de actividad locomotora, pero podrían estar desempeñando una función en la sincronización del ritmo a través de ciclos de luz. Sin embargo, Fuentes e Inclán (1987), estudiaron en el acocil *Procambarus bouvieri* que el sexto ganglio abdominal funciona como un fotorreceptor circadiano involucrado en la ritmicidad de la actividad locomotora (Fanjul y Prieto, 2003).

2.7.-Modelo circadiano del reloj molecular de *Drosophila melanogaster*.

El reloj circadiano de la mosca de la fruta está ampliamente estudiado y se considera uno de los modelos paradigmáticos del funcionamiento del reloj a nivel de genética molecular. Aquí se identificó el primer gen reloj, llamado “periodo” (*per*). El segundo gen descubierto en este modelo animal fue “timeless” (*tim*). A nivel molecular, el reloj circadiano de la mosca de la fruta consiste en una doble asa de retroalimentación negativa, con asas de transcripción-traducción interconectadas. La base del modelo es la retroalimentación negativa de la proteína PER y TIM sobre su propia transcripción. Los estudios en *D. melanogaster* y el hecho de que los genes reloj presenten oscilaciones circadianas robustas, llevó a proponer la participación de secuencias de DNA “cis- reguladoras” que se unen a factores de transcripción. A tales secuencias se les denominó “cajas-reloj”, donde, más tarde, la evidencia apuntó a que estos elementos reguladores son en realidad “Cajas E” (*E-box*), las cuales son secuencias hexaméricas del tipo CACGTG (citosina-adenosina-citosina-guanina-timina-guanina), que también pueden ser cajas no canónicas del tipo CANNTG (citosina, adenosina, N= cualquier nucleótido, timina y guanina). Un complejo activador de la transcripción formado por dos proteínas Clock (CLK) y Cycle (CYC) se une a una secuencia de 6 nucleótidos en los promotores (*E-Box*) de dos genes *tim* (timeless) y *per*, los cuales se activan dentro del núcleo. Los productos de estos genes (las

proteínas TIM y PER) dimerizan formando un complejo capaz de ingresar al núcleo e interactuar con CLK- CYC para inhibir su actividad transcripcional. Así los genes *per* y *tim* se transcriben rítmicamente determinando la oscilación de los niveles de las proteínas TIM y PER, donde tal asa de retroalimentación tiene una duración de alrededor de 24 horas. (Figura 2). En una segunda asa de retroalimentación paralela, la proteína vrilie (VRI) reprime cíclicamente la transcripción del gen *clk* y, puesto que PER y TIM también inhiben la transcripción del gen *vri*, *clk* oscila en antifase con *per* y *tim* (Aguilar, Fanjul y Carmona, 2009. Ritmos circadianos. En Fanjul y Hiriart, Biología funcional de los animales II. México: Siglo XXI Editores). Ver figura 7.

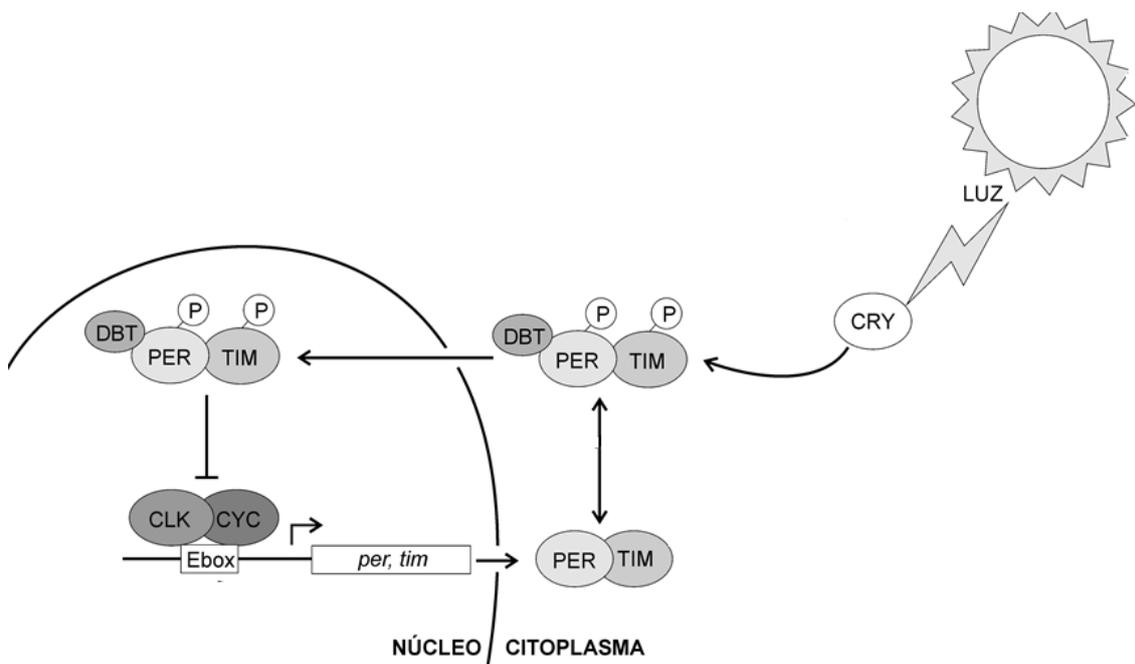


Figura 7. Modelo canónico molecular del asa de retroalimentación negativa de *Drosophila melanogaster*. A través de una señal externa (luz), se activa el criptocromo (CRY) el cual en la fase luminosa degrada a TIM, lo cual impide la formación del heterodímero de las proteínas PER y TIM. El heterodímero de PER y TIM interacciona con la proteína DBT (double time) acumuladas en el citoplasma, inhibiendo así su propia transcripción a través de la inhibición del dímero proteico CLOCK-CYCLE (Fanjul e Hiriart, 2009).

2.8.-Modelo circadiano del reloj molecular del acocil *Procambarus clarkii*.

Se ha propuesto que el modelo molecular del acocil *P. clarkii* es similar al de *Drosophila melanogaster*. En el estudio de Escamilla-Chimal et al., (2010), se reportó que, en el tallo ocular, retina y cerebro del acocil *P. clarkii*, las proteínas PER, TIM y CLK se expresan de manera circadiana, lo cual sugiere que los elementos transcripcionales interaccionan de manera positiva o negativa. En el trabajo de Escamilla-Chimal y Fanjul-Moles (2008), se comprobó la oscilación circadiana de la expresión de la proteína CRY en acociles *P. clarkii* en los primeros estadios embrionarios. Lo anterior mostró la expresión circadiana de CRY manifestándose en el tallo ocular y en el protocerebro. De igual forma, se ha visto que la proteína CRY se expresa de manera circadiana en algunos osciladores putativos ubicados en el acocil *P. clarkii*. CRY se expresa circadianamente en los tallos oculares y en el protocerebro medio, deduciendo que la proteína CRY posiblemente esté relacionada con la fotorrecepción del reloj y por ende permita la ritmicidad circadiana (Fanjul-Moles y Escamilla-Chimal, 2004).

2.9-Vía de señalización CREB-CRE.

2.9.1- Adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPc).

El nucleótido adenosín monofosfato-3',5' cíclico (AMPc) es un segundo mensajero que participa en diversos procesos biológicos. Se forma en la cara interna de la membrana celular por la enzima adenilato ciclasa que se encuentra unida a la membrana celular. La enzima adenilato ciclasa promueve la formación de AMPc a través del ATP (Adenosin trifosfato), liberando difosfato (PP). La descomposición de AMPc a 5' AMP se cataliza con la enzima fosfodiesterasa. La actividad de las adenilato ciclasa se controla por las proteínas Gs y Gi (pequeña proteína G- *small G protein* y proteína G inhibidora de regulación- *inhibitory regulative G protein*), que a su vez son moduladas por señales extracelulares a través de receptores de 7 hélices transmembranales. Los receptores beta adrenérgicos están vinculados con la epinefrina y el glucagon (primeros mensajeros) para generar segundos mensajeros como el AMPc, el cual, altera moléculas intracelulares creando una determinada respuesta, pudiendo por ejemplo iniciar la transcripción de diversos genes (transducción). El AMPc funciona como segundo mensajero regulando diversas hormonas como la epinefrina y glucagon, a través de proteínas cinasas, o participando en la interconversión de glucógeno a glucosa, siendo así crucial la participación de la proteína cinasa A (PKA). La proteína cinasa A en estado inactivo, es un heterotetrámero cuyas subunidades catalíticas se separan de ella y se convierten en enzimas activas. La PKA en estado activo, fosforila residuos de serina y de treonina de más de 100 diferentes proteínas y factores de transcripción (Koolman y Rohm, 2004).

2.9.2- Proteína de unión en respuesta a CRE (CREB).

La proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB, *cAMP response element binding protein*), ha sido recientemente reconocida como una proteína importante dependiente de la fase, activándose a través de una fosforilación. La sincronización entre la luz ambiental y el reloj biológico en el núcleo supraquiasmático está relacionada con la fosforilación de CREB en el sitio de activación transcripcional de la Serina 133 (Ser 133) de tal proteína. Los mecanismos que median la fosforilación de CREB (P-CREB) y su relación con la sincronización del reloj son desconocidos hasta el momento (Ding y Gillete, 1997).

Como se explica en la Figura 8, la PKA fosforila a CREB en la Serina 133 dentro del dominio KID (segmento de la proteína que se activa por cinasas). Esta fosforilación provoca cambios conformacionales en CREB que dejan expuestos los dominios ricos en glutamina del dominio Q2, el cual promueve la expresión génica a través de la interacción con el elemento cis denominado CRE (elemento en respuesta al AMPc – *cAMP response element*). Así, la fosforilación de la Serina 133 produce un cambio en la estructura de la molécula que promueve el reclutamiento de los coactivadores CBP (proteína de unión a CREB- “*CREB binding protein*”) y p300. La unión de CBP a CREB fosforilado es necesaria para activar la transcripción. CBP se une al dominio KID fosforilado en la Serina 133 a través de su dominio KIK. Por lo anterior, CBP se considera una proteína de anclaje o adaptadora. El complejo CREB-CBP permite el ensamblaje con CRE adosado al DNA; a partir de este suceso se inicia la transcripción de genes y la formación del RNA mensajero para dar pie a la síntesis de diversas proteínas como PER1 y TIM (Taleiski, 2006).

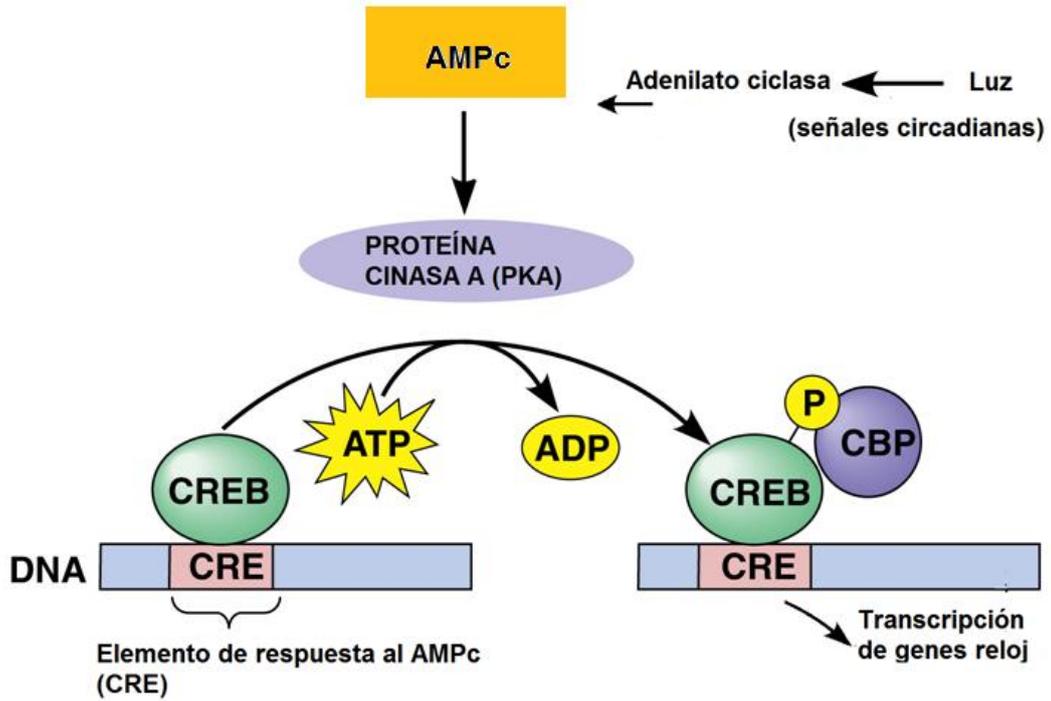


Figura 8. Esquema que explica la acción de los aumentos de AMPc a nivel intracelular. A través del AMPc, se promueve la activación de la vía CREB-CRE a través de la PKA, provocando, en este caso la transcripción de genes reloj cuando CREB es fosforilado uniéndose a la proteína de andamiaje CBP en el núcleo celular. (Tomado de Kramer, 2015).

3. Objetivos.

Evaluar el papel de la vía CREB-CRE sobre la sincronización fónica y cambios en los periodos de los ritmos de actividad locomotora del acocil *P. clarkii*.

3.1 Objetivos particulares.

-Observar cambios en los periodos provocados por la aplicación de tres diferentes tratamientos experimentales a diferentes horas circadianas (dbAMPc, H89+luz y luz) sobre la actividad locomotora del acocil *P. clarkii*.

-Analizar cambios de fase en horas por cada tratamiento experimental.

-Construir una curva de respuesta de fase por cada tratamiento experimental aplicado en animales a los que se les registró la actividad locomotora en tres tiempos circadianos diferentes (CT 13, CT10 y CT 23).

4. Antecedentes.

En vertebrados, se ha comprobado que la vía de señalización CREB-CRE actúa de manera importante sobre la sincronización por luz en los ritmos circadianos exhibidos en el ritmo de actividad locomotora de ratas (Boyoung y Aiqing, 2010), así como cambios en la expresión de genes reloj (*per1* y *tim*) en cultivos de retinas de *Xenopus laevis*, (Green, 2003; Anderson y Green, 2000), promoviéndose el fenómeno de sincronización y cambios de fase en los ritmos.

En crustáceos y, en general en invertebrados, se desconoce el papel de la vía de señalización CREB-CRE sobre los ritmos circadianos. En la tesis de Martínez (2013), se comprobó que el efecto de uno de los elementos que participa en la vía CREB-CRE (AMPc) provoca cambios en los periodos y amplitud de los ritmos circadianos del electroretinograma (ERG) de los acociles *P. clarkii* y *C. montezumae*, tanto en acociles íntegros como en ojos aislados *in vitro*. En el presente trabajo, se pretende analizar el efecto de la inducción o inhibición de la vía de señalización CREB-CRE sobre los ritmos circadianos de actividad locomotora del acocil *Procambarus clarkii*, lo cual, se pretende lograr a través de la aplicación en diferentes horas circadianas (CT 10, CT 13, CT 23) ya sea de un análogo de AMPc (db-AMPc), un inhibidor de la PKA+ luz o un tratamiento basado en la exposición a la luz. Lo anterior, tiene la finalidad de obtener curvas de respuesta de fase por cada tratamiento para analizar si la vía de señalización CREB-CRE promueve la sincronización de la actividad locomotora del acocil *P. clarkii*.

5. Hipótesis.

La vía de señalización CREB-CRE participa como un inductor principal en la sincronización del ritmo de locomoción del acocil *P. clarkii* provocando cambios de fase y cambios en el periodo del ritmo de actividad locomotora.

6. Metodología.

6.1- Registro de la Actividad locomotora.

Se utilizó una N total de 55 acociles *Procambarus clarkii* adultos en intermuda de ambos sexos previamente aclimatados. Los acociles se colocaron en acuarios compartimentalizados (45 cm x 22 cm x 16 cm), donde se sincronizaron a un fotoperiodo impuesto a través de una lámpara de neón con intensidad lumínica de 300 lux a una temperatura de 20 ± 4 °C. La luz se encontraba a una distancia aproximada de 30 cm de cada acuario, donde un temporizador controlaba el encendido y apagado lumínico. La actividad de los animales fue registrada con un conjunto de emisores y sensores de luz infrarroja distribuidos a lo largo de cada contenedor de los acuarios dentro de los compartimientos de registro de locomoción. La interferencia del haz de luz provocada por los movimientos de los acociles se transfirió electrónicamente a un pulso de voltaje por medio de un circuito electrónico analógico digital. La señal fue convertida en bits y fue capturada cada minuto por un equipo de cómputo para su análisis posterior. Por cada tratamiento experimental que se explicará más adelante, se utilizó una N de 5 animales, para seguir con el protocolo de curva de respuesta de fase número dos según Johnson, (1992), que se describió anteriormente.

