



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

MAPK como una vía de señalización en la sincronización a la luz en el acócil

Procambarus clarkii

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. ROSA MARÍA VELÁZQUEZ AMADO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

CD. MX. noviembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

MAPK como una vía de señalización en la sincronización a la luz en el acócil

Procambarus clarkii

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. ROSA MARÍA VELÁZQUEZ AMADO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. noviembre, 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/978/2018

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora 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 **10 de diciembre de 2014** 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) **VELÁZQUEZ AMADO ROSA MARÍA** con número de cuenta **300109717** con la tesis titulada "**MAPK como una vía de señalización en la sincronización a la luz en el acocil *Procambarus clarkii***", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA**:

Presidente: **DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**
Vocal: **DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES**
Secretario: **DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ**
Suplente: **DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ**
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 3 de octubre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/grf*

Este trabajo fue aprobado por el
Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM
y financiado por
PAPIIT IN218811 y CONACYT 178526
Proyecto de la Dra. María Luisa Fanjul Peña.
Y realizado en el Laboratorio de
Neurofisiología Comparada.
Facultad de Ciencias
UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y que a través de la Facultad de Ciencias me otorgó los espacios y recursos para la realización de esta tesis que me permitieron continuar con mi formación.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgada y a los proyectos PAPIIT IN218811 y CONACYT 178526.

A mi tutor principal la Dra. María Luisa Fanjul Peña por su dirección y por darme la oportunidad de participar en el proyecto. Gracias por la revisión, las observaciones y por su continuo apoyo en mi formación académica y humana.

A los integrantes del comité tutor la Dra. Sylvia Leticia Verdugo Díaz y al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por la compromiso, revisión, sugerencias, comentarios y seguimiento para el desarrollo del presente trabajo.

Gracias al M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo, Técnico Académico del Laboratorio de Neurofisiología Comparada, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias UNAM por su continua asesoría y sugerencias en la parte técnica. Y a la Dra. María de los Ángeles Cancino Rodezmo, Técnico Académico titular A, Departamento de Biología Celular, Tlahuzcalpan, Facultad de Ciencias, UNAM por sus recomendaciones técnicas.

A la Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal, Profesora Titular A del Laboratorio Neurofisiología y Ritmos Biológicos, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, UNAM por seguir otorgándome los recursos y espacios durante la obtención de grado.

A la laboratorista Patricia Arismendi Yáñez por el apoyo y cuidado de los animales en la fase experimental.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres Minerva Amado Ortega y Sergio Velázquez Carmona por acompañarme en este caminar. Por apoyarme no solo en los momentos de felicidad sino también en aquellos difíciles y mostrarme que a través del amor se transforma la vida. Por su palabras y enseñanzas, su cariño y plena confianza.

A mis hermanos Minerva Velázquez Amado y Sergio Leonardo Velázquez Amado por su apoyo, sus sonrisas y enojos, también por sus palabras y tolerancia, porque han compartido esta parte de mi historia de vida, porque somos y seguiremos siendo amigos. Mine gracias por compartir tu alegría que me parece infinita y por el apoyo en los trámites y Sergio por tu fortaleza.

A mi abuelita Meli por mostrarme con tu ejemplo que a través del esfuerzo, honradez, respeto y trabajo se puede salir siempre adelante en cualquier situación.

A Maricela Solano Ramírez por tu amistad, escucha y apoyo durante los trámites.

A Erika Rubí por compartir tantos momentos de amistad durante la maestría y por tu apoyo.

Gracias a Janikua F. Nelson Mora por ser mi compañera y amiga durante este hermoso camino del posgrado, por todo el apoyo en los momentos difíciles e inmensa alegría. Julio Prieto por todos los momentos de aprendizaje, amistad y de alegría. Gracias Sra. Paty por todos estos años de su compañía, apoyo y por atender los acuarios con dedicación.

A Elsita, Fernando, Jorge, Ana, Fabi, Rosaura, Nancy, Fermín, Mary, Erick, Valdo y a todos mis compañeros y amigos del laboratorio por los días compartidos, su ayuda, interés y ánimo.

A la Dra. María Luisa Fanjul Peña por brindarme la oportunidad de ser su alumna, por su guía, brindarme su apoyo en todo momento y facilitarme los recursos durante la realización de la tesis. Por su confianza y tiempo gracias.

DEDICATORIA

A mis padres y Sergio
y a mis hermanos con todo mi amor.

Índice

1. Resumen.....	4
2. Abstract.....	5
3. Introducción.....	6
3.1. Relojes Biológicos	6
3.1.1. Reloj circadiano: bases biológicas, fisiológicas y moleculares	8
3.1.2. Modelos moleculares del reloj circadiano	8
3.1.3. La proteína del criptocromo	9
3.2. Sincronización	11
3.2.1. La luz y la sincronización	13
3.3. Las cinasas y la familia de las MAPK	14
3.3.1. ERK	17
3.3.2. JNK	18
3.3.3. El reloj circadiano y la vía de señalización de las MAPK	18
3.3.4. El modelo de molecular	20
3.4. El acocil <i>Procambarus clarkii</i> , un modelo para el estudio de los ritmos Circadianos	21
4. Planteamiento del problema	22
5. Hipótesis	23
6. Objetivos.....	23
7. Materiales y métodos	24
7.1. Animales	24
7.2. Disecciones y procesamiento de muestras	25
7.3. Determinación de proteínas (microensayo)	25
7.4. Técnica de ELISA	26

7.5. Análisis de resultados	29
8. Resultados	30
8.1. Curvas de calibración	30
8.2. Efecto del inhibidor U0126	33
8.3. Oscilaciones diarias y circadianas	35
8.3.1. Criptocromo.....	35
8.3.1.1. Retina	35
8.3.1.2. Lóbulo óptico	35
8.3.1.3. Ganglio cerebroide	36
8.3.2. Extracellular Signal Regulated Kinase “ERK”.....	36
8.3.2.1. Retina.....	36
8.3.2.2. Lóbulo óptico	36
8.3.2.3. Ganglio cerebroide	37
8.3.3. Cinasa N-terminal Jun “JNK”	37
8.3.3.1. Retina	37
8.3.3.2. Lóbulo óptico	38
8.3.3.3. Ganglio cerebroide	38
8.4. Efecto del pulso de luz azul en ZT14 y el inhibidor U0126	42
8.4.1. Criptocromo	42
8.4.1.1. Retina	42
8.4.1.2. Lóbulo óptico	42
8.4.1.3. Ganglio cerebroide	43
8.4.2. Extracellular Signal Regulated Kinase “ERK”	43
8.4.2.1. Retina	43
8.4.2.2. Lóbulo óptico	44

8.4.2.3. Ganglio cerebroide	44
8.4.3. Cinasa N-terminal Jun “JNK”	45
8.4.3.1. Retina.....	45
8.4.3.2. Lóbulo óptico.....	45
8.4.3.3. Ganglio cerebroide.....	46
9. Discusión.....	50
10. Conclusiones.....	55
11. Apéndice.....	57
12. Literatura citada.....	58

1. Resumen

Los organismos tienen la capacidad de ajustar el reloj circadiano a los cambios diarios de luz-oscuridad a través de la sincronización. Se ha propuesto que la vía MAPK desempeña un papel central en la señalización para la regulación de la respuesta a la luz y la sincronización del reloj circadiano. En este trabajo por medio de la técnica de ELISA se identificó a la proteína del criptocromo (CRY) y la actividad de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) en las estructuras que se han propuesto como marcapasos en el acocil *Procamabarus clarkii*: la retina, el lóbulo óptico y el ganglio cerebroide. Los resultados CRY (proteína sensible a la luz) mostraron cambios diarios y circadianos en la retina y en el ganglio cerebroide. También se encontraron oscilaciones diarias significativas de p-ERK en la retina y el lóbulo óptico, y oscilaciones circadianas significativas de p-ERK en las tres estructuras. En cuanto a p-JNK mostró oscilaciones diarias y circadianas en todas las estructuras. Después de aplicar el fármaco U0126 (inhibidor de MEK) y un pulso de luz azul en ZT 14 (una hora de sensibilidad circadiana) incrementó los niveles de expresión de CRY. Los resultados demuestran la participación de la vía de señalización MAPK-ERK en la sincronización del sistema circadiano de los cangrejos que sugieren una regulación de retroalimentación negativa con la entrada de la luz azul, MAPK-ERK y la expresión de los ritmos circadianos de CRY. El pulso de luz azul sin la aplicación de U0126 a la misma hora circadiana disminuye la abundancia de p-JNK en las tres estructuras.

2. Abstract

The organisms have the ability to adjust the circadian clock to light-dark daily cycles throughout synchronization. It has been proposed that MAPK signalling pathway plays a central role regulating the circadian clock synchronization to light in animals. In this thesis we investigated whether MAPK is involved in the circadian system of crayfish participating in the synchronization mechanisms to light. We used ELISA analysis to detect a circadian protein cryptochrome (CRY) as well as Extracellular Signal-Regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal Kinase (JNK) activity in structures proposed as pacemakers in crayfish *Procambarus clarkii*: retina, optic lobe and central brain. The data revealed CRY as a light sensitive protein showing daily and circadian rhythms both in retina and brain. These findings were related with significant daily oscillations of p-ERK in the retina and the optic lobe, as well as significant circadian oscillations in the three circadian structures. p-JNK showed daily and circadian oscillation in all structures. After MEK inhibitor U0126 coupled with a pulse of blue light at a circadian time increased levels of expression. The results prove the involving of MAPK-ERK signaling pathway in the synchronization of the circadian system of crayfish suggesting a negative feedback regulation between blue-light, MAPK- ERK and the expression of CRY circadian rhythms. The pulse of blue light but no U0126 at the same circadian time decreases the abundance of p-JNK in the three structures, suggesting that blue light negatively modulates JNK but no ERK.