6.2-Preparación de los fármacos.

Análogo de AMPc (db-AMPc).

La solución de db-AMPc se obtuvo diluyendo el fármaco en agua destilada estéril. Se preparó una solución final de 10 μ M a partir de 4.91 μ g del compuesto para disolver en 1 ml de agua destilada estéril e inyectar en uno de los tallos oculares de los animales 10 μ l de la solución final. El fármaco se mantuvo a una temperatura de -20°C para su conservación. (Ver en apéndice detalles del fabricante).

H89 (inhibidor de la PKA).

Se preparó una solución con 18 µg de H89, diluyéndolos en 1 ml de DMSO, para ser inyectados en una cantidad de 10 µl en uno de los tallos oculares de cada animal utilizado. La solución se mantuvo a una temperatura de -20°C para su conservación y así hacer posible su uso en futuros experimentos. (Ver en apéndice detalles del fabricante).

6.3- Construcción de la CRF en actividad locomotora.

Se siguió el protocolo 2 para construir curvas de respuestas de fase que describe Johnson (1992). A los animales previamente aclimatados en los acuarios de registro de actividad locomotora, se les impuso un fotoperiodo de luz oscuridad (12:12) con encendido a las 7 h por 5 días. Consecutivamente, se dejó en condiciones de oscuridad constante para la posterior aplicación de los tratamientos experimentales (Luz, db-AMPC o H89+luz) en el primer día en DD, a tres diferentes tiempos circadianos, tomando como base la hora externa que correspondería al CT determinado, por ejemplo, el CT 10 corresponde a las 17 h, el CT 13 corresponde a las 20 h y el CT 23 a las 06 h.

6.4-Tratamiento con luz en los registros de actividad locomotora.

Luego de 5 días, a los animales sincronizados previamente colocados en los acuarios compartimentalizados para registrar la actividad locomotora, se les aplicó un pulso de luz (300 lx) de una hora de duración a cada uno de los acociles en diferentes horas circadianas (CT 13, CT 10 y CT 23) en oscuridad constante, para dejar registrando la actividad locomotora de los animales por otros 6 días. Posteriormente se analizaron los datos de movimiento a lo largo del día.

6.5-Tratamiento de db-AMPC en los registros de actividad locomotora.

Luego de 5 días, a los animales sincronizados previamente, colocados en los acuarios compartimentalizados para registrar la actividad locomotora, se les inyectó a través de una jeringa de insulina una dosis de 10 µM de un análogo de AMPC (dibutiril AMPC) en uno de los tallos oculares a diferentes horas circadianas (CT 13, CT 10 y CT 23) en oscuridad constante, para dejar registrando la actividad locomotora de los animales por otros 5 - 6 días y analizar los datos posteriormente. La anterior concentración de db-AMPC se basó en reportes anteriores (Martínez, 2013, O'Neill, 2009).

6.6-Tratamiento de H89 + Luz en los registros de actividad locomotora.

Luego de 5 días, a los animales sincronizados previamente colocados en los acuarios compartimentalizados para registrar la actividad locomotora, se les inyectó, a través de una jeringa de insulina una dosis de 9 μ M de un inhibidor de la proteína cinasa A (H89) en uno de los tallos oculares a diferentes horas circadianas (CT 13, CT 10 y CT 23) en oscuridad constante, para posteriormente aplicar un pulso de luz de 300 Lx por una hora. La anterior concentración de H89 se basó en reportes previos que utilizaron el mismo fármaco en ritmos circadianos (H. Ko, 2010; Martínez, 2013, Narishige et al, 2014). Luego del anterior tratamiento experimental descrito, se dejó registrando la actividad locomotora de los animales por otros 6 días para posteriormente analizar los datos.

6.7-Análisis de los datos.

6.7.1- Actividad locomotora.

Los datos obtenidos de los registros de actividad locomotora se analizaron a través de actogramas de doble gráfica. El análisis consistió en tomar en cuenta la presencia de patrones rítmicos representativos. Los picos de actividad se ubicaron como los niveles de actividad locomotora superiores a la actividad media por día \pm 1 desviación estándar, desechando así los pequeños movimientos como el de las antenas de los animales. Se utilizaron métodos estadísticos cuantitativos para detectar el ritmo y se estimaron sus parámetros. Se determinaron las líneas de tendencia de avances o adelantos de fase a través de la medición de los picos de actividad que superaron el 50% de actividad, descartando a los ciclos transitorios y tomando en cuenta el cambio de fase que presentó el último día de registro. A los registros de 5 o más días se les determinó un patrón rítmico, a través de periodogramas de χ^2 (ver en apéndice fundamento) estimados por el programa de cómputo SPAD9 (OMNI-ALVA, México).

6.7.2- Análisis estadístico de los periodos de actividad locomotora.

Para analizar las diferencias entre los periodos obtenidos entre registros control y experimentales, se realizó una prueba de t de Student, para analizar la existencia de diferencias significativas entre las medias de los periodos alcanzados entre controles y en los tres diferentes tratamientos experimentales antes mencionados.

7. Resultados.

Se utilizaron tres diferentes tratamientos experimentales para medir el efecto de sincronización de la vía de señalización CREB-CRE sobre el ritmo de actividad locomotora del acocil *P. clarkii*. Los tratamientos experimentales consistieron, ya sea en la exposición a un pulso de luz blanca (300 lx, por una hora), una inyección en uno de los tallos oculares de los acociles de 10 μ M de db-AMPC o una inyección de 9 μ M de un inhibidor H89 + pulso de luz blanca (300 lx) por una hora en diferentes tiempos circadianos (noche subjetiva temprana (CT 13); noche subjetiva tardía (CT 23) y día subjetivo (CT 10)). Los resultados obtenidos indican que los tratamientos experimentales con luz y db-AMPC provocaron cambios de fase promedio similares en los tiempos circadianos en que se aplicaron estos tratamientos (ver figura 18). Para apreciar los detalles de los valores resumidos de los cambios de fase provocados por los diferentes tratamientos experimentales ver Tabla 1. Así mismo, la luz y el db-AMPC provocaron cambios promedio similares en los periodos de los ritmos. A pesar de que en algunos registros se presentaron aumentos de los periodos al aplicar los tratamientos, al realizar la prueba de t de Student, no se encontraron diferencias significativas entre las medias de los periodos controles y experimentales (figura 19). El tratamiento experimental H89+luz provocó cambios de fase únicamente en tres registros del total de animales destinados para aplicarles este tratamiento. Uno de estos registros pertenece al grupo de animales a los que se aplicó el tratamiento en el CT 13, provocando un atraso de 2 horas. Los otros dos pertenecen al grupo de registros a los que se aplicó el tratamiento en el CT 10, un registro presentó un atraso de 0.6 horas, mientras que el tercero presentó un atraso de fase de 1 h. El resto de los registros a los que se les aplicó el tratamiento experimental no presentaron cambios de fase, tornándose arrítmicos. La prueba estadística que se realizó para comparar los periodos de los registros con los tratamientos de H89+luz fue únicamente una comparación entre la media de los periodos de los controles y experimentales de los tres únicos registros que mostraron cambios de fase y periodos significativos (ver figura 19 y tabla 2). A continuación, se muestran los resultados que se obtuvieron en registros de actividad locomotora representativos con cada uno de los tratamientos experimentales y las pruebas estadísticas pertinentes.

7.1. Experimentos con luz.

Los cambios de fase provocados por el tratamiento de luz en los registros de actividad locomotora se pueden apreciar en la figura 18 A. En promedio, el pulso de luz aplicado en el CT 13 provocó atrasos de fase de $\Delta\phi = 2.26$ h. En la figura 9 se puede ver reflejado el efecto de un pulso de luz en el CT 13 en un registro de actividad locomotora representativo ($\Delta\phi = -1.6$ h). En la parte control se muestra $\tau = 24.2$ h, y en la parte experimental del registro $\tau = 24.4$ h. Como se observa en la figura 18 A, la aplicación del pulso de luz en el CT 10, provocó en todos los registros de actividad locomotora un cambio de fase promedio de $\Delta\phi = -0.6$ h. En la figura 10, se muestra un registro de actividad locomotora representativo, donde, al aplicar el pulso de luz, se provocó un cambio de fase de $\Delta\phi = -0.2$ h, presentando en la parte control un valor de $\tau = 24.4$ h, en el aparte experimental $\tau = 25$ h. En los registros en donde se aplicó el pulso de luz en el CT 23, se observó en promedio que en los registros de actividad locomotora de $\Delta\phi = 3.2$ h (figura 18 A). En la figura 11 se muestra un registro de actividad locomotora representativo, en donde el pulso de luz provocó un adelanto de fase de $\Delta\phi = 4.5$ h, con un valor de $\tau = 24.4$ h en la parte control y un valor de $\tau = 23.7$ h en la parte experimental. Los cambios promedio de los periodos en todos los registros de actividad locomotora con el tratamiento de luz en todos los CT se aprecia en la figura 19 A y Tabla 2. Entre las medias de los periodos controles y experimentales no se observaron diferencias significativas (figura 19 A) al aplicar la prueba estadística de t de Student.

7.1.1. Registro de actividad locomotora de *P. clarkii* con el tratamiento de luz en el CT 13.

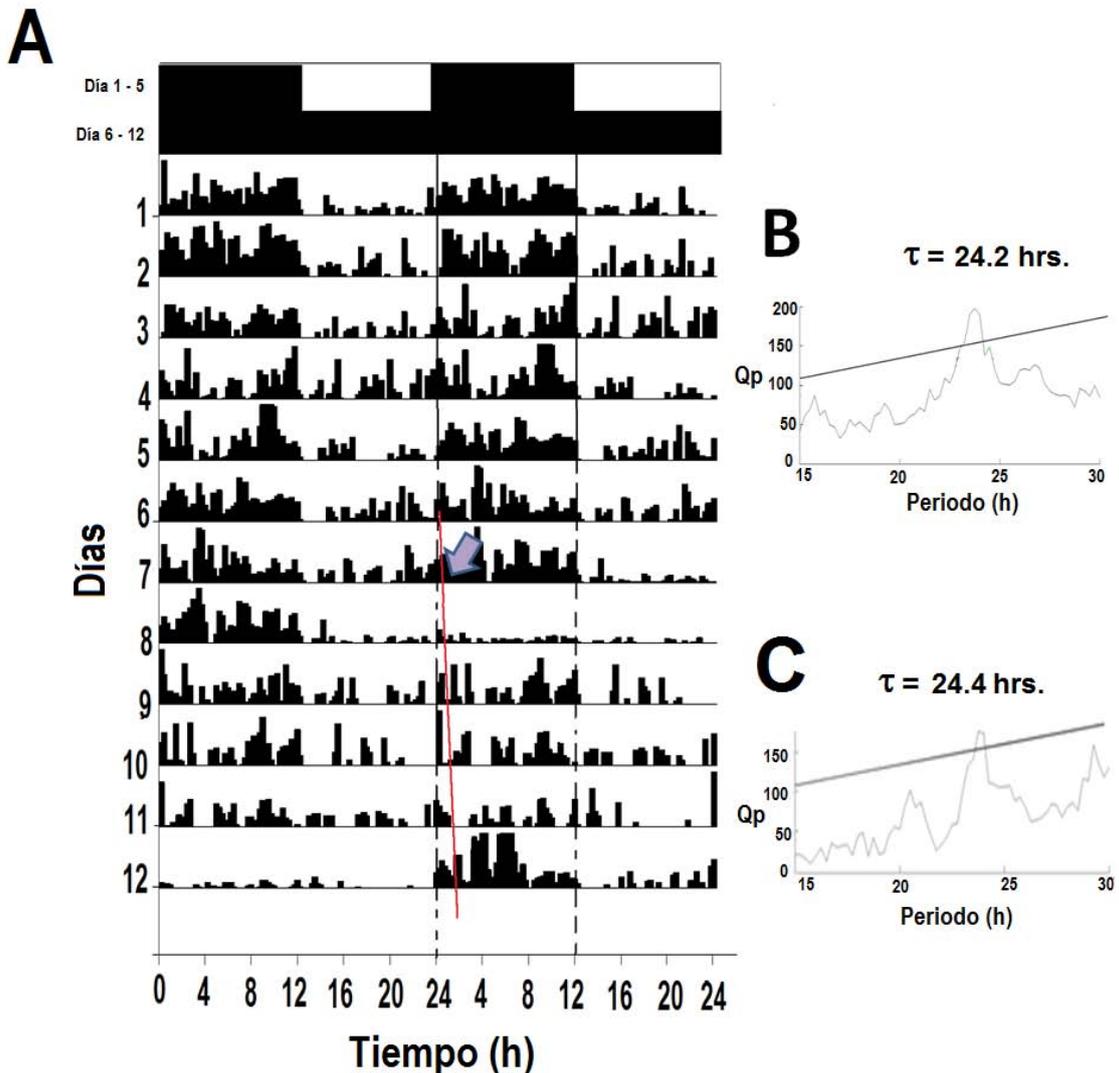


Figura 9. **A.** Actograma de doble gráfica mostrando los 5 primeros días de registro de actividad locomotora de un acocil *P. clarkii* en condiciones LD 12:12. La flecha indica un pulso de luz blanca administrado en el CT 13 en condiciones DD en el día 7. En el eje de las ordenadas se muestran los días de registro, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo de registro. La línea roja representa la línea de tendencia que se calculó para medir el cambio de fase. Un cambio de fase se hace evidente luego de la aplicación del pulso de luz ($\Delta\phi = -1.6$ h). **B.** Periodograma de χ^2 de los días control, donde se hace evidente la existencia de un periodo significativo de $\tau = 24.2$ h. **C.** Periodograma de χ^2 de los días experimentales, donde se hace evidente a existencia de un periodo significativo de $\tau = 24.4$ h. En ambos periodogramas de χ^2 se grafica en el eje de las ordenadas el valor de Qp (ver

definición en anexo), utilizando una significancia estadística de $P < 0.01$, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestra el valor del periodo en horas.

7.1.2. Registro de actividad locomotora de *P. clarkii* con el tratamiento de luz en el CT 10.

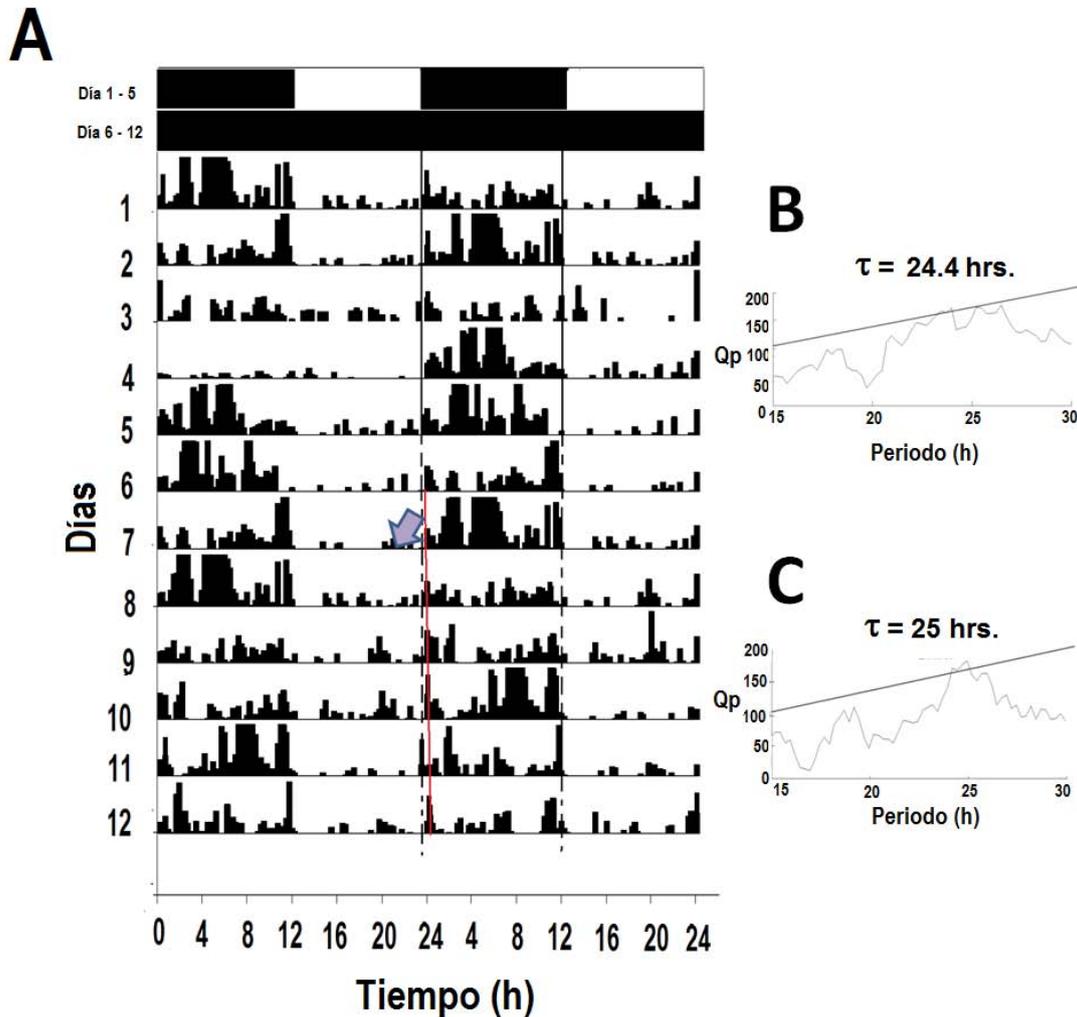


Figura 10. **A.** Actograma de doble gráfica mostrando los 5 primeros días de actividad locomotora de un acocil *P. clarkii* en condiciones LD 12:12. La flecha indica un pulso de luz administrado en el CT 10 en condiciones DD. En el eje de las ordenadas se muestran los días de registro, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo de registro. La línea roja representa la línea de tendencia que se calculó para medir el cambio de fase. El cambio de fase medido es prácticamente nulo, luego del pulso de luz ($\Delta\phi = -0.2$ h). **B.** Periodograma de χ^2 de los días control, donde se hace evidente la existencia de un periodo significativo de $\tau = 24.4$ h. **C.** Periodograma de χ^2 de los días experimentales, donde se muestran dos periodos significativos de $\tau = 24$ h y $\tau = 25$ h. En ambos periodogramas de χ^2 se grafica en el eje de las ordenadas el valor de Qp (ver definición en anexo), utilizando una significancia

estadística de $P < 0.01$, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestra el valor del periodo en horas.