3. Introducción

3.1. Relojes Biológicos

Desde las primeras formas de organización celular hasta las formas más complejas de vida como los organismos multicelulares han desarrollado un sistema para medir el tiempo internamente y contrastarlo con las señales geofísicas cíclicas del ambiente. Lo anterior permite a los seres vivos anticiparse a los cambios ambientales y disponer de recursos. Prácticamente en todas las especies se han encontrado ritmos moleculares, fisiológicos y conductuales cuyos periodos pueden tener diferente duración, por lo tanto la ritmicidad es una característica inherente de la vida. En los años sesenta los estudios e interpretaciones de Colin Pittendrigh señalaron las propiedades del reloj biológico (Moore-Ede *et al.* 1982) y lo definió como una estructura orgánica capaz de generar un ritmo, es decir la recurrencia en el tiempo de un evento dentro de un sistema biológico. Este evento es endógeno y posee un periodo estable.

Los ritmos biológicos que se encuentran asociados a fenómenos geofísicos presentan las siguientes propiedades: cuentan con una base genética que determina el sistema interno para la medición del tiempo y son de naturaleza endógena por lo que persisten en condiciones constantes. Las oscilaciones endógenas se pueden ajustar a ciclos externos, es decir se sincronizan a ellos. Estas oscilaciones son generadas por un oscilador que recibe información del ambiente mediante vías de entrada sincronizando al marcapaso circadiano que transduce la señal rítmica a las vías de salida hacia los tejidos u órganos efectores. Se ha demostrado que la estimulación externa puede afectar las variables de salida y que las vías de salida pueden retroalimentar al oscilador. En tanto, las variables de entrada también podrían estar reguladas por el oscilador circadiano (Golombek y Rosenstein, 2010). El reloj biológico tiene la capacidad de compensar el efecto que los cambios de la temperatura ambiental pudieran alterar en el periodo de un ritmo (Brady, 1979; Menaker y Wisner, 1983). Sin embargo, aún no se conocen claramente cuáles son los mecanismos fisicoquímicos capaces de compensar el cambio de temperatura manteniendo el periodo.

En el año de 1959, Franz Halberg uno de los fundadores de la cronobiología moderna, diseñó una nomenclatura para los ritmos biológicos utilizando el prefijo “circa”, del latín “alrededor de” al cual agregó el sufijo que corresponde a la duración del periodo del ritmo geofísico al que se asocia, así podemos nombrar a los ritmos: circadianos, circamareales, circalunares y/o circanuales. Puesto que el periodo es el inverso de la frecuencia otra forma en la que podemos clasificar a los ritmos biológicos es a partir de la frecuencia, si el periodo es menor a 20 horas su frecuencia es mayor y se les llaman ultradianos. Pero si el periodo es mayor a 28 horas la frecuencia es menor (Refinetti, 2000) se denominan infradianos.

De acuerdo con Gruart *et al.* 2002; Brady, 1979 y Moore-Ede *et al.* 1982 los parámetros que definen a un fenómeno periódico son:

El **periodo** es el inverso de la frecuencia y representa el intervalo de tiempo entre dos acontecimientos de referencia idénticos. El periodo de un ritmo biológico se simboliza con la letra τ (tau), y al periodo del sincronizador o “zeitgeber” del ritmo con la letra **T**. Por lo tanto, la frecuencia se define como el número de veces que ocurre un evento a lo largo de cierto tiempo.

La **amplitud** es la diferencia entre el valor de la cresta y el valle, esta determina la magnitud de la variación del fenómeno que define al ciclo.

La **fase** se refiere al tiempo en el que ocurre un evento o marcador de fase dentro de un ciclo y puede ser medido, por ejemplo, en hora, mes, año. Su símbolo para un ritmo es ϕ , y para el “zeitgeber” es Φ .

La **relación ϕ o ángulo de fase**, se establece cuando queremos comparar distintos ritmos y para eso se necesita normalizar su fase, para lograrlo se toma un evento de referencia y se compara entre ambos ritmos y la diferencia se presenta en unidades de tiempo o en grados. Se puede establecer la relación de fase entre un ritmo biológico y otro, o un ritmo biológico y el ritmo del ambiente. El símbolo que se utiliza es Ψ .

La acrofase es el punto máximo o la cresta que alcanza una onda sinusoidal.

3.1.1. Reloj circadiano: bases biológicas, fisiológicas y moleculares

Para que un sistema biológico pueda medir el tiempo que transcurre entre el día y la noche debe poseer los siguientes componentes: un sistema que genere la ritmicidad y que en general esté constituido por osciladores o marcapasos circadianos acoplados que generan la señal de tiempo con una duración cercana a 24 horas, este sistema debe sincronizar el ritmo a los ciclos ambientales detectando las señales externas. En general este sistema se compone de los receptores y las vías sensoriales que transmiten el tiempo externo a los marcapasos circadianos, y un sistema de sincronización interna entre los marcapasos circadianos y los efectores, que pueden ser células, órganos o sistemas en donde se llevan a cabo las diferentes acciones fisiológicas de manera rítmica (Aréchiga, 2003).

3.1.2. Modelos moleculares del reloj circadiano

El estudio de los mecanismos moleculares responsables de la génesis de un ritmo circadiano ha sido extenso. Para ello se han utilizado diferentes modelos de organismos desde procariontes hasta mamíferos. Estos estudios han comprobado que en la génesis de las oscilaciones intervienen tanto elementos negativos como positivos, constituidos por genes y por proteínas. Ejemplificaré con uno de los modelos más estudiados y comprendidos hasta el momento el reloj molecular de la mosca de la fruta.

Se ha propuesto que el reloj molecular de *Drosophila* se compone de los siguientes elementos: las proteínas CYCLE (CYC)-CLOCK (CLK) que forman parte del asa de regulación positiva activando la transcripción de genes *period* (*per*) y *timeless* (*tim*), que al ser traducidos a proteínas forman dímeros (PER-TIM) que se transportan al núcleo formando un tetrámero con CYC-CLOCK inhibiendo así indirectamente su propia transcripción (Devlin y Kay, 2001; Weber, *et al.* 2006). Otra proteína que interviene en el modelo es la proteína criptocromo (CRY) la cual actúa como una antena y absorbe fotones en la longitud de la luz azul y UV. Esta proteína contiene un cromóforo con una flavina adenina dinucleótido y participa en la

sincronización del reloj molecular al interactuar con TIM produciendo su degradación (Figura 1).

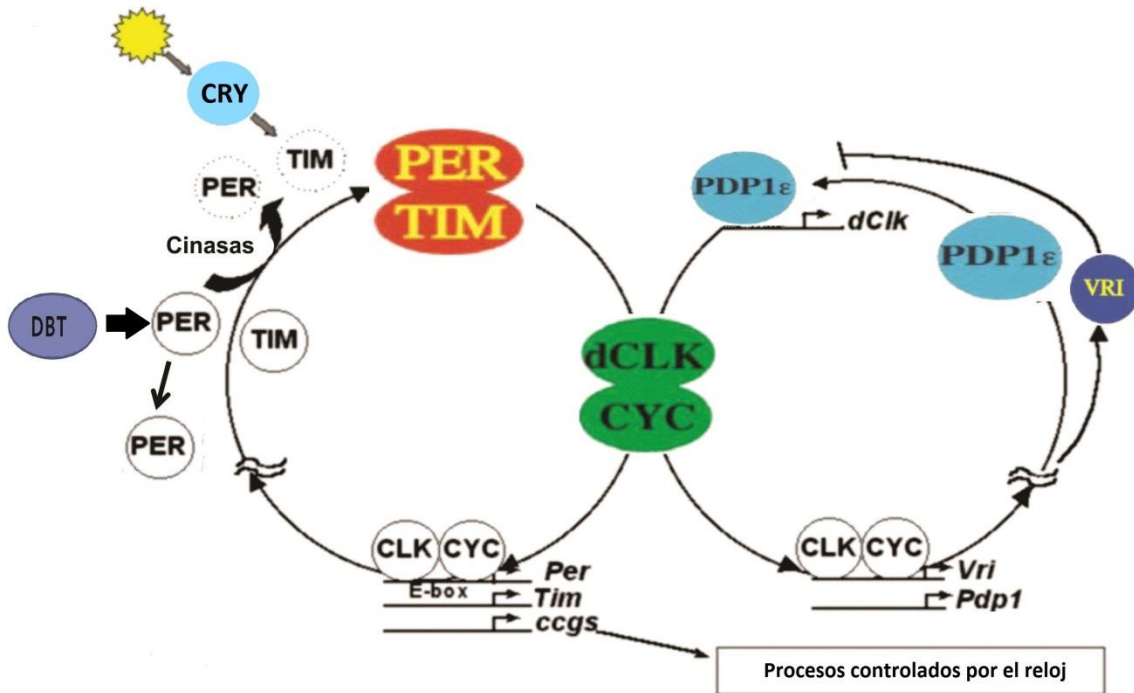


Figura 1. Modelo molecular del reloj circadiano de *Drosophila*. En el núcleo, el heterodímero CYC-dCLK se une a secuencias específicas en la caja E promoviendo la transcripción, por una parte de los genes *per*, *tim* y *ccgs* (los genes controlados por el reloj, que controlan directa o indirectamente la actividad de los ritmos manifiestos) y por otra los genes *vri* y *pdp1* cuyas proteínas regulan la actividad de CYC-dCLK. La proteína PER es fosforilada por la cinasa DBT, cuando CRY se activa por medio la luz produce la activación de TIM, que forma un heterodímero con PER, el cual se transloca al núcleo e inactiva a CYC-dCLK (Modificado de Paranjpe y Sharma, 2005).

3.1.3. Los criptocromos

Los criptocromos son flavoproteínas que funcionan en los sistemas biológicos como transductores y perdieron la capacidad de catalizar la reparación del DNA, son flavoproteínas tienen una región homóloga fotoliasa (PHR) que es un cromóforo antena que está formada por dos dominios: N-terminal (dominio fotoreactivo) (Mazzotta, *et al.* 2010) y uno helicoidal C-terminal en éste dominio se encuentra la flavina que en la oscuridad permanece en un estado oxidado (FAD_{ox}) pero con exposición a la luz azul la energía produce que se reduzca a través de la

transferencia de electrones llamándose flavina anionica semiquinona (FAD_{red}) generando cambios conformacionales en CRY que permiten su interacción con otras proteínas por ejemplo PER o TIM (Sancar, 2000; Rosato, *et al.* 2001; Öztürk *et al.*, 2008; Czarna *et al.* 2013). El gene *cry* se identificó inicialmente en las plantas superiores (*Arabidopsis thaliana*) y se han encontrado genes ortólogos y parálogos en insectos y vertebrados asociados a diferentes funciones, tales como una molécula de señalización que regula procesos fisiológicos durante la diapausa y la migración, como un fotopigmento que participa en la sincronización (Chaves, 2011), y además se han propuesto como magneto receptores en aves e insectos (Yoshii, *et al.* 2009).

En las plantas y en algunos insectos CRY es una molécula fotorreceptora particularmente de la región azul (420 a 480) del espectro electromagnético (Sancar, 2000), en tanto en los vertebrados y en especial en los mamíferos CRY 1 y CRY 2 participan en la génesis de las oscilaciones del reloj molecular. En algunos insectos se ha identificado a CRY2 como represor transcripcional y sin actividad fotorreceptora en peces y mamíferos, con excepción del pez cebra en el que posee ambas funciones (Collins, *et al.* 2006). Estos criptocromos tienen reducida la actividad de reparación del DNA o la han perdido, en su lugar participan en la señalización (Chaves, 2011). En el acocil, hasta ahora CRY se ha identificado como un fotorreceptor circadiano extrarretiniano que participa en la sincronización del ritmo locomotor (Fanjul-Moles *et al.* 2004; Sullivan *et al.* 2009).

En los animales los criptocromos se dividen en dos familias, por un lado la de los fotorreceptores llamados criptocromos tipo I. Este CRY en *Drosophila* actúa como un fotopigmento cerebral extrarretiniano, en presencia de la luz CRY se activa y transmite su señal a TIM, TIM se fosforila en residuos de tirosina, es ubiquitinado y tanto CRY como TIM son degradados vía proteosoma (Naidoo *et al.* 1999) a través de la actividad de una proteína específica la ligasa E3 (JETLAG) (Koh and Sehgal *et al.* 2006; Czarna *et al.*, 2011 y 2013). Se ha reportado la participación de otras cinasas además de CRY importantes para la sincronización del reloj en *Drosophila*,

la cinasa glucógeno sintasa GSK3 β y SHAGGY (SGG) y la fosforilación de TIM a través de la modulación de la serotonina (Yuan *et al.* 2005) sugiriendo que está vía forma parte de los mecanismos que regulan la sensibilidad del reloj circadiano a la luz. La ubiquitinación y degradación de TIM es dirigida por JETLAG, por lo que este sistema de señalización produce retrasos o adelantos en función de la presencia de TIM al unirse con PER, en las células del reloj y se ha señalado que también participa en la ritmicidad de tejidos periféricos (Koh *et al.* 2006). Por otra parte la familia de los criptocromos tipo II (CRY1 y CRY2 de mamíferos) son aquellos que no tienen sensibilidad a la luz, no reparan el DNA y están involucrados en la génesis de la ritmicidad circadiana (Chaves, 2011). Se ha demostrado que CRY participa en la regulación de la alimentación y en el metabolismo de *Drosophila* (Seay y Thummel, 2011). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo por el cual se transmite la señal de la luz al reloj molecular circadiano.

Por otra parte, PER es fosforilado por las cinasas “Doubletime” (DBT), la cinasa de caseína II y la proteína fosfatasa 2A, las cuales regulan su degradación, si TIM no es degradado se forma el dímero PER-TIM, otra cinasa involucrada es la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK3) encargada de la translocación de PER-TIM al núcleo (Weber *et al.* 2006).

3.2. Sincronización

Las señales temporales ambientales y sus variaciones en el medio externo son detectadas y transducidas por fotorreceptores circadianos que envían la información temporal cíclica mediante vías aferentes hasta los marcapasos que finalmente a través de vías eferentes sincroniza los ritmos fisiológicos y conductuales a la ciclicidad del ambiente (Figura 2).

Por lo tanto, las señales ambientales cíclicas juegan un papel fundamental en la sincronización, a esta señal se le ha llamado “zeitgeber” (ZT). La sincronización es el resultado del ajuste del periodo y la fase con el ciclo ambiental. Cuando el ritmo es sincronizado por un ciclo ambiental decimos que el ritmo es encarrilado o

entrenado (de “entrainment”, en inglés), es decir el “zeitgeber” arrastra al ritmo endógeno hasta ajustarlo a él.

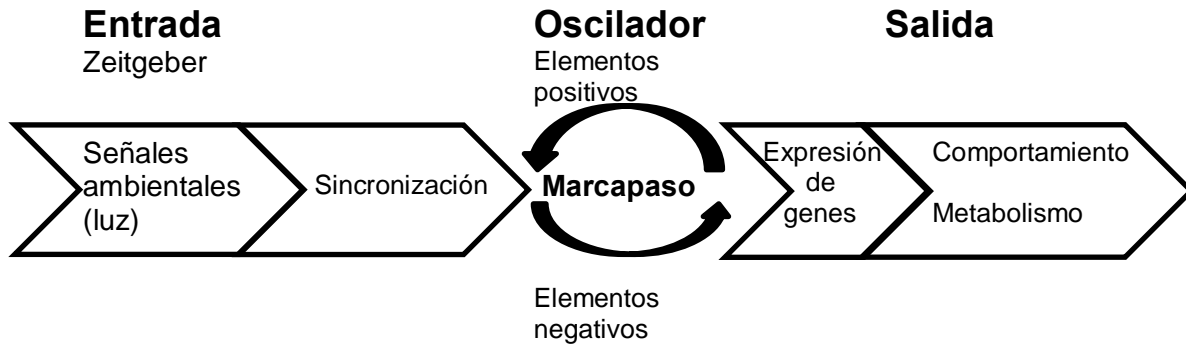


Figura 2. Organización del marcapaso circadiano. Muestra los componentes que componen las vías de entrada y de salida del marcapaso circadiano. Las señales ambientales (por ejemplo la luz) son detectadas y traducidas a través de las vías de señalización ajustando la fase y/o el periodo del marcapaso el cual está compuesto por elementos negativos y positivos, los cuales originan cambios en la expresión de genes del reloj y aquellos genes que son controlados por el reloj, para finalmente modificar la oscilación de los ritmos evidentes como es el metabolismo y el comportamiento.

Para demostrar que una variable ambiental es utilizada como señal de tiempo para el sistema circadiano se han establecido los siguientes criterios (Moore-Ede *et al*, 1982):

- Mostrar que un ritmo en oscilación libre bajo condiciones controladas tiene una independencia del periodo antes y después de exponer el animal a la señal ambiental.
- El control de periodo se establece cuando el animal es mantenido bajo el ciclo ambiental por lo que el periodo del ritmo circadiano se ajusta al periodo del ciclo ambiental.
- Control de Fase. Si se remueve la señal de tiempo, el ritmo comienza a oscilar libremente con una fase determinada por el ciclo del ambiental y no por el ritmo antes del encarrilamiento.

- La magnitud y el signo del efecto de los factores ambientales en la sincronización de los ritmos biológicos depende del ciclo endógeno en el que se aplique el estímulo, esto genera una relación de fase-respuesta que define los límites de la sincronización.
- Relación de fase estable. La relación de fase es estable, reproducible y se define como la diferencia en tiempos y en grados en el momento en el que se observa el ritmo biológico y el momento del sincronizador mostrando una dependencia impuesta únicamente por la señal de tiempo. Es decir, se dice que hay un control de fase cuando se retira el animal de la señal ambiental y se observa que el ritmo inicia su oscilación libre con la fase determinada por el ciclo ambiental y no por la fase que predeciría a partir del ritmo endógeno cuando está en oscilación libre.