7.1.3 Registro de actividad locomotora de *P. clarkii* con el tratamiento de luz en el CT 23.

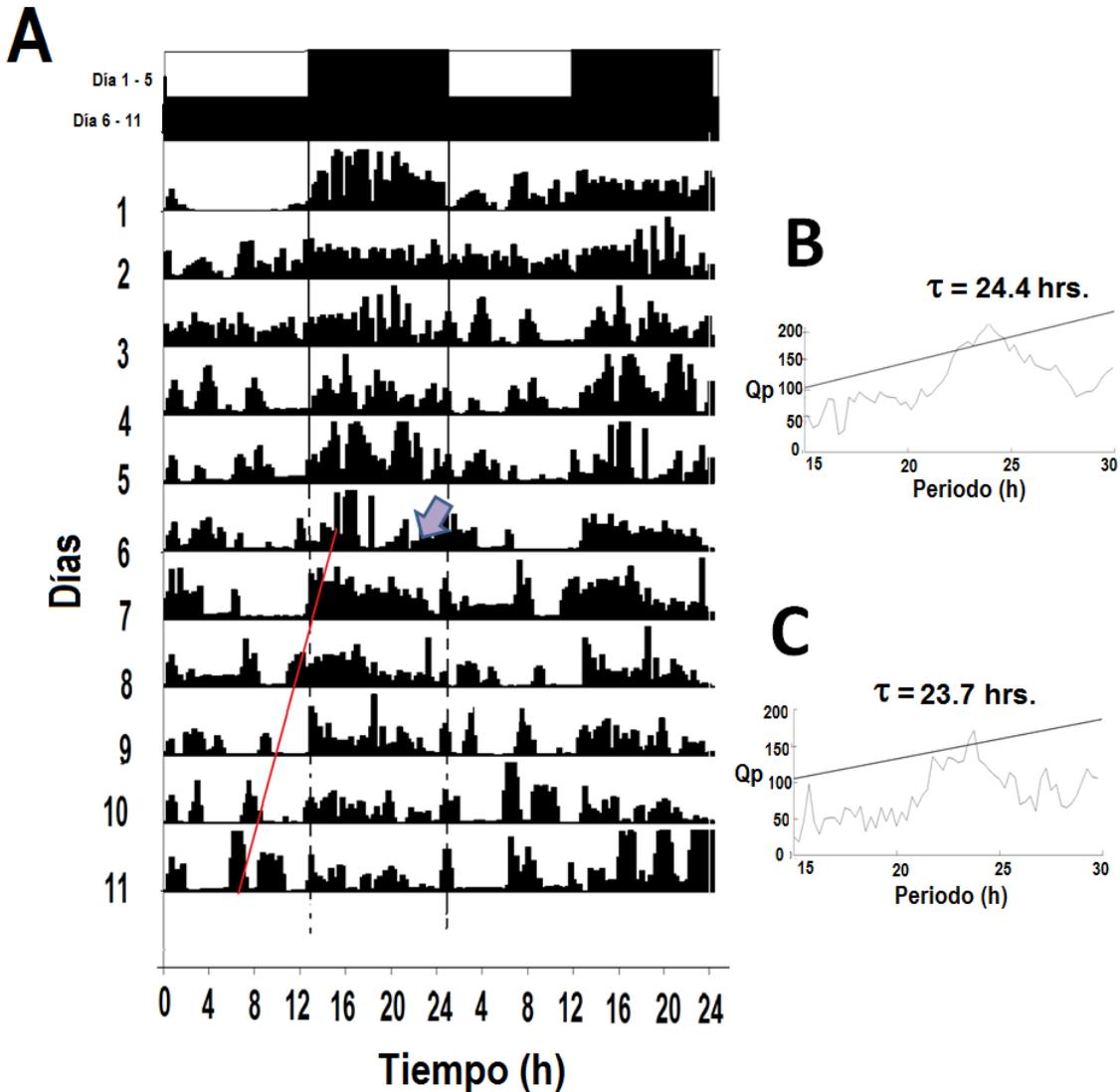


Figura 11. **A.** Actograma de doble gráfica mostrando los 5 primeros días de actividad locomotora de un acocil *P. clarkii* en condiciones LD 12:12. La flecha indica un pulso de luz administrado en el CT 23 en condiciones DD. En el eje de las ordenadas se muestran los días de registro, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo de registro. Un cambio de fase se hace evidente luego del pulso de luz ($\Delta\phi = +4.5 \text{ h}$). La línea roja representa la línea de tendencia que se calculó para medir el cambio de fase. **B.** Periodograma de χ^2 de los días control donde se hace evidente la existencia de dos periodos significativos de $\tau = 23.3 \text{ h}$ y $\tau = 24 \text{ h}$. **C.** Periodograma de χ^2 de los días experimentales, donde se hace evidente a existencia de un periodo significativo de $\tau = 23.7 \text{ h}$. En ambos periodogramas de χ^2 se grafica en el eje

de las ordenadas el valor de Q_p (ver definición en anexo), utilizando una significancia estadística de $P < 0.01$, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestra el valor del periodo en horas.

7.2. Experimentos con db-AMPC.

Los cambios de fase provocados por el tratamiento de db-AMPC en los registros de actividad locomotora se pueden apreciar en la figura 18 B. En promedio, el pulso de db-AMPC aplicado en el CT 13 provocó atrasos de fase de $\Delta\phi = 2.4$ h. En la figura 12 se puede ver reflejado el efecto de un pulso de luz en el CT 13 sobre la fase de un registro de actividad locomotora representativo ($\Delta\phi = -2.5$ h). En la parte control se muestra $\tau = 24.2$ h, y en la parte experimental: $\tau = 21$ h y $\tau = 24.4$ h. Como se observa en la figura 18 B, la aplicación del pulso de db-AMPC en el CT 10, provocó en todos los registros de actividad locomotora cambios de fase promedio de $\Delta\phi = -0.16$ h. En la figura 13, se muestra un registro de actividad locomotora representativo, donde, al aplicar el pulso de luz, se provocó un cambio de fase de $\Delta\phi = 1$ h, presentando en la parte control un valor de $\tau = 24.7$ h, en el aparte experimental $\tau = 24.7$ h. En los registros de actividad locomotora en donde se aplicó el pulso de db-AMPC en el CT 23, se observaron cambios de fase promedio de $\Delta\phi = 2.8$ h (figura 18 B). En la figura 14 se muestra un registro de actividad locomotora representativo, en donde el pulso de luz provocó un adelanto de fase de $\Delta\phi = 3.6$ h, con un valor de $\tau = 24.2$ h en la parte control y un valor de $\tau = 21.3$ h en la parte experimental. Los cambios promedio de los periodos en todos los registros de actividad locomotora con el tratamiento de db-AMPC en todos los CT se aprecia en la figura 19 B y tabla 1. Entre las medias de los periodos controles y experimentales no se observaron diferencias significativas (figura 19 B) al aplicar la prueba estadística de t de Student.

7.2.1. Registro de actividad locomotora de *P. clarkii* con el tratamiento de db-AMPC en el CT 13.

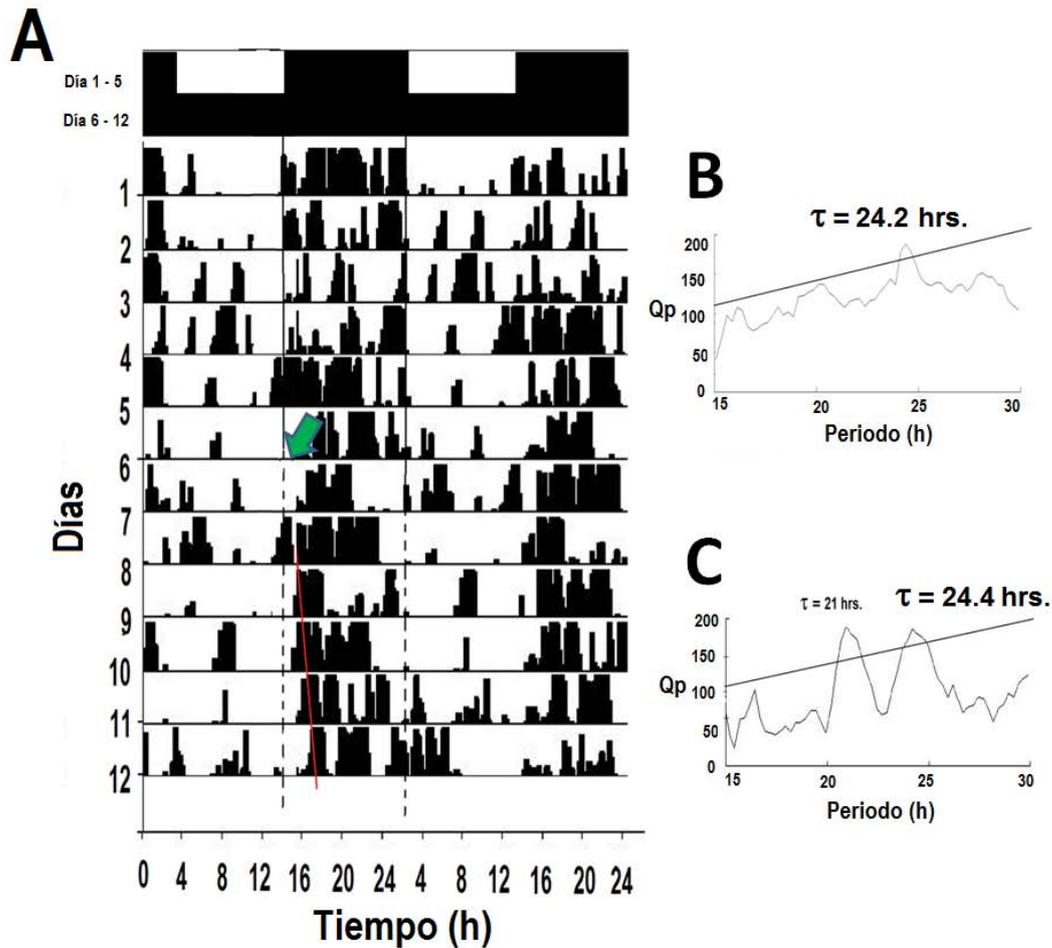


Figura 12. **A.** Actograma de doble gráfica mostrando los 5 primeros días de actividad locomotora de un acocil *P. clarkii* en condiciones LD 12:12. La flecha indica una inyección de db-AMPC en un tallo ocular del acocil en el CT 13, en condiciones DD. En el eje de las ordenadas se muestran los días de registro, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo de registro. Un cambio de fase se hace evidente luego del pulso de luz ($\Delta\phi = -2.5$ h). La línea roja representa la línea de tendencia que se calculó para medir el cambio de fase. **B.** Periodograma de χ^2 de los días control, donde se hace evidente a existencia de un periodo significativo de $\tau = 24.2$ h. **C.** Periodograma de χ^2 de los días experimentales, donde se hace evidente a existencia de dos periodos significativos de $\tau = 21$ h y $\tau = 24.4$ h. En ambos periodogramas de χ^2 se grafica en el eje de las ordenadas el valor de Qp (ver definición en anexo),

utilizando una significancia estadística de $P < 0.01$, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestra el valor del periodo en horas.

7.2.2 Registro de actividad locomotora de *P. clarkii* con el tratamiento de db-AMPC en el CT 10.

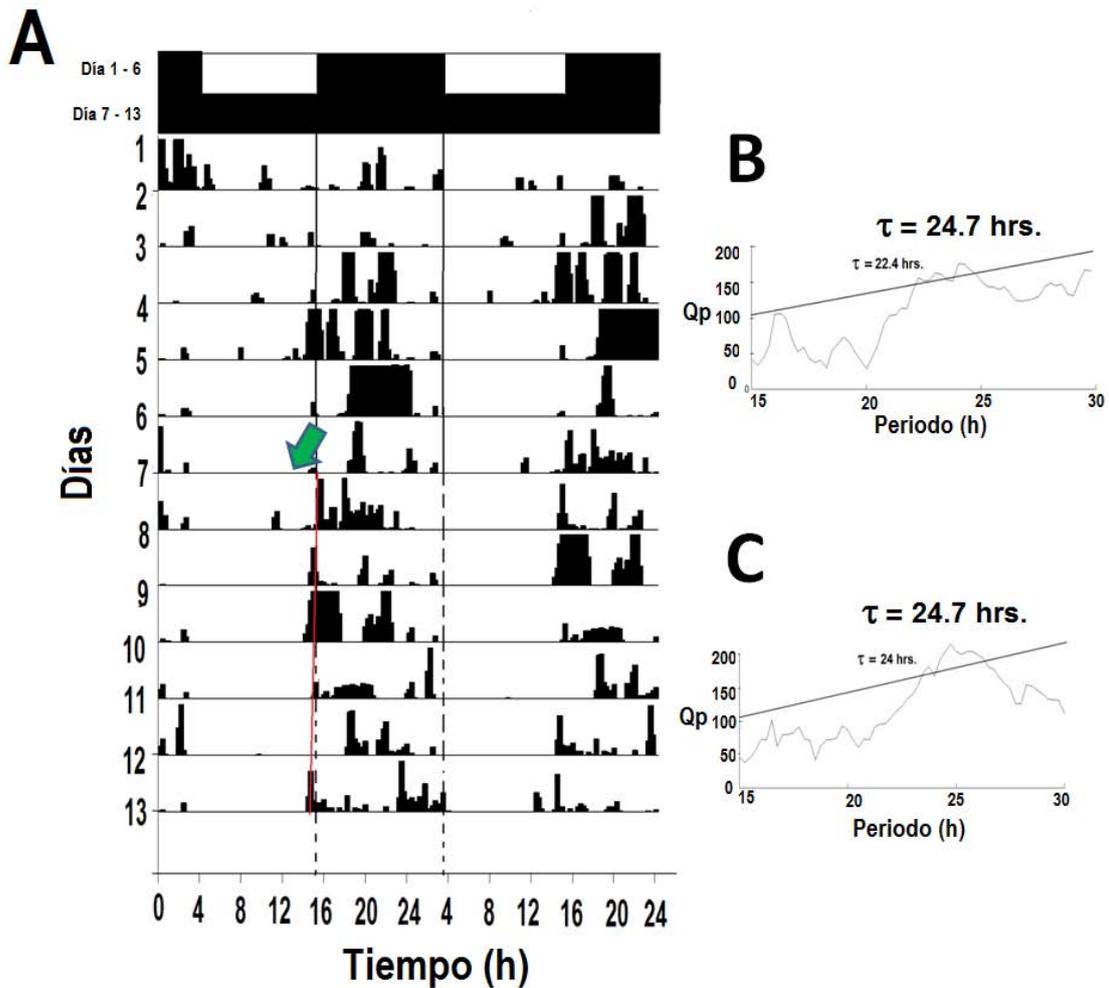


Figura 13. **A.** Actograma de doble gráfica mostrando los 5 primeros días de actividad locomotora de un acicil *P. clarkii* en condiciones LD 12:12. La flecha indica una inyección de db-AMPC en un tallo ocular del acicil en el CT 10, en condiciones DD. En el eje de las ordenadas se muestran los días de registro, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo de registro. La línea roja representa la línea de tendencia que se calculó para medir el cambio de fase. Luego aplicar el pulso de luz se tiene $\Delta\phi = +1$ h. **B.** Periodograma de χ^2 de los días control, donde se hace evidente a existencia de tres periodos significativos de $\tau = 22.4$ horas, $\tau = 22.6$ h y $\tau = 24.7$ h. **C.** Periodograma de χ^2 de los días experimentales, donde se hace evidente a existencia de tres periodos significativos de $\tau = 24$ h y $\tau = 24.7$ h. En ambos periodogramas de χ^2 se grafica en el eje de las ordenadas el valor de Qp (ver definición en anexo), utilizando una significancia estadística de $P < 0.01$,

mientras que, en el eje de las abscisas, se muestra el valor del periodo en horas.