3.2.1. La luz y la sincronización

Entre las señales ambientales que pueden ajustar al reloj circadiano destacan los cambios diarios de luz y oscuridad que son producto del movimiento de rotación de la Tierra. Una gran diversidad de especies está en constante exposición a las variaciones de luz y probablemente la adquisición de los ritmos endógenos fue un mecanismo de selección en la historia de la evolución biológica. La luz es la señal ambiental que ha sido más estudiada. Se ha demostrado que la luz ejerce diferentes efectos sobre el reloj circadiano, tanto de naturaleza paramétrica como no paramétrica. Se han diseñado experimentos en los cuales la aplicación de pulsos de luz discretos a diferentes horas del día puede tener un efecto en la fase de los ritmos circadianos, induciendo adelantos o atrasos de fase para sincronizar el ritmo a los distintos fotoperiodos diarios que se producen durante las estaciones. Se ha establecido que la luz tiene dos efectos sobre el reloj en función a su duración, primero si exponemos a pulsos breves de luz se generan cambios de fase en la expresión de los genes del reloj que inducen retardos de fase en la noche temprana y avances durante la noche tardía (Johnson *et al*, 2003), y segundo al exponer el reloj a una luz intensa y crónica se afecta el acoplamiento intercelular de las

neuronas que componen al marcapaso circadiano produciendo arritmia. Aunque la ritmicidad se recupera rápidamente al colocar a los organismos en oscuridad constante (Golombeck y Rosenstein, 2010).

3.3. La familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos.

La cascada de las proteínas cinasa activada por mitógenos (MAPK) está constituida por la familia serina/treonina cinasas y es clave para la regulación coordinada de la proliferación, supervivencia y diferenciación en las células eucariotas. Alteraciones en la regulación de la vía contribuye a diversas enfermedades. Se ha estudiado esta familia de proteínas desde las levaduras a los mamíferos, en donde su activación está relacionada con diversas respuestas como el control de la osmolaridad, la luz ultravioleta, los agentes genotóxicos, la inflamación, el choque de calor y el estiramiento mecánico; estas cinasas se encargan de la regulación de procesos moleculares como la transcripción, traducción, y síntesis de ácidos nucleicos (Madhani y Fink, 1998; Chen *et al.* 2001; Bennett *et al.* 2013; Roberts y Der, 2007).

Por otra parte, la familia de las MAPKs está generalmente definida por la identidad del aminoácido que separa al motivo treonina-X-tirosina (T-X-Y) involucrado en el dominio de activación de los miembros de esta familia, siendo T-Glu-Y (ERK), T-Gly-Y (p38) y T-Pro-Y (JNK). El papel de la fosforilación del sitio de activación de MAPK es clave en la comunicación celular en el funcionamiento del sistema nervioso, el desarrollo, las funciones fisiológicas y la homeostasis. La fosforilación puede ocurrir en el citoplasma y en el núcleo debido a que muchos blancos son factores o correguladores transcripcionales (Roux y Blenis, 2004; Sausedo y Gavilanes, 2005).

En los mamíferos las MAPK están organizadas en 7 grupos de acuerdo al motivo de activación del dominio cinasa, la especificidad de su sustrato y al estímulo extracelular que regula su actividad. La función principal de la vía es la de traducir

los estímulos extracelulares reconocidos por los receptores de la célula a un gran número de moléculas blanco que en relevo integran respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo inicial, ver figura 3 (Roux y Blenis, 2004; Cargnello y Roux, 2011).

Grupos:

- Las cinasas denominadas por su nombre en inglés Extracellular Signal Regulated Kinases (ERKs): ERK1/2 (44 y 42 KD), se expresan de manera ubicua, se activan en respuesta a factores de crecimiento y proliferación.
- Las cinasas ERK 5 son activadas por factores de crecimiento y destacan por su papel en la proliferación y diferenciación celular, en el desarrollo cardiovascular y diferenciación neuronal, auto-controla su translocación al núcleo (Nishimoto S y E. Nishida, 2006)
- Las cinasas activadas por estrés (SAPKs) así como las cinasas del extremo N-terminal del factor de transcripción c-jun (JNK): JNK1/2/3. Se activan en respuesta a múltiples formas de estrés ambiental y citocinas.
- Grupo de p38. En respuesta a citocinas, distintos tipos de estrés ambiental, endotoxinas e hiperosmolaridad.
- Las cinasas ERK 3/4, definida como una MAPK atípica con diferencias estructurales y funcionales a MAPK, se acumula durante la mitosis (Délérís *et al.* 2011).
- Las ERK 7/8. Sus funciones se han relacionado en la regulación de la proliferación y en respuestas hormonales.
- El grupo NKL (por sus siglas en inglés de Nemo-Like Kinase) es ortólogo de una proteína cinasa llamada Nemo, involucrada en la regulación de la β -catenina, y se han identificado que sus sustratos son factores de transcripción de la familia del factor potenciador linfóide /factor T-cell y STAT3.

Los primeros cuatro grupos forman parte de las MAPKs clásicas, en tanto el resto forma parte de las MAPKs atípicas porque no poseen el dominio de activación

que caracteriza a la familia o porque no se organizan en los tres niveles clásicos de activación de las MAPKs clásicas cinasas.

En general, las familias de MAPK tienen tres elementos consecutivos cuyo orden indica la manera en la que se activan: la MAPKKK (cinasa de la cinasa de la MAP cinasa), la MAPKK (cinasa de la MAP cinasa) y MAPK (MAP cinasa).

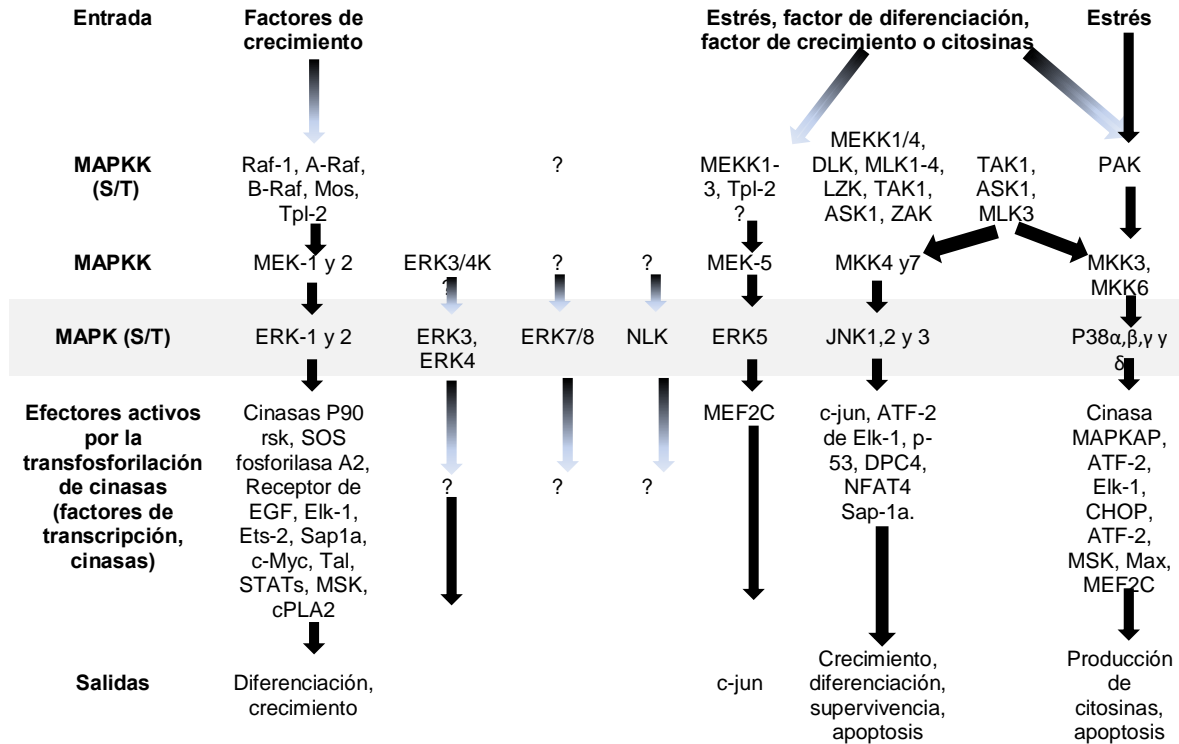


Figura 3. Esquema de las principales vías de MAP cinasa en mamíferos. Se activa cada vía por una señal específica que induce la fosforilación de un tipo de MAP mediante diferentes respuestas. Residuos serina/treonina (S/T). Las flechas negras indican activación. El signo de interrogación (?) indica que no se conocen los elementos que participan en la vía. (Roux y Blenis, 2004; Roberts y Der, 2007; Cargnello y Roux, 2011).