7.2.3 Registro de actividad locomotora de *P. clarkii* con el tratamiento de db-AMPC en el CT 23.

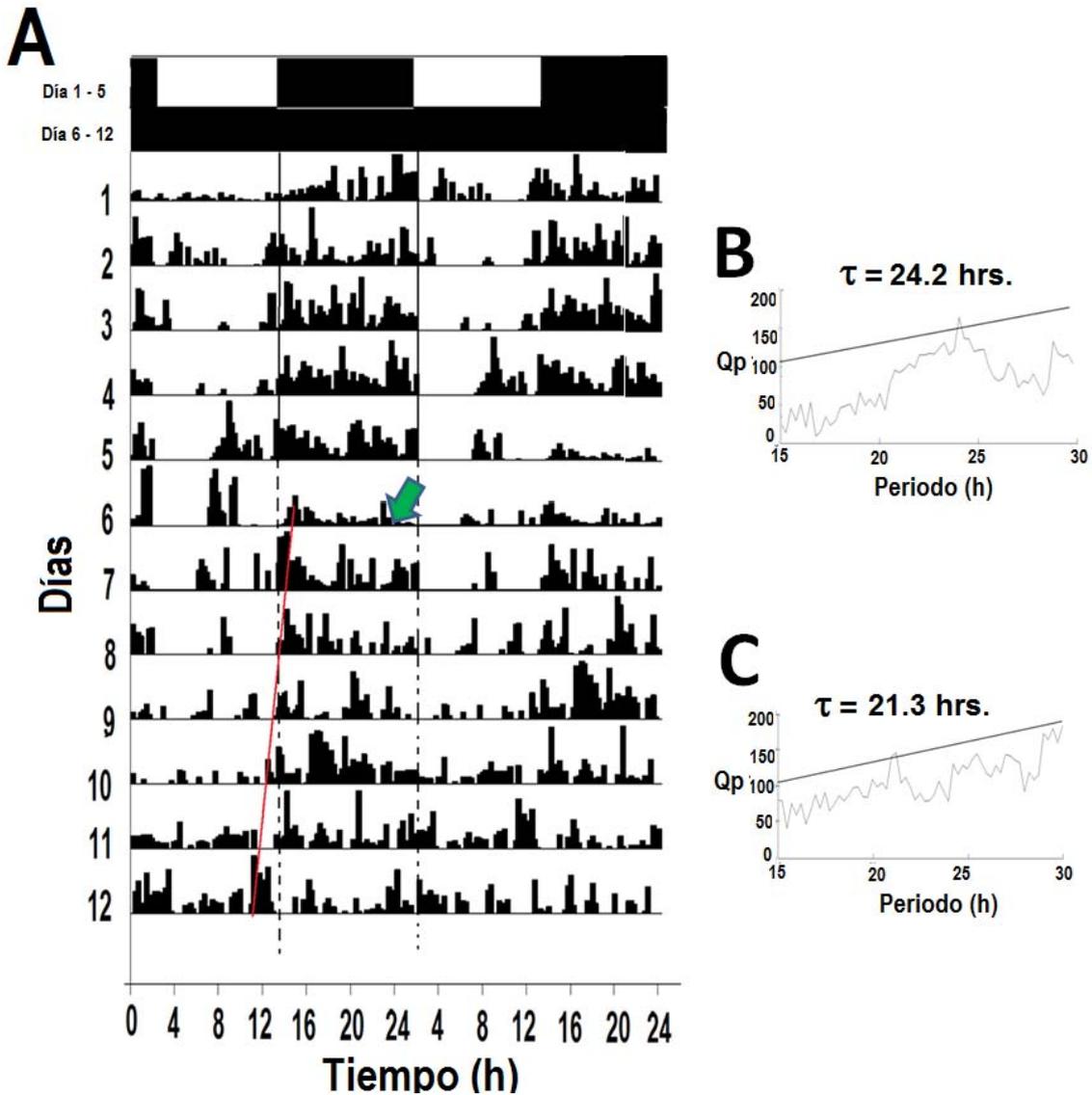


Figura 14. **A.** Actograma de doble gráfica mostrando los 5 primeros días de actividad locomotora de un acocil *P. clarkii* en condiciones LD 12:12. La flecha indica una inyección de db-AMPC en un tallo ocular del acocil en el CT 23 en condiciones DD. En el eje de las ordenadas se muestran los días de registro, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo de registro. La línea roja representa la línea de tendencia que se calculó para medir el cambio de fase. Luego del pulso de luz se tiene $\Delta\phi = +3.6$ h. **B.** Periodograma de χ^2 de los días control, donde se hace evidente la existencia un periodo significativo de $\tau = 24$ h. **C.** Periodograma de χ^2 de los días experimentales, donde se hace evidente la existencia un periodo significativo de $\tau = 21$ h. En ambos periodogramas de χ^2 se grafica en el eje de las ordenadas el valor de

Qp (ver definición en anexo), utilizando una significancia estadística de $P < 0.01$, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestra el valor del periodo en horas.

7.3. Experimentos con H89+luz.

Los cambios de fase provocados por el tratamiento de H89+luz en los registros de actividad locomotora se pueden apreciar en la figura 18 C. En promedio, el pulso de H89+luz aplicado en el CT 13 provocó atrasos de fase de $\Delta\phi = 2$ h, únicamente en 1 registro, ya que, en el resto de animales utilizados, no se provocaron cambios de fase. En la figura 15, se observa que el efecto de un pulso de H89+luz en el CT 13 no provocó ningún efecto sobre la fase de un registro de actividad locomotora representativo. En la parte control se muestra $\tau = 24.4$ h, y en la parte experimental no se presentaron periodos significativos. Como se observa en la figura 18 C, la aplicación del pulso de H89+luz en el CT 10, provocó en todos los registros de actividad locomotora un cambio de fase promedio de $\Delta\phi = -0.2$ h, únicamente en 2 registros. En la figura 16, se muestra un registro de actividad locomotora representativo, donde, al aplicar el pulso de H89+luz, no se provocó ningún cambio de fase, presentando en la parte control un valor de $\tau = 24.1$ h, así mismo, en la parte experimental no se presentó ningún periodo significativo. En los registros de actividad locomotora en donde se aplicó el pulso de H89+luz en el CT 23, en ningún registro se provocaron cambios de fase (figura 18 C). En la figura 17 se muestra un registro de actividad locomotora representativo, en donde el pulso de H89+luz no provocó cambios de fase, presentando un valor de $\tau = 24.2$ h en la parte control del registro, mientras que en la parte experimental no se presentó un periodo significativo. Los cambios promedio de los periodos en todos los registros de actividad locomotora con el tratamiento de H89+luz en todos los CT se aprecia en la figura 19 C y Tabla 1. Entre las medias de los periodos controles y experimentales no se observaron diferencias significativas en los tres únicos registros en que se presentaron periodos significativos luego de la aplicación del tratamiento experimental (figura 19 C) al aplicar la prueba estadística de t de Student. Sin embargo, es notorio el efecto del tratamiento al observar que prácticamente todos los registros de actividad locomotora se tornaron arrítmicos.

7.3.1. Registro de actividad locomotora de *P. clarkii* con el tratamiento de H89 + Luz en el CT 13.

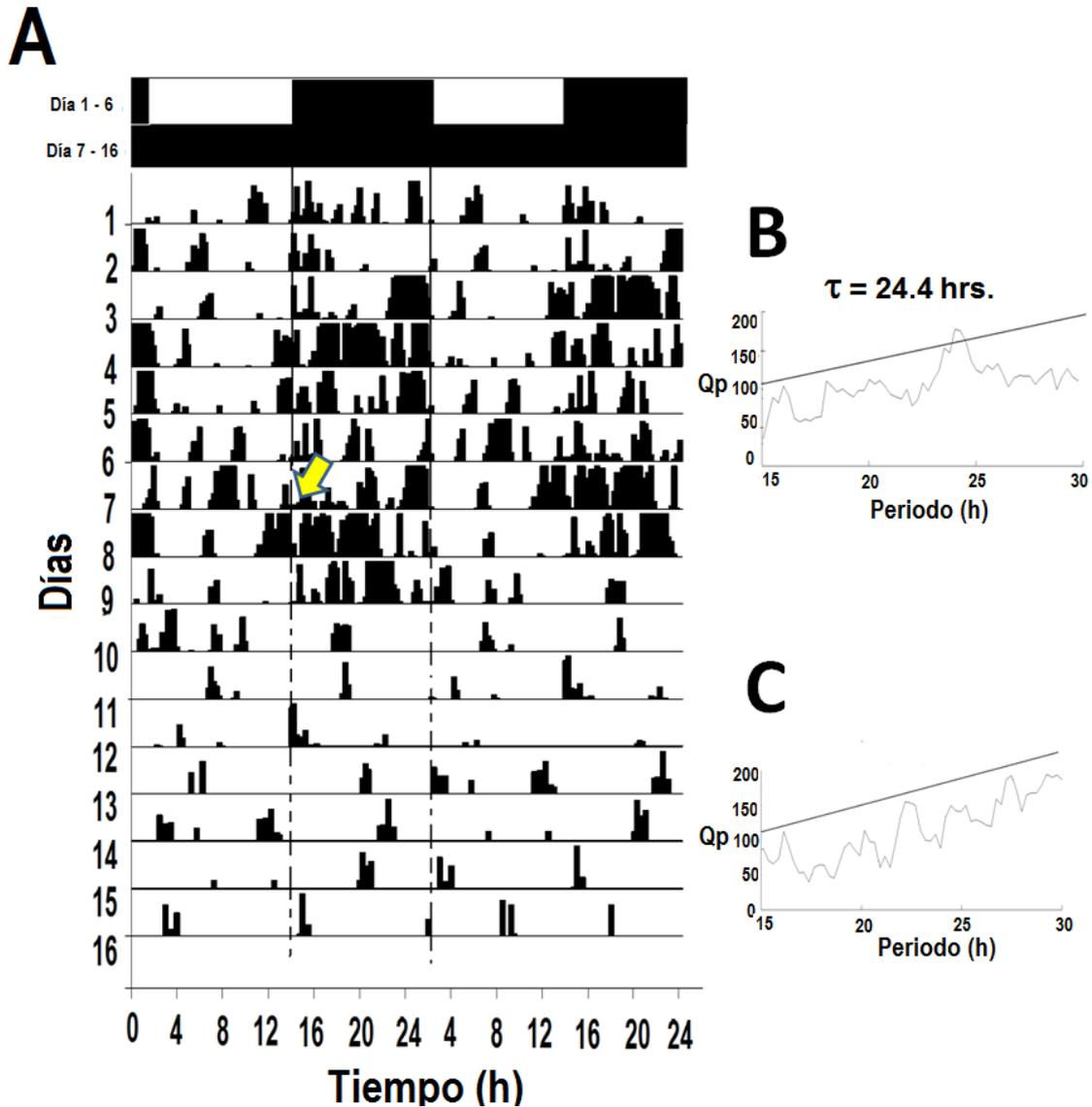


Figura 15. **A.** Actograma de doble gráfica mostrando los 5 primeros días de actividad locomotora de un acocil *P. clarkii* en condiciones LD 12:12. La flecha indica una inyección de H89 en un tallo ocular del acocil con una posterior exposición de luz por 1 hora. El pulso H89 + luz se administró en el CT 13 en condiciones DD. En el eje de las ordenadas se muestran los días de registro, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo de registro. No existe algún cambio de fase luego de la administración del tratamiento experimental. **B.** Periodograma de χ^2 de los días control, donde se hace evidente la existencia un periodo significativo de $\tau = 24.4$ h. **C.** Periodograma de χ^2 de los días experimentales, donde no existe algún periodo significativo. En ambos periodogramas de χ^2 se grafica en el eje de las ordenadas el valor

de Q_p (ver definición en anexo), utilizando una significancia estadística de $P < 0.01$, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestra el valor del periodo en horas.

7.3.2. Registro de actividad locomotora de *P. clarkii* con el tratamiento de H89 + Luz en el CT 10.

A

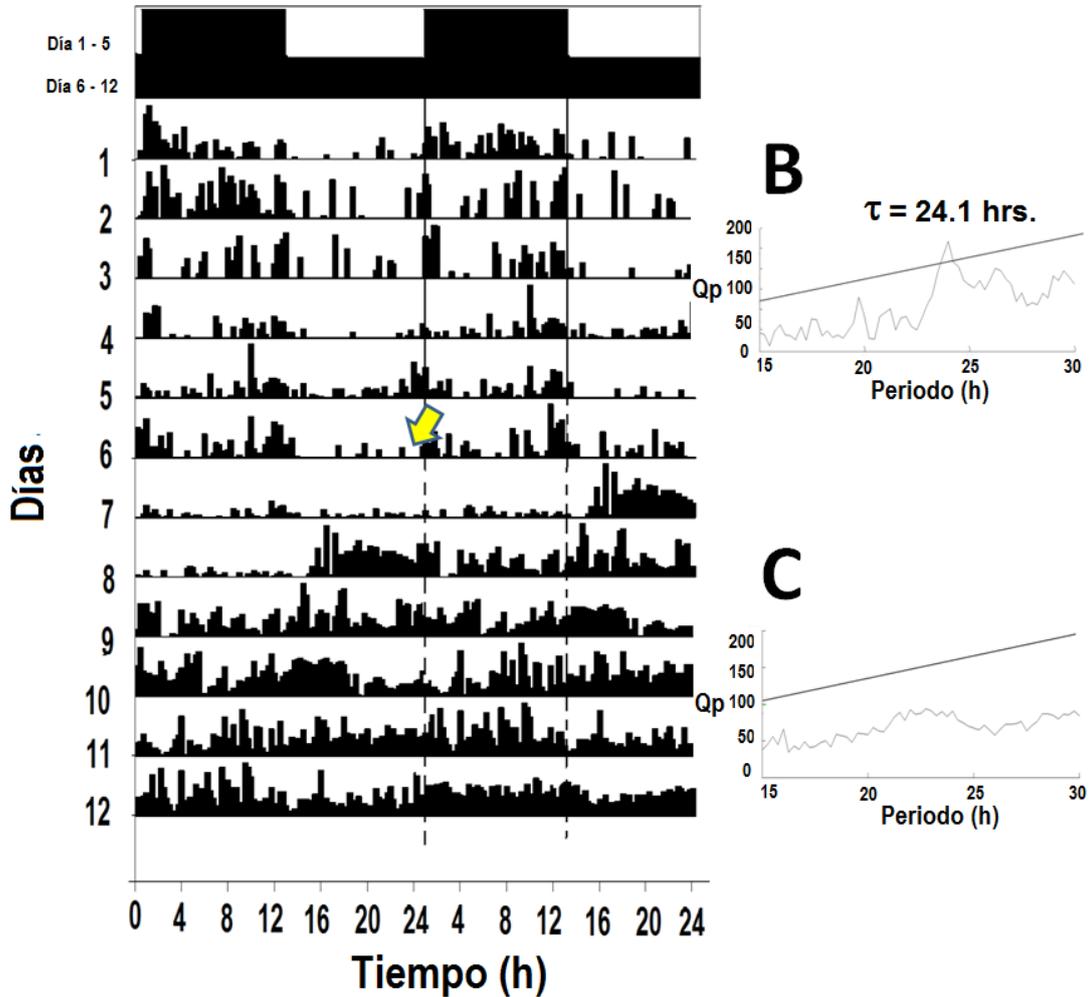


Figura 16. **A.** Actograma de doble gráfica mostrando los 5 primeros días de actividad locomotora de un acocil *P. clarkii* en condiciones LD 12:12. La flecha indica una inyección de H89 en un tallo ocular del acocil con una posterior exposición de luz por 1 hora. El pulso H89 + luz se administró en el CT 10, en condiciones DD. En el eje de las ordenadas se muestran los días de registro, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo de registro. No existe algún cambio de fase luego de la administración del tratamiento experimental. **B.** Periodograma de χ^2 de los días control, donde se hace evidente la existencia un periodo significativo de $\tau = 24.1$ h. **C.** Periodograma de χ^2 de los días experimentales, en donde no existe algún periodo significativo. En ambos periodogramas de χ^2 se grafica en el eje de las ordenadas el valor de Qp (ver definición en anexo), utilizando una significancia

estadística de $P < 0.01$, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestra el valor del periodo en horas.

7.3.3. Registro de actividad locomotora de *P. clarkii* con el tratamiento de H89 + Luz en el CT 23.

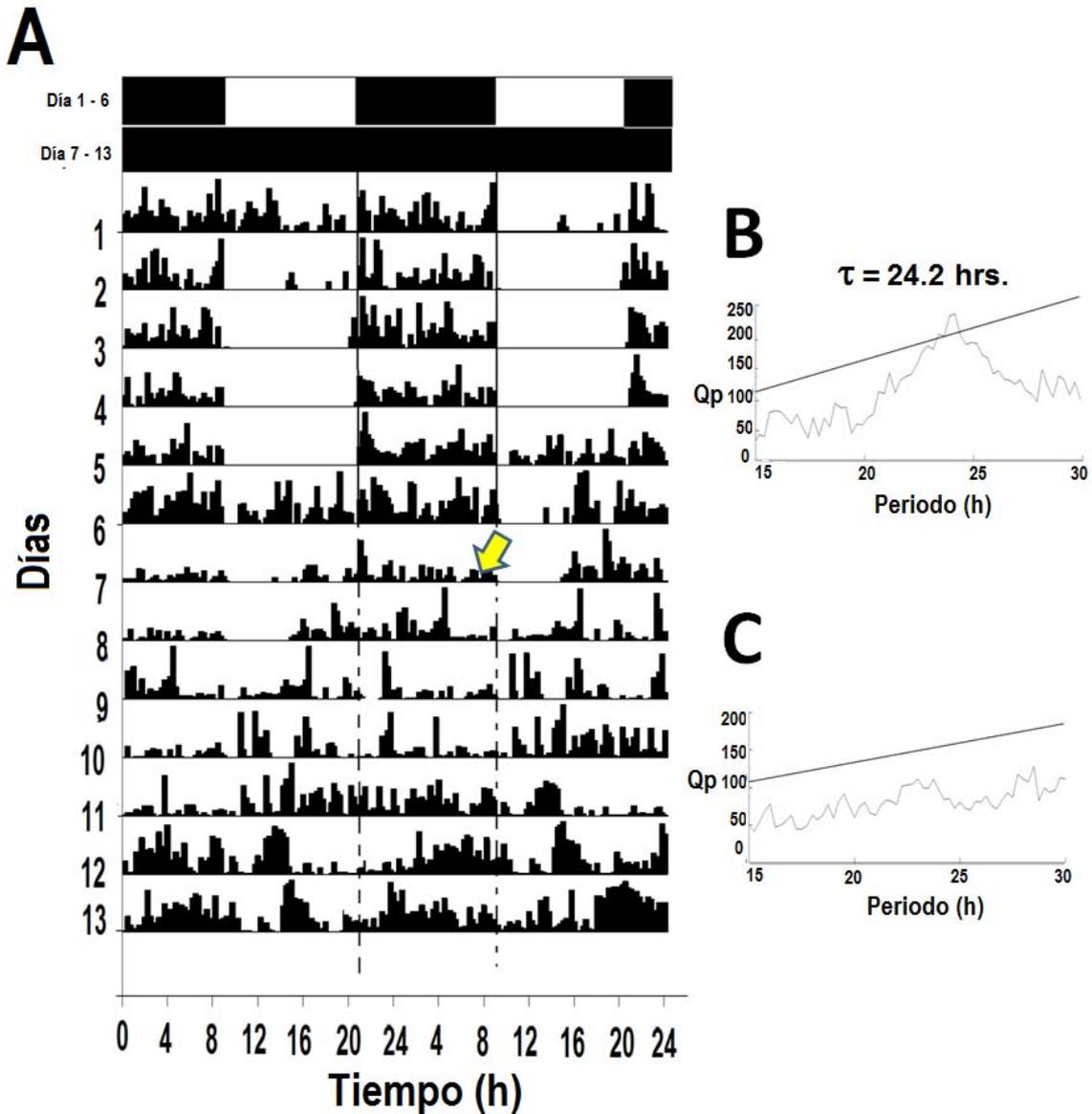


Figura 17. **A.** Actograma de doble gráfica mostrando los 5 primeros días de actividad locomotora de un acocil *P. clarkii* en condiciones LD 12:12. La flecha indica una inyección de H89 en un tallo ocular del acocil con una exposición de luz por 1 h. El pulso H89 + luz se administró en el CT 23 en condiciones DD. En el eje de las ordenadas se muestran los días de registro, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo de registro. No existe algún cambio de fase luego de la administración del tratamiento experimental. **B.** Periodograma de χ^2 de los días control, donde se hace evidente la existencia un periodo significativo de $\tau = 24.2$ h. **C.** Periodograma de χ^2 de los días experimentales, en donde no existe algún periodo significativo. En ambos

periodogramas de χ^2 se grafica en el eje de las ordenadas el valor de Q_p (ver definición en anexo) utilizando una significancia estadística de $P < 0.01$, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestra el valor del periodo en horas.

7.4. Curvas de respuesta de fase por cada tratamiento experimental.

Los tratamientos de luz (figura 18 A) aplicados en el CT 13 se provocaron un promedio de atrasos de fase de 2.4 h, mientras que en el CT 10, la aplicación del pulso de luz provocó atrasos de fase promedio de 0.16 h; en el caso de la aplicación de luz en el CT 23 se presentaron adelantos de fase promedio de 2.8 h. El tratamiento con db-AMPC (ver figura 18 B) provocó en el CT 13 un promedio de atrasos de fase de 2.26 h, mientras que la aplicación del fármaco en el CT 10 provocó un promedio de 0.6 h de atraso de fase; en el CT 23, la aplicación de db-AMPC causó un promedio de 3.2 h de adelanto de fase. Los tratamientos experimentales de luz y db-AMPC (Figura 18 A, B) provocaron curvas de respuesta de fase similares. En el caso de los tratamientos con H89+luz, se construyó la CRF (ver figura 18 C) en base a una $N = 3$, ya que esa cantidad de registros mostró un cambio de fase luego de la aplicación del tratamiento significativo. Ver figura 18.

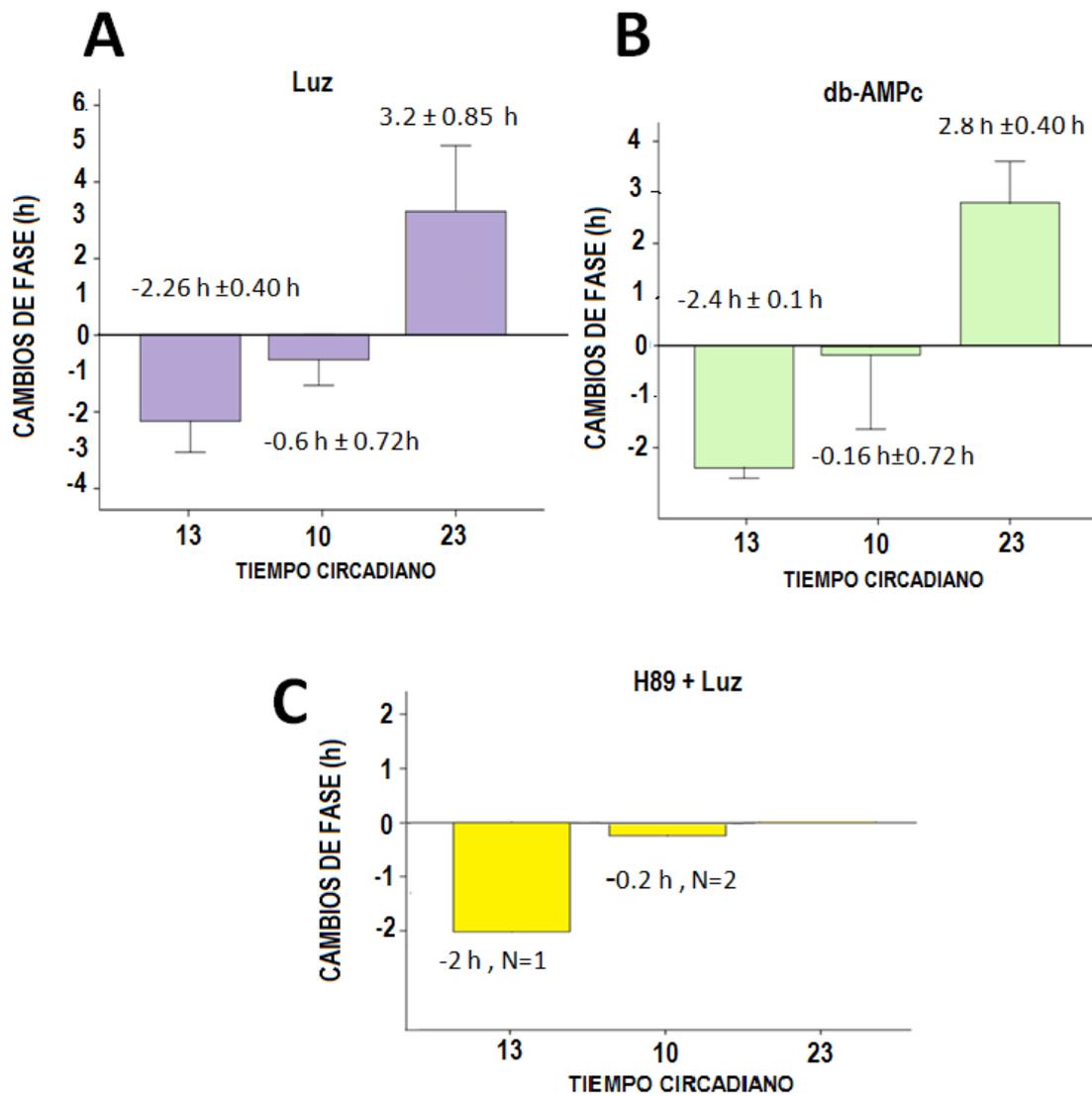


Figura 18. CRF de todos los tratamientos experimentales que se aplicaron en los registros de actividad locomotora. En todos los gráficos, en el eje de las ordenadas se muestran los adelantos de fase con números positivos, y los atrasos de fase con números negativos. En el eje de las abscisas, se muestran los tres tiempos circadianos en los que se aplicaron los tratamientos experimentales. **A.** CRF de los tratamientos con luz. CT 13, N=5; CT 10, N=5; CT 23, N=5. **B.** CRF de los tratamientos de db-AMPc. CT 13, N= 5; CT 10, N= 5; CT 23, N= 5. **C.** CRF de los tratamientos de H89+luz: CT 13, N=1; CT 10, N=2.

Tabla 1. Medias de los cambios de fase provocados en la aplicación de cada tratamiento experimental en los diferentes tiempos circadianos.

Tratamiento experimental	$\Delta\phi$ CT 13	$\Delta\phi$ CT 10	$\Delta\phi$ CT 23
Luz	$\Delta\phi = -2.26$, SE ± 0.40 h	$\Delta\phi = -0.6$, SE ± 0.72 h	$\Delta\phi = 3.2$, SE ± 0.85 h
db-AMPC	$\Delta\phi = 2.4$, SE ± 0.1 h	$\Delta\phi = 0.16$, SE ± 0.72 h	$\Delta\phi = 2.8$, SE ± 0.40 h
H89+luz	$\Delta\phi = -2$ h	$\Delta\phi = -0.2$ h	-----

7.5. Análisis estadístico con prueba de t de Student entre las medias de los periodos por cada tratamiento experimental.

Al realizar el análisis estadístico de los diferentes tratamientos experimentales a través de una prueba de t de Student entre las medias de los periodos de controles y experimentales, se observó que, en el caso del tratamiento con luz, las medias de los periodos controles no presentaron diferencias significativas comparándolos con las medias de los periodos de las partes experimentales de los registros de actividad locomotora. En la figura 19 A se muestra que los registros controles alcanzaron una media de $\bar{x}= 24.21$ h, mientras que la media de los periodos de las partes experimentales con luz es de $\bar{x}= 22.94$ h. En la figura 19 B, se muestra que no existieron diferencias significativas entre las medias de los periodos de controles y experimentales en los registros de actividad locomotora a los que se les aplicó db-AMPC. La media de los periodos de las partes control de los registros es de $\bar{x}= 23.72$ h, mientras que la media de los periodos tratados con db-AMPC es de $\bar{x}= 23.38$ h. En la figura 19 C se observa que entre las medias de los periodos de los registros de actividad locomotora que se trataron con H89+luz no se presentaron diferencias significativas. Este análisis se realizó tomando en cuenta las medias de los periodos de los controles en el lote de animales tratados con H89+luz ($\bar{x}= 23.31$ h) y la media de los periodos de los 3 animales que presentaron periodos significativos al aplicar el tratamiento experimental ($\bar{x}=23$ h). Es importante notar que el tratamiento de H89 + luz indujo arritmias en el ritmo de actividad locomotora en la mayoría de los animales.

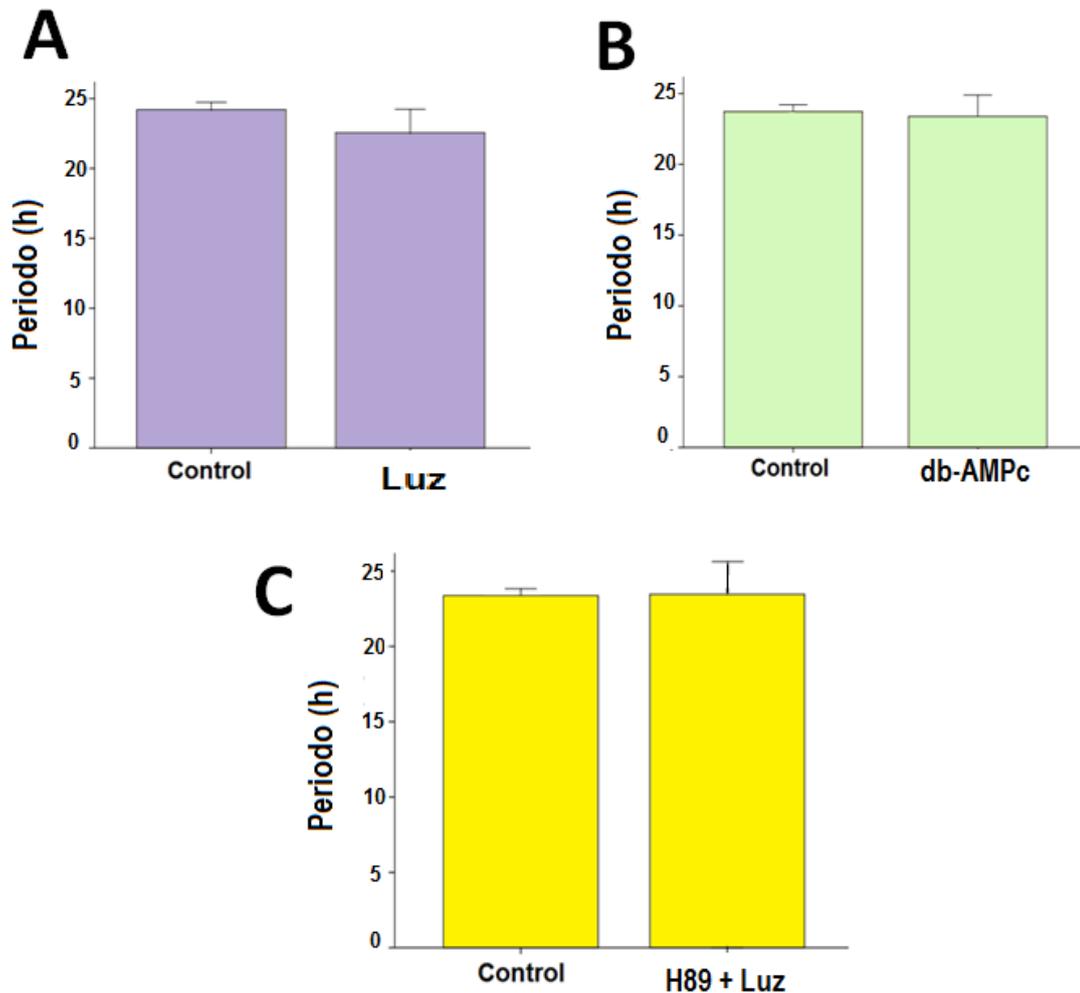


Figura 19. Prueba de t de Student entre las medias de los periodos controles y experimentales por cada tratamiento aplicado en los registros de actividad locomotora de los acociles. En el eje de las ordenadas se muestran los valores de la media de los periodos en horas, mientras que, en el eje de las abscisas, se muestran las partes controles y experimentales de acuerdo al tratamiento que se analizó. **A.** Prueba de t de Student mostrando que no existen diferencias significativas entre las medias de los periodos de los controles y los tratamientos de luz, $P > 0.01$. **B.** Prueba de t de Student mostrando que no existen diferencias significativas entre las medias de los periodos de los controles y los tratamientos de db-AMPC, $P > 0.01$. **C.** Prueba de t de Student mostrando que no existen diferencias significativas entre las medias de los periodos de los controles y los tratamientos de H89 + luz, $P > 0.01$, (se tomaron en cuenta únicamente los 3 animales que presentaron periodos significativos en la media de los periodos de H89+ luz).