En la activación de MAPKKK, un receptor de la membrana plasmática activa moléculas intermediarias como PKC y las proteínas de unión a GTP de la familia de Ras/Rho activando por fosforilación a las serina/treonina cinasas MAPKKK cuyos sustratos pueden ser sitios de pleckstrina, secuencias ricas en prolina (dominios SH3), dedos de Zinc, cierres de leucina, secuencias de unión a proteínas G o los sitios serina/treonina de las MAPKKs, una región muy conservada entre los

subdominios VII y VIII, lo cual produce su activación para la fosforilación de MAPK en el subdominio VIII localizado en el asa de activación en el núcleo catalítico que es esencial para la actividad enzimática de esta última cinasa. La estructura de MAPK está formada por el dominio cinasa que contiene el núcleo catalítico Tyr-X-Thr y el dominio CD (del inglés Common Docking, anclaje común) que permite la interacción con otras proteínas como las fosfatasas. Las cascadas MAP cinasa forman complejos que facilitan su localización, activación serial y la restricción de la señal (Saucedo y Gavilanes, 2005; Cargnello y Roux; Pearson *et al.* 2001).

3.3.1. ERK

Las isoformas ERK1 y ERK2 son componentes ejecutores de la vía MAPK y son formas evolutivamente conservadas que se originan a partir de dos genes *erk1* (*mapk3*) y *erk2* (*mapk1*) y que producen unas proteínas de 44 y 42 KD respectivamente. También se forman otras proteínas a través de la codificación de estos genes por “splicing” como ERK1b (46KD) y ERK1C (42 KD). ERK-1 y ERK-2 son proteínas con un alto grado de similitud, son ubicuas y sus propiedades bioquímicas son similares, también se coexpresan en gran variedad de tejidos y líneas celulares (Voisin *et al.* 2010; Wotzel y Seger, 2011).

La activación de la cascada ERK 1/2 inicia a través de los receptores de tirosincinasas (RTK), los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), los canales iónicos o la mayoría de los receptores para citosina que transmiten la señal a través del reclutamiento de proteínas adaptadoras por GRB2 y SOS que activan a Ras, esto ocurre en la membrana plasmática o en la membrana de los organelos. La activación de Ras-GTP estimula la formación de complejos de señalización formados por tres proteínas Raf-1, B-Raf y A-Raf (Rafs). Se ha propuesto que otros componentes también pueden participar en la activación de ERK1/2 como c-Mos, el proto-oncogen TPL2 y MEKK1 que actúan en condiciones de estrés. Posteriormente activan por fosforilación a MEK1/2 y estos últimos activan específica y completamente a ERK1/2 en los residuos Thr-X-Tyr. ERK1/2 tiene cerca de 200

sustratos, entre los cuales se encuentran elementos del citoesqueleto, PLA2 citoplasmático, dominios intercelulares de receptores de membrana, proteínas cinasas como la ribosoma cinasa S6 y factores de transcripción como Elk-1, c-Fos y c-Jun, (Nishimoto y Nishida, 2006; Wotzel y Seger, 2011).

3.3.2. JNK

JNK es una proteína cinasa que se activa por estrés en respuesta a la inhibición de la síntesis de proteínas como la ciclohexamida anisomicina, las citosinas inflamatorias, el factor de necrosis tumoral (TNF α) y IL-1, cambios de la osmoralidad, shock de calor y radiación ultravioleta (Coso *et al.* 1995).

Tres genes codifican para la proteína JNK: α , β y γ con 12 isoformas producto del splicing alternativo. Miembros de los grupo de MEKK (1/2), el grupo ASK, TAK1 y Tpl2, DLK, MLK1-4 y ZAK pueden activar la vía de JNK, éste último se puede unir al N-terminal fosforilando a el factor de transcripción c-Jun (Ser63-Ser-73) un componente del complejo transcripcional AP-1, que regula la expresión de genes de citocinas, y genes relacionados con la respuesta a estrés ambiental, la radiación, la activación de factores de crecimiento e incluso la transcripción positiva de su propio gen c-Jun. Los sustratos conocidos de JNK son c-jun, ATF-2 de Elk-1, p-53, DPC4, NFAT4 y Sap-1, estos factores pueden regular positivamente a c-Fos incrementando la expresión de la proteína c-Fos. JNK también puede fosforilar a los factores de transcripción relacionados con Ets, JunB y Jun D (Manning *et al.* 2002; Zhan y Lui, 2002).

3.3.3. El reloj circadiano y la vía de señalización de las MAPK

Para identificar los mecanismos de transducción de señales implicados en el proceso de sincronización se tienen que cumplir los siguientes criterios (Butcher *et al.* 2002):

-La activación de la vía de manera rápida como respuesta a la exposición a la luz.

-Que la activación se limite a la noche subjetiva (puesto que es la zona de sensibilidad circadiana)

-Que la vía se acople a la activación de factores de transcripción. Proponiendo que los productos génicos recién transcritos pueden regular al reloj estableciendo el circuito de transcripción/traducción que genera un ritmo.

Estos criterios plantean que una vía de transducción de señales puede desempeñar un papel central en la sincronización si la entrada fótica ajusta la fase del periodo de la oscilación circadiana. En los mamíferos se ha demostrado que durante la estimulación luminosa del núcleo supraquiasmático (estructura en donde reside el marcapaso circadiano) durante la noche se produce una rápida activación de la vía MAPK-ERK, en tanto la interrupción farmacológica de la vía durante la exposición a la luz produce un desacople de la vía fótica de la sincronización en el ritmo de actividad locomotora. Sin estimulación luminosa este mismo tratamiento produce una interrupción transitoria de la vía MAPK que no altera la fase del ritmo de actividad locomotora (Butcher *et al.* 2002; Hainich *et al.* 2006). Por otra parte también se han encontrado ritmos circadianos de P-ERK1/2 en el núcleo supraquiasmático (Pizzio *et al.* 2003, Hainich *et al.* 2006), señalando que la cascada ERK/MAPK puede tener un papel importante a través de la estimulación fótica en la fosforilación del factor de transcripción CREB (Obrietan *et al.* 1998). En cambio la inhibición farmacológica de ERK atenúa los avances de fase del ritmo locomotor, sugiriendo que es necesario que ERK se encuentre desfosforilado para que la luz pueda inducir cambios de fase, mientras una fosforilación de ERK constitutiva bloquea los cambios de fase inducidos por la luz (Butcher *et al.* 2002; Coogan y Piggins, 2003; Hainich *et al.*, 2006).

También se ha demostrado en los mamíferos que otros elementos pueden formar parte de la señalización para la sincronización como los eventos postsinápticos que incluyen la activación del receptor de glutamato, PACAP y el calcio intracelular, las proteínas cinasas de calcio calmodulina (CaMK), el óxido nítrico y la proteína cinasa G en el marcapasos de los mamíferos y por lo tanto en la generación de cambios de fase producido por la luz en la transcripción de los

genes inmediatos tempranos (IEGs), los genes del reloj y en los registros de actividad locomotora (Butcher *et al.* 2002; Roenneberg y Merrow, 1998).

Se ha reportado que otras vías de señalización MAPK como p38 (Pizzio *et al.* 2003; Petrzika *et al.* 2009) y JNK también están involucradas en la regulación de la respuesta a la luz y la sincronización del reloj circadiano.

La activación de JNK 1-3 está relacionada a una variedad de señales ambientales como la hiperosmolaridad y la exposición a la radiación ultravioleta, las cuales pueden transmitir su activación al complejo Bmal1-CLOCK, elementos de regulación positiva del reloj cuyo efecto se ha observado en la velocidad de la oscilación y la fase del reloj circadiano en respuesta a la luz, produciendo cambios en el ritmo de actividad locomotora (Yoshitane *et al.* 2012) y que tiene un control sobre el periodo del gen *per1* en el núcleo supraquiasmático y en otros tejidos del ratón pero no sobre *per2* (Chansard, *et al.* 2007).

3.3.4. El modelo de molecular.

En mamíferos la vía de MAPK/ERK ha sido la más estudiada en relación a la sincronización del reloj circadiano en el núcleo supraquiasmático (NSQ).

En el pez cebra un subconjunto de criptocromos están especializados en detectar luz azul transduciendo la señal a través de la vía MAPK para modificar la actividad de la maquinaria transcripcional (Cermakian *et al.* 2002). Se ha reportado que la luz azul induce la expresión de genes como *per2* y *cry1a*, y la vía MAPK/ERK está participando como un regulador negativo de la transcripción, por lo tanto, CRY no solo forma parte de la fotorrecepción (vía PKC-MAPK) también puede participar como elemento de la maquinaria del reloj molecular (Mracek *et al.* 2013; Yu *et al.* 2007). Se ha demostrado que la activación de la transcripción de CLK/CYC es regulada por calcio/CaMK II, nucleótidos cíclicos/PKA y la vía Ras/MAPK (Weber *et al.* 2006).