Tabla 2. Medias de los periodos (τ) de las partes controles y experimentales de los registros de actividad locomotora por cada tratamiento experimental.

Tratamiento experimental	Media periodos Controles	Media periodos experimentales
Luz	24.21 h, SE \pm 0.25 h	22.94, SE \pm 0.68 h
db-AMPC	23.72h, SE \pm 0.23 h	23.38 h, SE \pm 0.75 h
H89+luz	23.31 h, SE \pm 0.39 h	23 h, SE \pm 1.52 h

8. Discusión.

8.1.-Efecto de los pulsos de luz y la aplicación de db-AMPC sobre las fases de los ritmos de actividad locomotora de *P. clarkii*.

Las CRF's de luz y db-AMPC obtenidas en este trabajo apoyan la hipótesis de que la vía CREB-CRE participa como inductor principal en la sincronización del ritmo de locomoción del acocil *P. clarkii*. Estudios previos como el de Viccon-Pale y Fuentes-Pardo (1994), Bernal-Moreno et al. (1996), Fuentes-Pardo y Fanjul-Moles (1992), brindan un soporte a los resultados obtenidos de la CRF de luz y db-AMPC (ver figura 18 y tabla 1) presentados en esta tesis, siendo similares los patrones de las CRF's realizadas en los trabajos antes citados en *P. clarkii*, con atrasos de fase en la noche subjetiva temprana, adelantos de fase en la noche subjetiva tardía y cambios de fase casi nulos en el día subjetivo. A pesar de las diferencias anatómicas que existen entre invertebrados y vertebrados, existen evidencias de CRF's en mamíferos que coinciden con los resultados de este trabajo. Boyoung y Aiqing (2010) analizaron el efecto de la sincronización por luz en la actividad locomotora de ratones, obteniendo cambios de fase y valores de los periodos similares a los provocados por los tratamientos de AMPC que se obtuvieron en esta tesis. Al aplicar un pulso de luz en el tiempo circadiano 15, obtuvieron atrasos de fase en los ritmos de actividad locomotora de ratones (alrededor de 2.5 horas en promedio), mientras que en los resultados de este trabajo en relación a los tratamientos aplicados con db-AMPC en el CT 13, se observaron atrasos de fase alrededor de 2.26 horas y en los tratamientos con luz aplicados en el CT 13, se observaron atrasos de fase promedio de 3.2 horas (véase figura 18 y tabla 1). Lo anterior muestra que la luz y el db-AMPC tienen efectos similares a los hallazgos conocidos sobre la sincronización de actividad locomotora tanto en invertebrados como en mamíferos.

Para comparar CRF's de actividad locomotora y otros ritmos circadianos, se puede citar el trabajo de Prosser y Gillette (1989), en el cual se midió la sincronización por un análogo de AMPC (Monofosfato de adenosina cíclico 8-Bencilamino, BA-AMPC, 10 μ M) sobre el ritmo de actividad eléctrica del núcleo supraquiasmático. En esta tesis se puede apreciar que al aplicar el análogo de AMPC en el día subjetivo del ritmo (CT 10), no se obtuvieron cambios de fase significativos, difiriendo con el estudio de Prosser y Gillette (1989), ya que al aplicar BA-AMPC, desde el CT 3 al CT 13, se presentaron adelantos de fase promedio de 1 hora, notándose también contrastes con esta tesis respecto a la aplicación del fármaco en la noche subjetiva temprana (CT 13), donde se

obtuvieron atrasos de fase promedio de -2.4 horas. Respecto al CT 23, Prosser y Gillette obtuvieron atrasos de fase promedio de -0.5 horas, mientras que en esta tesis se obtuvieron adelantos de fase promedio de 2.8 horas (ver figura 18 A-B, y tabla 1). Por la anterior comparación de resultados, se puede apreciar que en el núcleo supraquiasmático se obtiene una CRF espejo respecto a la CRF obtenida en actividad locomotora de *P. clarkii* al aplicar db-AMPC o luz.

En el trabajo de Harrington et al. (1999) se comprueba que el péptido pituitario activador de la adenilato ciclasa provoca cambios de fase similares a los que provoca la luz en el ritmo de actividad eléctrica de neuronas del núcleo supraquiasmático en hamsters, en contraste con el estudio de Prosser y Gillette (1989), usando un análogo de AMPc, obteniendo una CRF espejo, haciendo evidente las diferencias entre el sistema circadiano de crustáceos y el sistema circadiano de mamíferos en diferentes estructuras anatómicas.

8.2.-Efectos del H89+ luz sobre las fases del ritmo de actividad locomotora de *P. clarkii*.

Los resultados obtenidos con los tratamientos de H89+luz brindan un soporte importante a la hipótesis planteada en este trabajo. En el caso de los tratamientos con H89+luz, únicamente tres animales presentaron periodos significativos luego de la aplicación del tratamiento. De los tres registros que presentaron cambios de fase al aplicar el tratamiento, dos de ellos se aplicaron en el CT 10 y el restante se aplicó en el CT 13, (ver figura 18 C y tabla 1). Para analizar los anteriores resultados, es necesario tener en cuenta el proceso de integración de los fármacos inyectados en el tallo ocular de cada animal utilizado; tal proceso podría estar regulado principalmente por los fotorreceptores extrarretinianos y extracaudales, en los cuales, al recibir un pulso de luz se induciría hipotéticamente la vía de fototransducción que haría posible la activación de la vía CREB-CRE. En el caso de la luz (desde la retina) se activaría la proteína transmembranal rodopsina a través de un fotón. La rodopsina activa a la proteína G y por ende a la enzima adenilato ciclasa, activando finalmente a la vía CREB-CRE. El otro modo por el cual la vía CREB-CRE se activaría, es a través del fármaco db-AMPC, anclándose directamente a un receptor transmembranal NMDA (N-metil-D-aspartato) o bien, uniéndose a una proteína G. En estudios previamente realizados en el ritmo ERG en tallos oculares aislados de *P. clarkii* a los que se les aplicó H89 *in vitro*, se presentaron ritmos ultradianos o arritmias (Martínez, 2013), así mismo, para la realización de este trabajo, se realizaron experimentos no reportados en ERG aplicando H89 (ver título 8.3), donde se provocaron efectos similares al trabajo antes citado. Debido a que no existen otros trabajos en acociles donde se

analicen los efectos del bloqueo de la PKA sobre un ritmo circadiano, se tiene como soporte efecto del bloqueo de la PKA en un ritmo circadiano de mamíferos (Mayer-Spasche et al., 2002), donde se midió el efecto sincronizador del neuropéptido neurotensina (NT) sobre el ritmo circadiano de la actividad neuronal en el núcleo supraquiasmático de rata, aplicando al mismo tiempo dos inhibidores de la PKA (U-73122 y KT5720). El bloqueo de la PKA no provocó cambios en la magnitud de la fase del ritmo al aplicar NT. En contraste con los resultados obtenidos en este proyecto, el NT parece ser un elemento sincronizador más potente que la luz.

Los datos obtenidos en este trabajo son innovadores, ya que no existen otros estudios realizados en acociles en los que se analicen los efectos del bloqueo de la PKA sobre la sincronización del ritmo de actividad locomotora. En los resultados obtenidos al aplicar el tratamiento experimental de H89+Luz, se observaron (en la mayoría de los registros de actividad locomotora) arritmias, teniendo como prueba el análisis de periodograma χ^2 , ya que los periodos carecieron de significancia. Lo anterior es interesante, ya que, a pesar de haber aplicado un pulso de luz, la cascada de señalización CREB-CRE aparentemente se inhibe totalmente. Otra posible explicación a las arritmias provocadas por el H89+luz se podría resguardar en el trabajo de Barrera y Block (1990), donde se demuestra que el flujo de información circadiana entre ambos lóbulos del protocerebro está interconectada, por lo que al momento de inyectar en el tallo ocular H89, el efecto es global en ambos lados del protocerebro, por lo que el ritmo de locomoción se torna arritmico al bloquear la PKA en el oscilador central.

Es bien sabido que una de las técnicas más usadas para medir el estrés provocado por la manipulación física de acociles es la frecuencia cardiaca. En el estudio de Udalova et, al., (2012), se comprueba que luego de la manipulación física del acocil *Pontastacus leptodactylus*, la tasa cardiaca del acocil no presenta cambios por 1 hora, por ende, no se causa un estrés significativo a los animales. Debido a la anterior referencia, se asumió que la manipulación física al momento de las inyecciones de los tratamientos experimentales no influyó en los cambios de fase del ritmo de actividad locomotora de los acociles ya que, al momento de las inyecciones, se manipularon a los animales de 1 a 3 minutos para ingresarlos nuevamente a los acuarios de registro de locomoción. Otro punto importante fue que, los tiempos límites para concluir esta tesis se debían cumplir, por lo que no se contó con más tiempo y recursos para realizar un mayor número de experimentos.

8.3.- Efecto del AMPc y H89 en otro ritmo de salida (ERG).

Es importante comparar los resultados obtenidos en este estudio con resultados de otros trabajos que utilizaron al mismo modelo animal, donde se analizan los efectos de los elementos que intervienen en la vía CREB CRE sobre otros ritmos de salida, como es el ritmo circadiano del ERG. Lo anterior brinda un soporte para analizar las diferencias presentes en la modulación e integración de los fármacos en los diferentes osciladores del sistema circadiano del acocil que intervienen, tanto en el ritmo de actividad locomotora y en el ritmo ERG. En la tesis de Martínez (2013) se aplicó el fármaco H89 en el tallo ocular de animales a los que se les registró el ritmo ERG; los controles con periodos circadianos cambiaron a periodos ultradianos, o en algunos casos, se presentaron arritmias. Los contrastes ente los efectos de uno de los elementos que participa en la vía CREB-CRE sobre el ritmo ERG y el ritmo de actividad locomotora reflejan una integración única de los fármacos entre ambos ritmos. Por un lado, se tiene a la retina y al tallo ocular como osciladores independientes haciendo posible la manifestación del ritmo ERG, mientras que en el ritmo de actividad locomotora se cuenta con el protocerebro y con los fotorreceptores extrarretinianos como principales osciladores del ritmo (Page y Larimer, 1972; Sullivan y Sandeman, 2009).

En los resultados de actividad locomotora, se observa que el periodo de los ritmos no cambia drásticamente como ocurre en el ritmo ERG al aplicar luz o db-AMPc. Al aislar retinas o tallos oculares, el ritmo ERG persiste (Arechiga y Rodriguez, 1998; Fuentes-Pardo, 1988; Martínez, 2013). Los diferentes procesos de integración de la información circadiana que se llevan a cabo en el tallo ocular-retina y, por otro lado, entre el tallo ocular-protocerebro-fotorreceptores extrarretinianos, pueden brindar una pista del porqué los periodos del ritmo ERG cambian significativamente, y no lo hacen los periodos del ritmo de actividad locomotora al aplicar luz o db-AMPc. Otro punto relevante es el hecho de que en el tallo ocular aislado se cuenta (además de la retina) con el complejo SG-OX, el cual cuenta con un sistema de regulación de neuropeptidos involucrando por ejemplo a la hormona dispersora del pigmento (PDH). En la publicación de Helfritch, (2000), se prueba que la PDH actúa como un modulador entre neuronas osciladoras y los circuitos neuronales que controlan la conducta y otros ritmos de salida, lo que podría aportar un sistema más complejo que provoque cambios drásticos en los periodos de los ritmos ERG. Otra prueba de lo anterior es el trabajo de Solís y Mendoza (2008), mostrando que la melatonina modula al ritmo ERG, siendo un elemento sincronizador que provoca también alargamientos en los periodos.

En el caso de la actividad locomotora, los fármacos (H89/db-AMPc), a pesar de haberlos inyectado únicamente en el tallo ocular, aparentemente se dispersan

también al protocerebro y a la arteria que conduce al sexto ganglio abdominal, debido a la proximidad anatómica que existe entre tales estructuras. Lo anterior, podría justificar el hecho de que, en los resultados de éste estudio, el efecto de los tratamientos experimentales perduró durante días, pese a la vida media de los fármacos, la cual equivale a menos de 10 segundos (O'Neill, 2006). Al aplicar luz o db-AMPc, se disparó una respuesta de sincronización, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las medias de los periodos de los ritmos. A pesar de que la inyección se administró en el tallo ocular del animal íntegro, la regulación que existe en el tallo ocular aislado parece estar más comprometida en la regulación de los periodos al activar o inhibir la vía CREB-CRE a diferencia de los fotorreceptores extracaudales y extrarretinianos, los cuales actúan sobre la respuesta del ritmo de actividad locomotora, involucrando la acción de la PDH a través de conexiones neuronales y expresando CRY en los fotorreceptores cerebrales de *P. clarkii*, (Sullivan y Sandeman, 2009).

A pesar de que la vida media del fármaco H89 es de 4 segundos y en el caso del db-AMPc es de 10 segundos en promedio (O'Neill, 2006), estos son capaces de mantener su efecto hasta 10 días en registros ERG, y en el caso de los registros de actividad locomotora su efecto perdura de 4 - 6 días. Lo anterior se puede ejemplificar en un registro no publicado en esta tesis el cual, al aplicar un pulso de db-AMPc, se provocó un aumento del mesor del ritmo ERG durante días (Ver figuras 20 y 21).

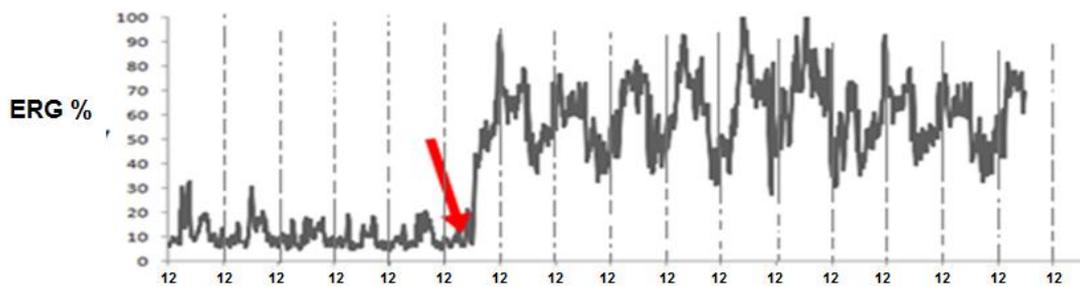
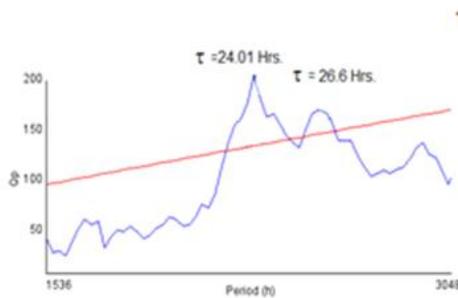
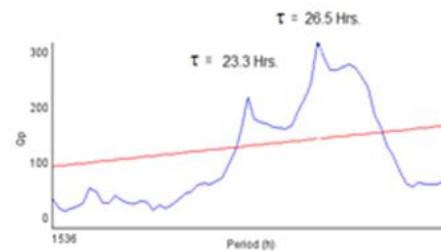
A**B****C**

Figura 20. A. Registro ERG de un acocil *P. clarkii*. En el eje de las ordenadas se muestran los valores de μV porcentualizados, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo. La flecha roja indica una inyección en el tallo ocular db-AMPC ($10 \mu\text{M}$) en el CT 23. Las líneas puntuadas indican la posición de la fase del ritmo. Se consideró a la parte control del registro a los 5 primeros días del registro, mientras que la parte experimental es posterior a la aplicación del fármaco, donde se observa un aumento del mesor del registro durante 10 días consecutivos luego de la aplicación del fármaco, así mismo, se observó un adelanto de fase de alrededor de 3 horas. B. Periodograma de χ^2 de la parte control del registro, observándose un periodo significativo de 24.01 horas. C. Periodograma de χ^2 de la parte experimental del registro observándose un periodo significativo de 26.5 horas (pico más alto que mostró el análisis de periodograma de χ^2). En todos los periodogramas de χ^2 se utilizó una significancia estadística de $P < 0.01$, donde en los ejes de las ordenadas se muestran los valores Q_p , en el eje de las abscisas se muestran las horas de los periodos.

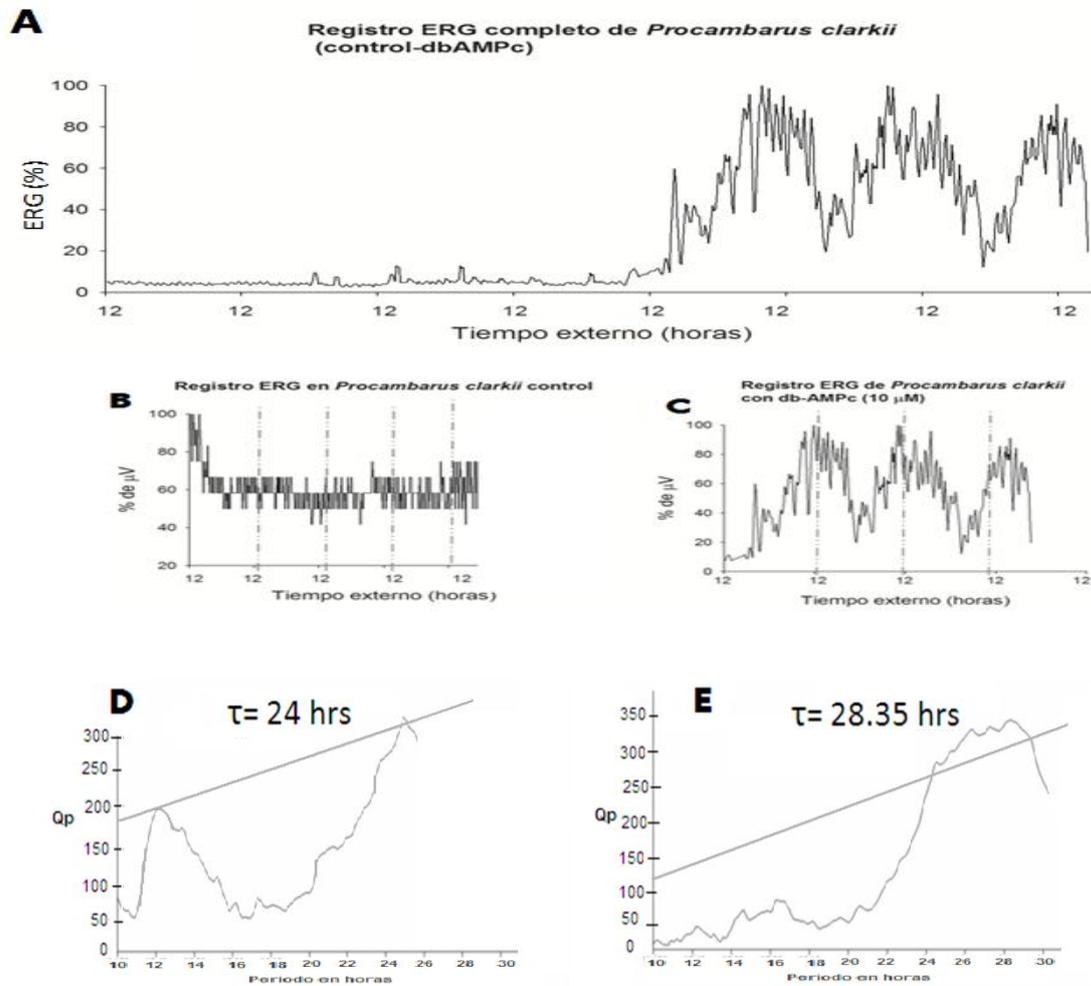
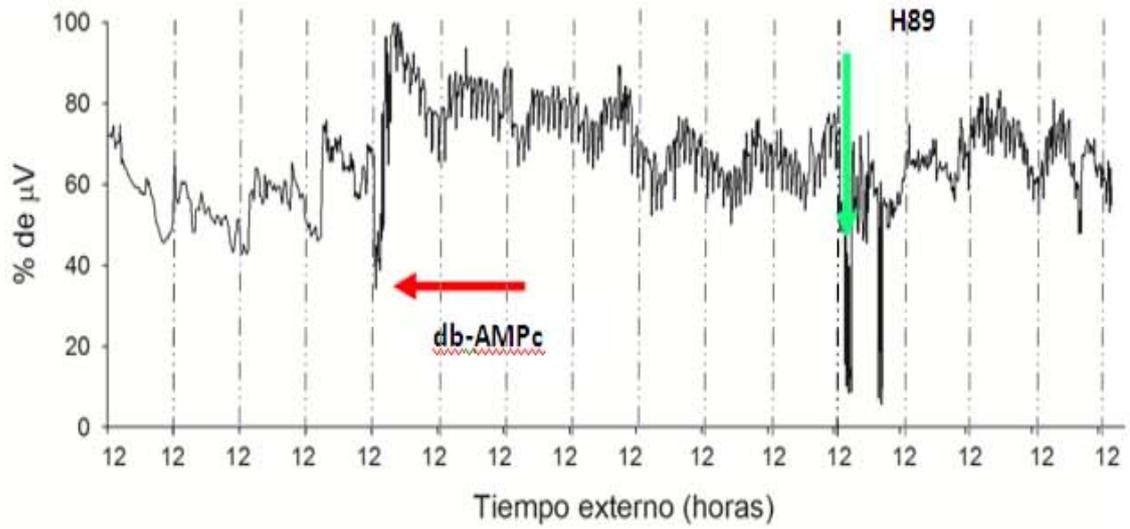
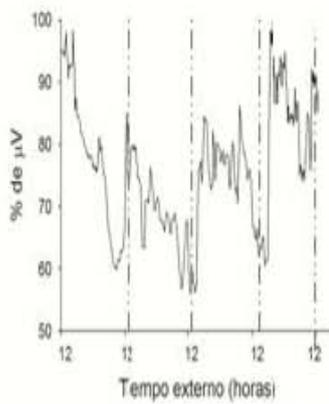
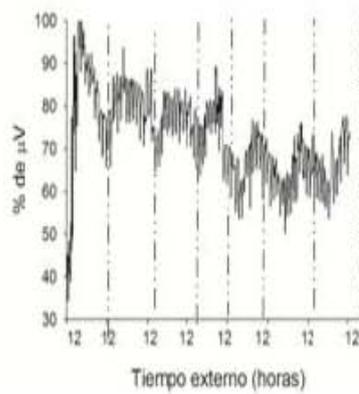
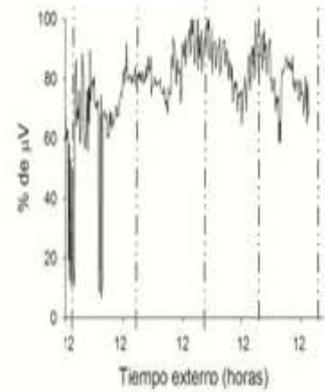


Figura 21. **A.** Registro ERG de un acocil *P. clarkii*. En el eje de las ordenadas se muestran los valores de μV porcentualizados, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo. La flecha roja indica una inyección en el tallo ocular de una concentración de 10 μM db-AMPc en el CT 23, la amplitud del registro se mantiene durante 3 días consecutivos luego de la aplicación del fármaco, además de que se observó un adelanto de fase de alrededor de 3 horas. **B.** Parte control del registro. **C.** Parte experimental del registro. Las líneas puntuadas que aparecen en B y C muestran la fase del ritmo. **D.** Periodograma de χ^2 de la parte control del registro observándose un periodo significativo de 28.35 horas. **E.** Periodograma de χ^2 de la parte experimental del registro, donde se observa un periodo significativo de 24 horas. En todos los periodogramas de χ^2 se utilizó una significancia estadística de 0.01, donde en los ejes de las ordenadas se muestran los valores Qp y en el eje de las abscisas se muestran las horas de los periodos.

En el caso del fármaco H89, al aplicarlo en ojos aislados *in vitro*, igualmente se provoca una pérdida de ritmicidad en algunos registros que pasaron de tener periodos circadianos a ultradianos. (Martínez, 2013). Los resultados que se obtuvieron en los ritmos de actividad locomotora al aplicar db-AMPC mostraron un efecto que se mantuvo por 5- 6 días. Lo anterior podría deberse a que el AMPC actúa como un inductor en la síntesis de neuropéptidos como es la hormona hiperglicémica de los crustáceos (CHH) o bien de la PDH, promoviendo un efecto cascada robusto que recae en la maquinaria del reloj circadiano. Teniendo en cuenta que ambos ritmos de salida tienen diferentes centros anatómicos de integración para hacer posible la ritmicidad circadiana, el efecto del H89 en el ERG, (que produce periodos ultradianos por más de 3 días), podría estar interactuando con la secreción de neuropéptidos, relacionándose también con la retina. (ver figura 22).

En el caso de la actividad locomotora, a pesar de que se inyectó el fármaco en el tallo ocular, este desató efectos más dramáticos (comparados con los efectos del H89 sobre el ritmo ERG) reflejados en los resultados del presente trabajo, ya que la mayoría de los registros tratados con H89+ luz se tornaron arrítmicos; el mecanismo por el cual el H89 (pese a la exposición de luz) provocó efectos radicales en los periodos de los ritmos de actividad locomotora se desconoce (aun sabiendo que la PKA es bloqueada). Controversialmente, el efecto de la luz y del db-AMPC no provocaron diferencias significativas entre las medias de los periodos controles y experimentales en este trabajo, sin embargo, en los registros de ERG (Martínez, 2013), se reportaron diferencias significativas entre las medias de los periodos de los registros controles y experimentales al inyectar db-AMPC en los tallos oculares.

A**Registro ERG completo de *Procambarus clarkii* con los tres tratamientos experimentales****B**Registro ERG de *Procambarus clarkii* control (4 días).**C**Registro ERG de *Procambarus clarkii*, parte experimental (10 μM db-AMPc)**D**Registro ERG de *Procambarus clarkii* con H89 (9 μM)

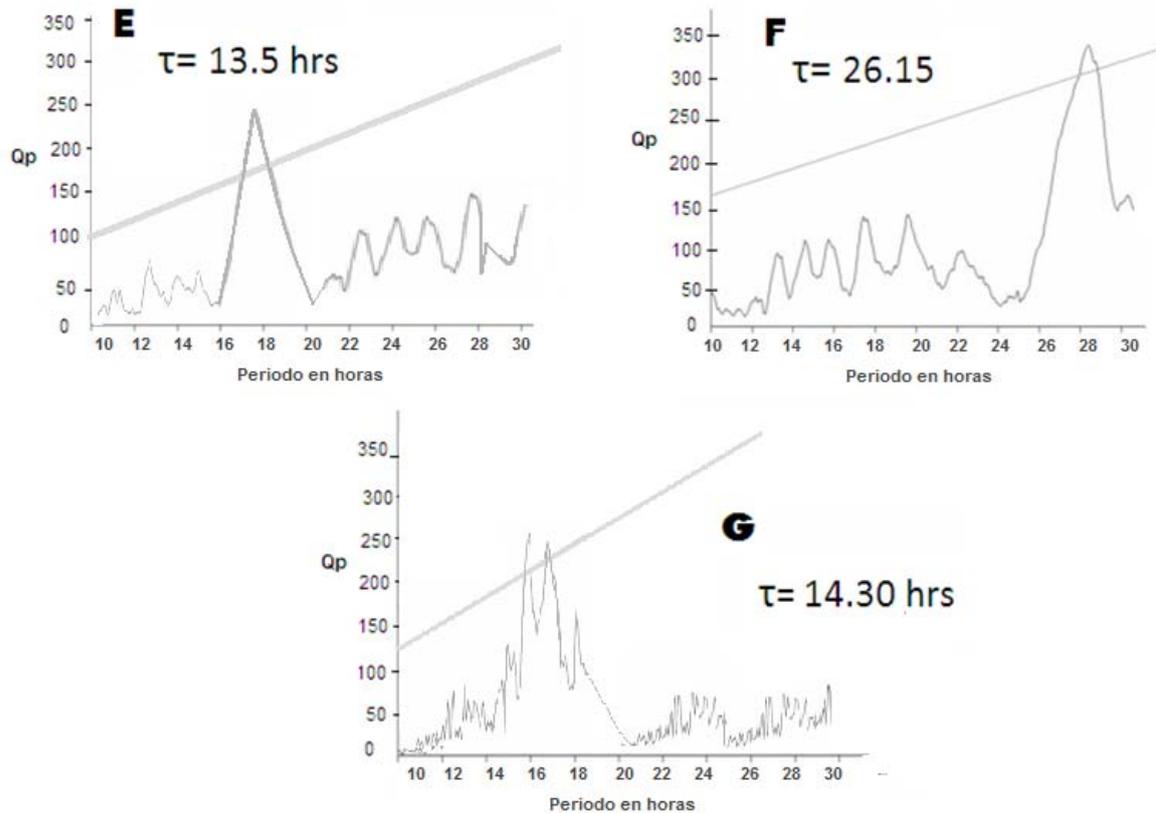


Figura 22. **A.** Registro ERG de un acocil *P. clarkii*. En el eje de las ordenadas se muestran los valores de μV porcentualizados, mientras que en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo. La flecha roja indica una inyección en el tallo ocular de db-AMPC. La flecha verde indica una aplicación a través de inyección en el tallo ocular de H89. Las líneas punteadas muestran la posición de la fase del ritmo. **B.** Parte control, mostrando los 4 primeros días del registro. **C.** Parte del registro donde se inyectó en el tallo ocular db-AMPC (10 μM). **D.** Parte del registro ERG en donde se inyectó H89 (9 μM) en uno de los tallos oculares del acocil. **E.** Periodograma de χ^2 de la parte control del registro, mostrando un periodo significativo de 13.5 horas. **F.** Periodograma de χ^2 de la parte del registro en donde aplico db-AMPC, mostrando un periodo significativo de 26.5 horas. **G.** Periodograma de χ^2 de la parte del registro en donde se aplicó H89, donde se observa un periodo ultradiano significativo de 14.30 horas. En todos los periodogramas de χ^2 se utilizó una significancia estadística de 0.01, donde en los ejes de las ordenadas se muestran los valores Qp, en el eje de las abscisas se muestran las horas de los periodos.

8.4.-Genes reloj y vía de señalización CREB-CRE.

En el trabajo de Narishige y Kuwahara (2004), se analiza la acción del H89 y del AMPc sobre la expresión de la proteína PER2 en tejidos de órganos periféricos de ratón; por un lado, se comprobó que un incremento de AMPc intracelular provoca que los periodos de la expresión rítmica de PER2 se alarguen. Se reportó también que al aplicar a las células un tratamiento de H89, no se inducen cambios en los periodos de la expresión de PER2, sin embargo, la amplitud del ritmo se reduce ligeramente. En base a lo anterior, se deduce que la participación de la PKA no es necesaria en la expresión del periodo del ritmo, pero está asociada con la modulación de la amplitud. A diferencia de los anteriores hallazgos, en los resultados obtenidos en esta tesis, se tiene que el efecto del H89+luz compromete de manera crucial la vía de señalización CREB-CRE a través de la inhibición de la PKA, ya que no se obtuvieron (en la mayoría de los casos) cambios de fase ni periodos significativos. La anterior discrepancia se podría deber a: 1) Las diferencias entre los modelos animales utilizados entre el estudio de Narishige y Kuwahara y en esta tesis, 2) Los tratamientos experimentales que se utilizaron en este trabajo se aplicaron directamente al tallo ocular que contiene al protocerebro lateral (donde se encuentran osciladores del reloj) y está anatómicamente adyacente al protocerebro medial (donde también se encuentran otros osciladores del reloj), haciendo posible que el fármaco se difunda rápidamente hacia ellos ejerciendo un efecto muy rápido. En consecuencia, se pierde el ritmo de salida inmediatamente y la posterior aplicación de luz no tiene ningún efecto sobre él, mientras que en los órganos periféricos de ratón existen otro tipo de mecanismos de compensación que permiten la ritmicidad aún con la aplicación del H89. Trabajos previos con protocolos semejantes sobre el ritmo ERG en animales íntegros y en ojos aislados (Martínez, 2013) demostraron que el H89 torna ultradianos a periodos circadianos, y en algunos casos también provoca arritmias. En contraste con el proceso experimental que se hizo en el estudio de Narishige y Kuwahara se toma en cuenta únicamente la expresión de la proteína PER2 en tejidos de órganos que funcionan como osciladores periféricos (no se aplicó el fármaco directamente en el núcleo supraquiasmático). 3) A pesar de que en esta tesis se aplicó el H89 sumado con la aplicación de un pulso de luz blanca, no se presentaron cambios de fase ni periodos significativos, lo que se traduce en arritmias del ritmo de actividad locomotora. En el estudio de Narishige y Kuwahara se analizan los efectos de la aplicación de H89+cafeína (la cafeína funciona como inhibidor de las fosfodiesterasas, lo cual impulsaría la acumulación de AMPc intracelular), donde no se observaron cambios en los periodos de la expresión de PER2. El anterior punto discutido, nos permite inferir que, a un nivel molecular es posible que existan diferencias en los mecanismos que hacen posible la oscilación de

las proteínas reloj, teniendo a la PKA como un elemento crucial en la expresión de un ritmo de salida como es la actividad locomotora. Los resultados de Narishige y Kuwahara (2004) que se obtuvieron al aplicar AMPc en los tejidos, coinciden con algunos de los resultados de esta tesis: en ambos el nucleótido cíclico provocó alargamientos de los periodos, aunque en la prueba estadística de esta tesis no se observaron diferencias significativas entre controles/experimentales (no en todos los registros se observaron tales alargamientos de los periodos).