3.4. El acocil *Procambarus clarkii*, un modelo para el estudio de los ritmos circadianos

En el grupo de los crustáceos se ha destacado el acocil *P. clarkii* como un modelo para la comprensión de los mecanismos del reloj circadiano y su interacción con el medio ambiente. En el acocil ha demostrado que diversos tejidos presentan oscilaciones endógenas con periodos cercanos a 24 horas y se ha sugerido que son inducidas por un marcapaso central, el cual organiza las oscilaciones de estos tejidos o relojes periféricos o por varios osciladores que conservan una relativa independencia (Strauss y Dickson, 2010). Se ha propuesto que el sistema circadiano del acocil es un sistema multioscilar distribuido jerárquicamente en donde aún no se ha determinado si se encuentra orquestado por un reloj maestro o por varios osciladores que conservan una relativa independencia (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003, Strauss y Dirksen, 2010). En general se considera que el sistema circadiano se localiza en al menos tres estructuras marcapaso: 1) el complejo retina-lámina ganglionaris 2) el lóbulo óptico que conforma el sistema neurosecretor glándula sinusal-órgano X y 3) el ganglio cerebroide que contiene los fotorreceptores circadianos. Además de que se ha propuesto, aunque no se ha comprobado que algunos ritmos podrían sincronizar por medio de la luz a través de dos vías de entrada, los receptores retinianos y extraretinianos (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997; Rodríguez-Sosa *et al.* 2008), los cuales pueden activar vías de señalización intracelular produciendo cambios rítmicos bioquímicos, moleculares, fisiológicos y conductuales que les permitan adaptarse y anticiparse a los cambios ambientales.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha identificado inmunoreactividad a CRY en el complejo lámina terminalis-cuerpo hemilipsoidal y en células del protocerebro anterior, además de que esta proteína se encuentra oscilando circadianamente en estas estructuras. Esto sugiere que CRY participa en la vía de transducción de la luz al reloj circadiano del acocil y que tiene un efecto sobre la sincronización de los ritmos de amplitud del electroretinograma y de actividad locomotora (Bernal-Moreno *et al.*, 1996; Fanjul-Moles, *et al.* 2004; Sullivan *et al.*,

2009)–pero quizá también que podría participar como un elemento del mismo reloj. Por otra parte se ha reportado inmunoreactividad a PER (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998; Escamilla-Chimal *et al*, 2010), TIM y CLK en el núcleo y citoplasma en células de la retina, lóbulo óptico y el ganglio cerebroide en *P. clarkii* presentando ritmos diarios y/o circadianos, y su colocalización, sugiriendo la interacción de estas proteínas y los factores de transcripción negativos y positivos, elementos que forman parte del modelo canónico del marcapaso circadiano en diversos organismos. Sin embargo, no se han caracterizado la vía de señalización por la cual el reloj circadiano se sincroniza a la luz activando a CRY.

4. Planteamiento del problema

El reloj circadiano se puede ajustar por factores externos, de manera particular, la luz puede desencadenar una serie de cambios en las vías de señalización produciendo cambios en la fosforilación de proteínas cinasas, como se ha demostrado en otros modelos (Lamb *et al.* 2012; Mracek *et al.* 2013; Antoun. *et al.* 2012) de lo que resulta o bien la sincronización del reloj circadiano o la activación de factores de transcripción que activan genes reloj.

En los crustáceos y en particular en *P. clarkii* no se ha demostrado ni la presencia de MAPK, ni su posible participación fisiológica en el sistema circadiano mediante una posible interacción con la proteína CRY.

Por lo anterior surgen las siguientes preguntas: ¿Interviene la MAPK en las vías de señalización luminosa del reloj circadiano del acócil? Si MAPK forma parte de la vía de fotosincronización del reloj, ¿interacciona con CRY?

Al tratar de contestar estas preguntas nos resultó interesante conocer si la participación de la vía MAPK ocurre a través de la activación de ERK y JNK, dos proteínas cinasas que previamente han sido descritas como elementos involucrados en el ajuste del reloj circadiano en los vertebrados y que producen cambios de fase en la noche subjetiva.

5. Hipótesis

General

La proteína CRY participa en la sincronización a la luz del sistema circadiano del acocil a través de la vía de señalización MAPK (ERK).

Particulares

1. Tanto ERK como JNK forman parte de la maquinaria del reloj molecular del acocil y se localizan en las estructuras propuestas como marcapasos, oscilando de manera circadiana. Los inhibidores de MAPK afectarán esta oscilación.
2. Si CRY interviene en la vía de sincronización a través de ERK, por lo que la irradiación con luz azul a horas de sensibilidad circadiana afectará esta posible relación.
3. Si MAPK forma parte de la vía que participa en la sincronización su inhibición tendrá un efecto en la regulación de proteína CRY un elemento que muestra oscilaciones circadianas en el acocil.

6. Objetivos

1. En condiciones de luz oscuridad-oscuridad (LO) y oscuridad constante (OO) se disecarán y procesarán mediante la técnica de ELISA la retina, el lóbulo óptico y el ganglio cerebroide para determinar la presencia y abundancia de las proteínas CRY, ERK y JNK cada 4 horas hasta completar un ciclo de 24 horas. Los resultados se analizarán con el programa de COSINOR.
2. Los tres marcapasos propuestos se irradiarán con luz azul a una hora de mayor sensibilidad del sistema circadiano (noche subjetiva temprana) (datos del laboratorio), determinando la abundancia cíclica de las proteínas CRY y ERK y JNK.

3. Antes de la irradiación los tejidos marcapasos serán tratados con un fármaco inhibidor selectivo de MEK-1 y MEK-2 con un vehículo, determinándose a posteriori la expresión cíclica de las proteínas CRY y MAPK.

7. Materiales y métodos

7.1. Animales

Para el estudio se utilizaron 77 animales adultos de la especie *Procambarus clarkii* en intermuda, sin distinguir entre el sexo, los cuales fueron colectados en Chihuahua, México. Los animales se colocaron en acuarios airados, a una temperatura $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en ciclos de luz-oscuridad 12:12, iniciando a las 08:00 h, durante aproximadamente 15 días. Los animales se alimentaron con camaronina *ad libitum*.

Después de la aclimatación los organismos se separaron en cinco grupos. El primer grupo fue sacrificado para obtener el muestreo de 6 horas de un ciclo de 24 horas (4, 8, 12, 16, 20 y 24 h, para cada hora se tomaron tres animales). El segundo grupo se mantuvo en condiciones de oscuridad constante por 72 h y se muestreo a las mismas 6 horas que el primer grupo; el tercer grupo mantenido en LO 12:12 con un pulso de luz azul en ZT14 con luz monocromática azul (420nm) a una intensidad de 1.93×10^{13} fotones/seg con una duración de 1 hora, y sin volver a encender la luz blanca se muestreo al día siguiente en las mismas horas que el primer grupo.

En el cuarto grupo en condiciones de LO 12:12 (formado por 5 animales) se aplicó una inyección de 50 μl de disolución del inhibidor U0126 (19-147, MERK) a una concentración de 100 μM diluido en DMSO al 1% y Van Harvel (pH 7.4) a cuatro animales en el pedúnculo ocular en ZT22. Se disecó cada animal cada 30 minutos hasta a completar dos horas después de la inyección. A otro animal son se le inyectó el fármaco y se diseco en ZT 24. Éste grupo mostró el efecto del inhibidor sobre las proteínas CRY, ERK y JNK.

En el quinto grupo de animales en LO12:12 se le aplicó una inyección en el tallo ocular el fármaco U0126 100 μ M con el vehículo DMSO al 1% y VH (50 μ l) una hora antes del pulso de luz azul en ZT14 y se muestreó al día siguiente a las mismas horas que el primer grupo y sin encender la luz blanca.

7.2. Disecciones y procesamiento de muestras

Durante el muestreo se tomaron los animales correspondientes en las diferentes horas para hacer las disecciones en VH. Primero se decapitó el animal en luz roja, se disecó el cerebro y los tallos oculares separando con una navaja las retinas de los lóbulos ópticos, se retiraron los restos de retina que quedaron en los lóbulos ópticos. Cada tejido fue colocado por separado, las retinas en 175 μ l de amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.4 y 25 μ l de reactivo de extracción "phosphosafe" (Novagen, 71296) para los cerebros y lóbulos ópticos en 25 μ l de PBS pH 7.4 y 25 μ l de reactivo de extracción "phosphosafe" en frío.

Todas las muestras se homogenizaron y centrifugaron durante 10 minutos a 15000 g. Se retiró el sobrenadante y se mantuvo en nitrógeno líquido para los siguientes ensayos. El sedimento fue desechado.

7.3. Determinación de proteínas (microensayo)

Para la cuantificación espectrofotométrica de las proteínas se utilizó el ensayo de Bradford. Se preparó un stock de albumina de suero bovino (BSA) (0.5 mg de BSA en 10 ml de agua desionizada) y se determinó la absorbancia de 0.33 a 280 nm. Una vez que se determinó la absorbancia de la BSA, preparar las diluciones como se muestra en la tabla A del apéndice de BSA con cloruro de sodio 0.15M con sus triplicados para construir la curva escalada. Para la determinación de las muestras se tomó 0.1 μ l de retinas, 0.2 μ l de lóbulos ópticos y ganglio cerebroide y se agregó el NaCl (0.15M) hasta completar un volumen de 15 μ l todo esto por triplicado, finalmente se agregó el reactivo de Bradford (Bio-Rad, 500-0203). Después de 20 minutos se obtuvo la absorbancia a 595 nm. Por medio de la curva estándar se calculó la cantidad de proteína total necesaria para realizar el ensayo de ELISA.

7.4. Técnica de ELISA

Las ventajas de la técnica de ELISA son numerosas por poseer una alta sensibilidad y especificidad; la rapidez por su fácil manejo, y por otra parte es económica y versátil. Además de la posibilidad de realizar un gran número de determinaciones en placas de microtitulación en un corto periodo de tiempo y su reproducibilidad en los resultados.