Aunque no existen trabajos que prueben molecularmente la participación de la vía CREB-CRE en los ritmos circadianos de acociles (probar la expresión circadiana de la proteína CREB, por ejemplo), se han realizado trabajos que comprueban que esta vía interviene únicamente en la homeostasis del sueño en *Drosophila melanogaster* sin afectar al reloj circadiano (Hendricks et al., 2001). Sin embargo, en la investigación de Williams et al., (2001) se demuestra que la actividad de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) / Ras (proteína G monomérica) intervienen en el ritmo de actividad locomotora de *D. melanogaster*. En el presente proyecto se muestran resultados útiles para ampliar el conocimiento circadiano del acocil *P. clarkii*, ya que el papel que podría estar desempeñado la vía CREB-CRE sobre el ritmo de locomoción podría dar pie a nuevas investigaciones para investigar si existen otros ritmos circadianos involucrados con esta vía de señalización.

Boyoung y Aiqing (2010), comprobaron que el efecto del knock-out de CREB en ratones provoca arritmias a nivel fenotípico, mientras que, a nivel celular, desistió la expresión de las proteínas reloj PER1 y PER2; así mismo, comprobaron que la atenuación de la vía CREB-CRE en el núcleo supraquiasmático causa una reducción significativa de la sincronización con luz, dando un soporte importante a la hipótesis de que la vía CREB-CRE tiene la misma importancia en el fenómeno de sincronización por luz en el acocil *P. clarkii*.

Para complementar las evidencias que respaldan la hipótesis de que la vía de señalización CREB-CRE está funcionando como un elemento central dentro de la maquinaria del reloj molecular de los invertebrados (en particular del acocil *P. clarkii*), es necesario continuar con los experimentos a nivel molecular, para dilucidar si la expresión proteica de los elementos reloj tiene comportamientos parecidos o diferentes a los que se han reportado en mamíferos.

9. Conclusiones.

En base a los resultados antes expuestos en la presente tesis, se tiene que los animales que recibieron el pulso de luz en los tres tiempos circadianos, presentaron cambios de fase similares a diversos estudios relacionados con la sincronización de actividad locomotora. Los animales que recibieron la inyección de db-AMPC presentaron cambios de fase similares, ya sea en adelantos o atrasos con la curva de respuesta de fase producida por los tratamientos de luz.

Se puede concluir que:

- 1.- La mayoría de los animales que recibieron la inyección de H89 más un pulso de luz presentaron arritmias en el ritmo de actividad locomotora. Esto sugiere que la PKA es posiblemente un elemento de crucial importancia en la vía CREB-CRE sobre la sincronización del ritmo de actividad locomotora.
- 2.- El AMPC actúa como una señal análoga a la luz en el proceso de sincronización del ritmo de actividad locomotora.
- 3.- No hay diferencias significativas entre los periodos de cada tratamiento experimental, sin embargo, si existieron cambios de fase significativos.
- 4.- Los resultados sugieren que la participación de la vía CREB-CRE es elemental en la expresión y sincronización del ritmo de actividad locomotora del acocil *P. clarkii*.

10. Anexo.

10.1- Detalles de los fármacos utilizados

-Análogo de AMPc (db-AMPc).

Sigma Aldrich. D-0627 3' 5' –Monofosfato cíclico N6, 2' – O. Dibutiril Adenosina (Bucladesina; Dibutiril cíclico AMP) C₁₈H₂₃N₅O₈PNa. Pureza de 98% (HPLC). Contiene <0.5% de AMP cíclico y más de 3% de derivados de monobutiril. La solución del fármaco se mantuvo en refrigeración a -20⁰C.

H89. Sigma-Aldrich-B1427-5mg, H89, hidrato dihidrocloridrato, C₂₀H₂₀BrN₃O₂S. 2HCL- xH:2°. Su solubilidad es posible en DMSO (25 mg/ml); Etanol (50%) / agua (20 mg/ml); agua (≥10 mg/ml) y metanol. La solución del fármaco se mantuvo en refrigeración a -20⁰C.

10.2.- Periodograma de χ^2 .

Los periodogramas de χ^2 se obtuvieron a través del programa de cómputo SPAD9 (OMNI-ALVA, México), que se basó en la siguiente fórmula matemática, definiendo como:

N = número total de datos por hora

X_i = número total de datos por hora de la hora i -ésima ($0 < i \leq N$)

P = número de columnas en la matriz de los datos por hora

h = índice de una columna en la matriz de columnas de las X_i 's teniendo P columnas ($1 < h \leq P$)

K = número de filas en la matriz de columnas de P

\bar{X}_h = media de la X_i 's en la columna de la matriz

Las medias de la columna, para una elección de prueba de p del periodo, están dadas por:

$$\bar{X}_{h,p} = K^{-1} \sum_{j=0}^{k-1} X_{h+jp} \quad h = 1, \dots, P.$$

Si p es una integral, $p = P$. Si p no es una integral entonces, todos los valores fraccionados del subíndice de X son redondeados hacia arriba hacia la siguiente integral, esto causa que algunos valores de x_i se omitan de la formación. Por lo que, si $p = 24.2$, entonces $P =$ el número de columnas = 24 y X_{25} , X_{146} , X_{267} , ..., no se incluyen en la formación (un dato se omite cada 5 renglones). La siguiente fórmula que propuso Enright muestra el cálculo de la estadística:

$$A_p = \left[P^{-1} \sum_{h=1}^p (\bar{X}_{h,p} - \bar{X}_p)^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

donde:

$$A_p = P^{-1} \sum_{h=1}^p \bar{X}_{h,p}$$

es la raíz cuadrada de las medias de las columnas de un análisis de un periodo dado P. Si existe un componente oscilatorio estable con periodo T en las series originales de tiempo, una gráfica de A_p contra P podría alcanzar un valor máximo en P=T. Enright definió a tal gráfica como periodograma.

A_p es un estimado de la varianza de las medias de P

de K ítems dibujados a partir de una población de N valores

. Si estos valores presentan una distribución normal con una varianza σ_X^2 , entonces la varianza de la media será:

$$\sigma_{\bar{X}}^2 = K^{-1} \sigma_X^2$$

y la proporción:

$$Q_p = \frac{P (A_p)^2}{\sigma_{\bar{X}}^2} = \frac{K \sum_{h=1}^p (\bar{X}_h - \bar{X})^2}{N^{-1} \sum_{i=1}^p (\bar{X}_i - \bar{X})^2}$$

La cual podría aproximarse a una distribución de χ^2 con (P-1) grados de libertad.

$$Q_p = \frac{K \sum_{h=1}^p (\bar{X}_h - \bar{X})^2}{\bar{X}} \quad (\text{Sokolove y Wayne, 1978}).$$

11. Literatura citada.

Anderson F. E. y Green C. B. (2000). Symphony of Rhythms in the *Xenopus laevis*. *Retina. Microscopy Research And Technique*, 50:360–372.

Arechiga H. y Rodriguez L. (1998). Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *Biological Sciences*. Vol. 265, N° 1408, 1819-1823.

Aschoff J. (1984). *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4. *Biological Rhythms*. Plenum Press New York and London, USA, pp. 563.

Barrera-Mera B. y Block G. D. (1990). Protocerebral circadian pacemakers in crayfish: evidence for mutually coupled pacemakers. *Brain Research*: 522:2, 241–245.

Bernal-Moreno A., Miranda-Anaya M y Fanjul-Moles M. L. (1996). Phase Shifting the ERG Amplitude Circadian Rhythm of Juvenile Crayfish by Caudal Monochromatic Illumination. *Biological Rhythm Research*: 27:299-301.

Boyoung L. y Aiqing L. (2010). CREB Influences Timing and Entrainment of the SCN Circadian Clock. *J Biol Rhythms*. 6, 410-420.

Cardinali P. D, Català J. J. y Sánchez E. B. (1994). Introducción a la cronobiología. *Fisiología de los ritmos biológicos*. Universidad de Cantabria. pp. 157.

Ding, J. M., Faiman, L. E., Hurst, W. J., Kuriashkina, L. R. y Gillette M. U. (1997). Resetting the biological clock: Mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *Journal of neuroscience*, 17, 667-675.

Escamilla-Chimal E. G. y Fanjul-Moles. M. (2008). Daily and circadian expression of cryptochrome during the ontogeny of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr. Physiol*. 151(3):461-70.

Escamilla-Chimal E. G., Velazquez R. M y Fanjul-Moles. (2010). Putative pacemakers of crayfish show clock proteins interlocked with circadian oscillations. *J Exp Biol*. 1; 213:3723-33.

Eskin A. (1971). Some properties of the system controlling the circadian activity rhythms of sparrows. *Ntl Aca. Sci, Washington*, pp 50-80.

Fanjul M. M.L., Escamilla C. E. G., Gloria O. A, Hernández H. G. (2009). The crayfish *Procambarus clarkii* CRY shows daily and circadian variation. J Exp Biol. 207:1453-60.

Fanjul-Moles y Hiriart M. (2010). Biología funcional de los animales II. Siglo XXI editores. México, pp. 327.

Fanjul-Moles y Prieto S. J. (2003). The circadian system of crayfish: A developmental Approach. Microscopy Research and Technique. 60:291-301.

Fuentes-Pardo. B., Verdugo D. L. e Inclán R. V. (1985). Effect of external level of calcium on ERG circadian rhythm in isolated eyestalk of crayfish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology: 0300-9629(85) 90872-2.

Fuentes-Pardo B. y Fanjul-Moles M. L. (1992). Synchronization by light of the ERG circadian rhythm during ontogeny in the crayfish. Journal of Interdisciplinary Cycle Research, 23: 2.

Green C. B. (2003). Molecular Control of *Xenopus* Retinal Circadian Rhythms. Journal of Neuroendocrinology, 2003, Vol. 15, 350–354.

Harrington M. E., Hoque S., Hall A., Golombek D. y Biello S. (1999). Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide Phase Shifts Circadian Rhythms in a Manner Similar to Light. The Journal of Neuroscience: 15, 6637-6642.

Helfrich C., Täuber M., Park JH, Mühligh M., Schneuwly S. y Hofbauer A. (2000). Ectopic expression of the neuropeptide pigment-dispersing factor alters behavioral rhythms in *Drosophila melanogaster*. J. Neurosci; 20:3339–3353.

Hendricks J. C., Williams J. A. y Panckeri K. (2001) A non-circadian role for cAMP signaling and CREB activity in *Drosophila* rest homeostasis. Nature Neuroscience: 4, 1108-1115.

Hernández V. y Pérez R. (2012). Advances in Domestication and Culture Techniques for Crayfish *Procambarus acanthophorus*. Aquaculture, 11, 217-240.

H. Ko. C, Yamada Y. R. Welsh K. D. (2010). Emergence of Noise-Induced Oscillations in the Central Circadian Pacemaker. Plos Biology, Volume 8:10: e1000513.

Johnson C. H. (1992). Phase response curves: What can they tell us about circadian clocks?. Hiroshige T, Honma K. editors. Circadian clocks from cell to human. Sapporo: Hokkaido University Press. 209–249.

Kalmus H. (1935). Periodizität und Autochrone (Ideochrome) als zeitregelnde Eigenschaften des Organismus, *Biologia generalis*, 11, 93-114.

Kanski J. J. (2009). *Oftalmonología*. 6ta edición. Elsevier, España. pp. 304.

Kennedy, D., y Bruno, M.S. (1961). The spectral sensitivity of crayfish and lobster vision. *J. Gen. Physiol.* 44:1089-1102.

Koolman J. y Rohm K. H. (2004) *Bioquímica*. Editorial Médica Panamericana, 3ra edición, Madrid. pp 479.

Koukkari W. L. y Sothorn R. B. (2006). *Introducing Biological Rhythms*. Springer. USA, pp, 649.

Kramer I. J. (2015). *Signal Transduction*. Elsevier. 3ra Edición, U.S. A. pp. 1026.

López M. M. (2008). Sistemática de los cangrejos de río en México. En: Álvarez F., Rodríguez Almaraz G. A. (1ra Edición). *Crustáceos de México*. Estado actual de su conocimiento. México: 115-165.

Martínez C. M. (2013). Efecto del monofosfato de adenosin cíclico sobre el ritmo de amplitud del registro electroretinográfico (ERG) en dos géneros de cangrejo de río. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México. 68 pp.

Meyer-Spasche A., Reed H.E. y Piggins H. D. (2002). Neurotensin phase-shifts the firing rate rhythm of neurons in the rat suprachiasmatic nuclei *in vitro*. *Eur. J. Neurosci*: 339-44.

Mirosovsky N. (1996). Locomotor activity and non-photoc influences on circadian clock. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1996 Aug;71(3):343-72

Narishige S. y Kuwahara M. (2014). Effects of caffeine on circadian phase, amplitude and period evaluated in cells *in vitro* and peripheral organs *in vivo* in PER2::LUCIFERASE mice. *British Journal of Pharmacology.* 171, 5858-5869.

O'Neill, M.J. (2006). *The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., pp. 27.

O'Neill J. S., Maywood S. E. Chsham J. E. (2009). cAMP-Dependent Signalling as a Core Component of the Mammalian Circadian Pacemaker. *Science.* 320(5878): 949-953.

Page T. L y Larimer J. L. (1972). The Role of the Eyes and Caudal photoreceptor. *J. comp. Physiol.* 78, 107-120.

- Pittendrigh C., Bruce V. y Kaus P. (1958). On the significance of transients in daily rhythms. *Proc Natl Acad Sci*;44(9):965-73.
- Pittendrigh C. S. (1993). Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu, Rev, Physiol*, 55, 17-54.
- Prosser R. y Gillette M. (1989). The Mammalian Circadian Clock in the Suprachiasmatic Nuclei Is Reset *in vitro* by cAMP. *The Journal of Neuroscience*: 1073-1081.
- Rojas, P. R. (1998). Revisión taxonómica de ocho especies del genero *Procambarus* (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) del centro de Veracruz, México. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México. 157 pp.
- Segarra E. E. (2006). Fisiología de los aparatos y sistemas. Universidad de Cuenca. 455 pp.
- Sokolove P. G. y Bushell W. N. (1978). The chi square periodogram, its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.* 8;72 (1): 131: 60.
- Solís H., Mendoza L. y Fuentes B. (2008). Melatonin modulates the ERG circadian rhythm in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*.149, 4:373-379.
- Strauss J. y Dirksen H. (2010). Circadian clocks in crustaceans: identified neuronal and cellular systems. *Front Biosci.* 1; 15:1040-74.
- Sullivan J. M., Sandeman D. C. et al. (2009). Brain photoreceptor pathway contributing to circadian rhythmicity in crayfish. *Chronobiol. Int.* 1136-1168.
- Takahashi J. S., Turek F. W. y Moore R. Y. (2001). *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 12. *Biological Rhythms*. Plenum Press New York and London, USA, pp. 770.
- Taleiski S. (2006). *Receptores celulares y la transducción de señales. Temas de biología celular*. Encuentro Grupo Editor. Argentina. pp 268.
- Udalova G. P.; Kholodkevich S. V.; Fedotov V. P.; Kornienko E. L. (2012). Changes in heart rate and circadian cardiac rhythm as physiological biomarkers for estimation of functional state of crayfish *Pontastacus leptodactylus Esch.* upon acidification of the environment. *Ecological Physiology And Biochemistry Of Hydrobionts*. Volume 5, Issue 1, pp 119-127.
- Viccon-Pale J. A. y Fuentes-Pardo B. (1994). Synchronization by light of the circadian rhythm of motor activity in the crayfish. *Biological Rhythm Research*: 25:3:267-276

Villalobos H. J. L.; Cantú D. B. A. y Lira F. E. (1993). Los crustáceos de agua dulce de México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 44: 267-290.

Williams J. A., Henry S. S., Bernards A., Field J y Sehgal A. (2001). A Circadian Output in *Drosophila* Mediated by Neurofibromatosis-1 and Ras/MAPK. *Science*: 29: 5538, 2251-2256.