La modalidad del método de ELISA utilizada para el presente estudio es el método indirecto que permite la detección de los anticuerpos y su cuantificación. En una placa en el que se fija el antígeno problema (10 o 20 ug de proteína total de cada tejido), se agregó un anticuerpo primario policlonal anti-CRY de *Drosophila* **anti-dCRY** producido en conejo (CRYD13-A, Alpha Diagnostic) cuyo antígeno es una secuencia peptídica de 18 aminoácidos que contienen el C-terminal del CRY de *Drosophila*; el anticuerpo primario monoclonal **p-ERK** (E-4) (sc-7383, Santa Cruz Biotechnology) que detectan a la proteína fosforilada en la tirosina 204 de ERK1 y ERK2 en ratón, rata y humano. Esta fosforilación se encuentra en un motivo Thr-Glu-Tyr, en donde pThr y pTyr son necesarios para la activación enzimática de ERK; y el anticuerpo monoclonal **p-JNK** (G-7) (sc-6254, Santa Cruz Biotechnology) que detecta las proteínas fosforiladas JNK1, JNK2 y JNK3 en los residuos de Thr 183 y Tyr185 de ratón y humano que se encuentran en el motivo Thr-Pro-Tyr en respuesta a la radiación ultravioleta, se describe como un motivo divergente del motivo característico de las MAPK, todos a una dilución de 1:1000. Posteriormente se adiciona un anticuerpo secundario para CRY anti-conejo IgG (H+L)- Alk (20350, Alpha Diagnostic) y para ERK y JNK el anticuerpo secundario anti-ratón IgG (H+L)- AP (GTX85314, Genetex), ambos a una dilución de 1:2500. Estos anticuerpos secundarios tienen conjugada una enzima fosfatasa alcalina que reacciona con el sustrato p-nitrofenil fosfato disódico hexahidratado (PNPP; sc-3720, Santa Cruz Biotechnology) y produce un producto colorido, de mayor intensidad cuando mayor sea la cantidad de inmunocomplejos específicos formados. La valoración

colorimétrica se realizó por espectrofotometría, en un lector de microplacas (Absorbance Microplate Reader, Modelo ELx800) que de manera automática mide a 405nm la densidad óptica (DO) de cada muestra. Los valores obtenidos en las muestras problema se compararon con los valores de referencia predeterminados en la curva de calibración correspondiente para cada proteína en concentraciones conocidas de antígenos. También se evaluaron los elementos que interviene en la reacción como son los controles, el soporte sólido en relación a la fijación del antígeno; la calibración de las muestras problema, la dilución de los anticuerpos primarios y secundarios; los tiempos de incubación y los lavados. Lo anterior se llevó a cabo tomando como referencia el protocolo de ELISA de Santa Cruz Biotechnology.

Las curvas de calibración fueron construidas utilizando como antígeno el péptido control/bloqueo correspondiente para dCRY (CRYD-13P, Alpha Diagnostic), ERK (sc-7383P, Santa Cruz Biotechnology) y JNK (sc-6254P, Santa Cruz Biotechnology). Cada punto de la curva se realizó en triplicados y se repitió la curva en cada grupo experimental.

También utilicé los respectivos controles para la fosforilación de ERK Hela+irradiated UV Cell Lysate (sc-2221, Santa Cruz Biotechnology) y la fosforilación no activa Hela Whole Cell Lysate (sc-2200, Santa Cruz Biotechnology); y en el caso de la fosforilación de JNK Raw 264.7+UV Cell Lysate (sc-24769, Santa Cruz Biotechnology).

Las etapas que comprenden la ELISA indirecta son las que siguientes:

- Cubrir las microplacas de 96 pozos (sc-204463, Santa Cruz Biotechnology) con los blancos (contienen solamente solución de carbonatos 0.1M, pH 10.3), los puntos de la curva, las muestras problema y los controles positivos y negativos respectivamente, cada uno por triplicado y diluidos en 50 μ l de solución de carbonatos 0.1M, pH 10.3.

- Incubación: unión del antígeno siendo éste el péptido control conocido, los controles y muestra problema durante toda la noche a 4°C.
- Lavado de los pocillos para eliminar el exceso de antígeno no unido con solución de carbonatos 0.1M, pH 10.3.
- Bloqueo de la placa con 50 µl de solución bloqueo BSA ELISA (sc-293965, Santa Cruz Biotechnology) por pozo durante 2 horas a 4°C.
- Adición del anticuerpo primario previamente diluido en 50 µl de solución bloqueo BSA ELISA para anti-CRY, anti-ERK y anti-JNK según corresponda el ensayo.
- Incubar el anticuerpo primario a 4°C, durante 72 horas.
- Tres lavados consecutivos con solución PBS ELISA pH7.4 con Tween-20 al 0.05%
- Adición del anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina disuelto en 50 µl de solución bloqueo ELISA, según corresponda el ensayo. No se agrega en los blancos.
- Incubar el anticuerpo secundario a 4°C por 2 horas.
- Tres lavados consecutivos con solución PBS ELISA pH7.4 con Tween-20 al 0.05%.
- Retirar la solución y dejar secar la placa.
- Lavado de 50 µl de solución tamponada de dietanolamina 0.001M DEA, 0.5 mM MgCl₂, pH 9.8 y NaN₃ 0.01% (980831, MP Biomedicals)
- Adición del sustrato PNPP, previamente diluido en la solución tamponada de dietanolamina en una concentración de 1mg/ml, 50 µl para cada pozo.
- Incubación con el sustrato durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Detener la reacción con 50 µl de solución EDTA 0.1M, pH 7.5.
- Lectura de la placa a 405 nm.

7.5. Análisis de resultados

Una vez obtenidas la DO de las muestras se calculó la cantidad de proteína CRY, p-ERK o p-JNK con respecto a sus respectivas curvas de calibración. La abundancia de la proteína de interés se expresó en las gráficas como la cantidad de proteína (CRY, p-ERK o p-JNK) en picogramos (pg) en relación a 20 000 nanogramos (ng) de proteína total que estaba contenida por cada pozo de la placa de microtitulación.

Se obtuvo el promedio para cada hora del muestreo por condición y se realizaron los cronogramas correspondientes en el programa SigmaPlot 2001 (versión 7.0), en cada uno se señala el ZT y/o tiempo externo con respecto a la condición experimental. También se graficaron los resultados obtenidos en los animales inyectados con U0126 100 μ M en ZT22 y muestreados cada 30 minutos durante dos horas.

Puesto que las cantidades obtenidas para las diferentes proteínas fueron pequeñas para poder analizarlas mediante el análisis de cosinor todos los datos fueron multiplicados por 1000. El análisis de Cosinor realiza un ajuste por mínimos cuadrados y asume que los datos están distribuidos en una onda sinusoidal en base al periodo de prueba (τ), lo que permite realizar una prueba objetiva de la hipótesis si la amplitud es diferente a cero, además de señalar el porcentaje del ritmo de los datos que fueron analizados. El ritmo es significativo si p es ≤ 0.05 (Vega, 1993; Reinberg and Smolensky, 1983). El análisis estadístico se hizo con el software COSANA (A. Benedit Silva, GMDRB, Departamento de Fisiología y Biofísica. ICB/UPS, Brasil); también se realizó el análisis de Anova para un factor con el software IBM SPSS Statistic (versión 21.0.0.0). Tanto el análisis de cosinor como el de Anova se realizaron tomando en cuenta el ZT o el tiempo externo según corresponda a la condición experimental.

8. Resultados

8.1. Curvas de calibración

A continuación se muestran las curvas de calibración representativas obtenidas para el ensayo de ELISA.

La curva de la proteína CRY se obtuvo a partir del péptido de control de CRY (CRYD-13P, Alpha Diagnostic) las diluciones son 0, 0.0099, 0.00195, 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.0313, 0.0625 y 0.125 ng en 50 µl de solución de carbonatos 0.1M, pH 10.3, se muestra la ecuación de la recta ajustada en la Figura 4 con un coeficiente de determinación (R^2) el cual indica qué tanto de la variabilidad total observada en Y puede explicarse por la relación lineal entre X y Y, en este caso $R^2=0.939$.

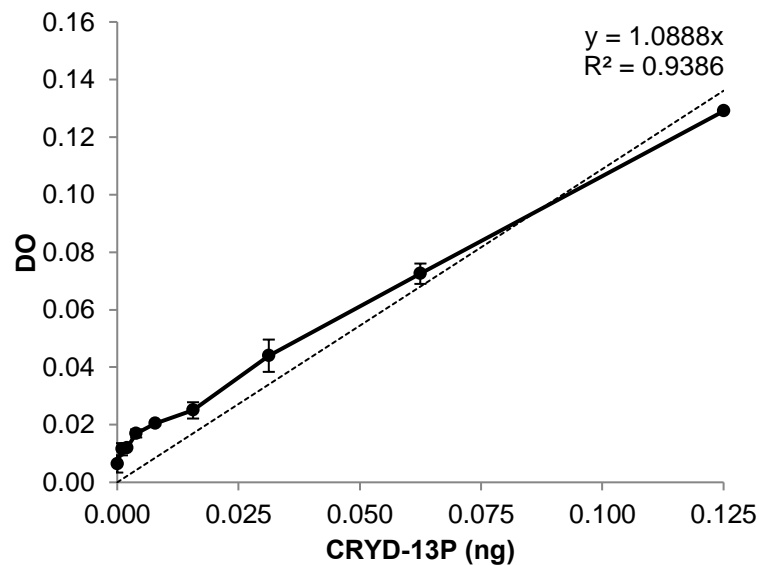


Figura 4. Curva de calibración de CRYD-13P obtenida por Elisa. La dilución del anticuerpo primario fue 1:1000. Los valores son medias para cada concentración \pm s.e.m. La línea punteada la regresión lineal, se indica la ecuación.

La curva de calibración de p-ERK (Figura 5) se construyó con el péptido control p-ERK (sc-7383P, Santa Cruz Biotechnology) las diluciones que se utilizaron son:

0.0000, 0.0019, 0.0038, 0.0076 y 0.015 ng en 50µl de solución de carbonatos 0.1M, pH 10.3.

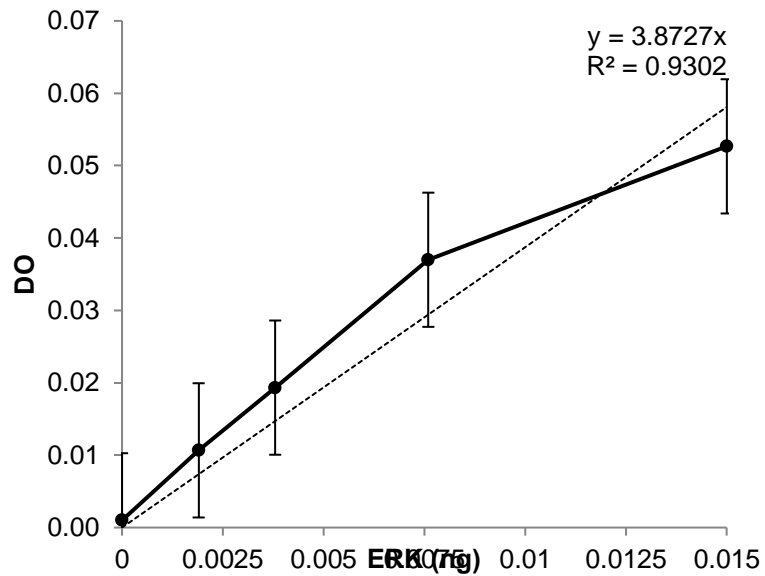


Figura 5. Curva de calibración de p-ERK (sc-7383P, Santa Cruz Biotechnology) para la técnica de Elisa. La dilución del anticuerpo primario p-ERK fue 1:1000. Los valores son medias para cada concentración \pm s.e.m. La línea punteada la regresión lineal, se indica la ecuación.

En la curva de calibración de p-JNK (Figura 6) se construyó con el péptido control (sc-6254P, Santa Cruz Biotechnology), las diluciones que se utilizaron son: 0.0000, 0.0019, 0.0038, 0.0076, 0.015, 0.030, 0.060, 0.120, 0.24 y 0.48 ng en 50µl de solución de carbonatos 0.1M, pH 10.3.

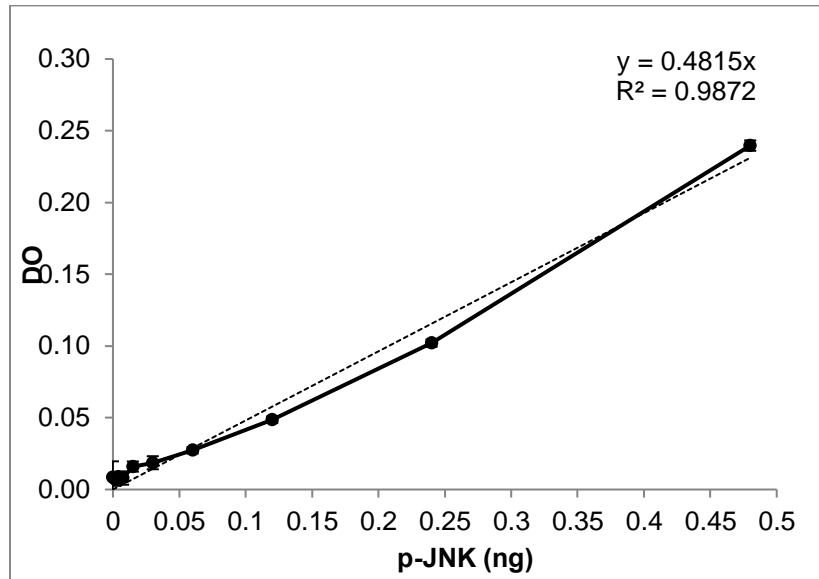


Figura 6. Curva de calibración de p-JNK (sc-6254P, Santa Cruz Biotechnology) obtenida por Elisa. La dilución del anticuerpo primario p-JNK fue 1:1000. Los valores son medias para cada concentración \pm s.e.m. La línea punteada la regresión lineal, se indica la ecuación.

Los controles positivos y negativo para p-ERK y p-JNK se muestran a continuación (Figura 7):

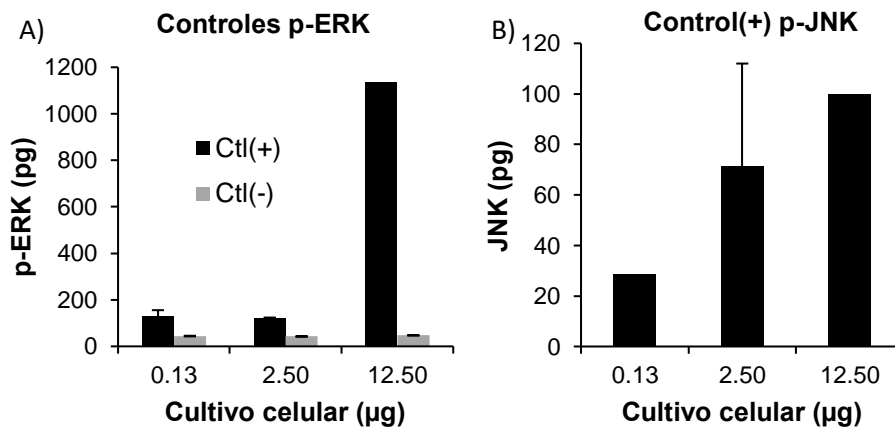


Figura 7. Controles positivos y negativo. Se muestra A) Controles para p-ERK. Se utilizó el control positivo de la fosforilación el cultivo celular Hela+irradiated UV Cell Lysate (sc-2221, Santa Cruz Biotechnology) y el control negativo de la fosforilación el cultivo celular Hela Whole Cell Lysate (sc-2200, Santa Cruz Blotechnology). B) Control de p-JNK. El control positivo utilizado es el cultivo celular Raw 264.7+Cell Lysate (sc-24769). Se muestra para cada gráfica la cantidad de cultivo celular utilizado: 0.13, 2.50 y 12.50 µg de cultivo en 50µl de dilución. n=3

8.2. Efecto del inhibidor U0126

El U0126 es un inhibidor selectivo de la activación de la proteína cinasa (MEK), es decir inhibe la capacidad de fosforilar a ERK. Este fármaco ha sido utilizado ampliamente como un inhibidor de ERK-1 y ERK-2 hasta 100 veces más potente que PD098059 (U0126 IC_{50} =50-100nM), es un inhibidor débil de PKC, Raf, JNK, MEKK, MKK-3, Mkk-4/SEK, MKK-6, Abl, Cdk2 y Cdk4 (Hitian Q, *et al*, 2009).

Para conocer el efecto del inhibidor en el grupo cuatro en la abundancia de CRY, p-JNK y p-ERK se obtuvo los siguientes resultados con 100 μ l de U0126 (ZT22) y muestran en la figura 8.

El efecto de 100 μ l del inhibidor U0126 después de 30 minutos de la inyección comparado con animal en el que no se inyectó el fármaco (ZT24) es mayor, en tanto, en los siguientes tiempos (ZT23, 23.3 y 24) incrementa la abundancia de D-CRY en la retina (figura 8A). Si comparamos la cantidad de esta proteína con la abundancia obtenida en el cronograma LO 12:12 en retina (figura 10) en ZT20, e incluso comparado con el máximo obtenido en esta condición, el resultado es un incremento de la abundancia de D-CRY. En el lóbulo óptico no se observa ningún efecto durante las dos horas (figura 8D). En el ganglio cerebroide, la cantidad de D-CRY es menor que el animal en el que no se le inyectó el inhibidor (figura 6, datos no significativos), sin embargo se observa una mayor abundancia de D-CRY con respecto a los resultados obtenidos en LO 12:12 tanto en lóbulos ópticos como en retina (figuras 8D y G; y figuras 9D y G).

En las figuras 8B, E y H se observa la disminución de p-ERK en los diferentes tiempos después de la inyección de U0126 comparados con el animal no inyectado.

El U0126 es un inhibidor específico para ERK sin embargo se probó el efecto en la actividad JNK. En el caso de la retina este inhibidor no tuvo efecto en p-JNK, mientras en los resultados del lóbulo óptico y en el ganglio cerebroide en algunas horas se observa un incremento de p-JNK (ver figuras 8C, F e I)

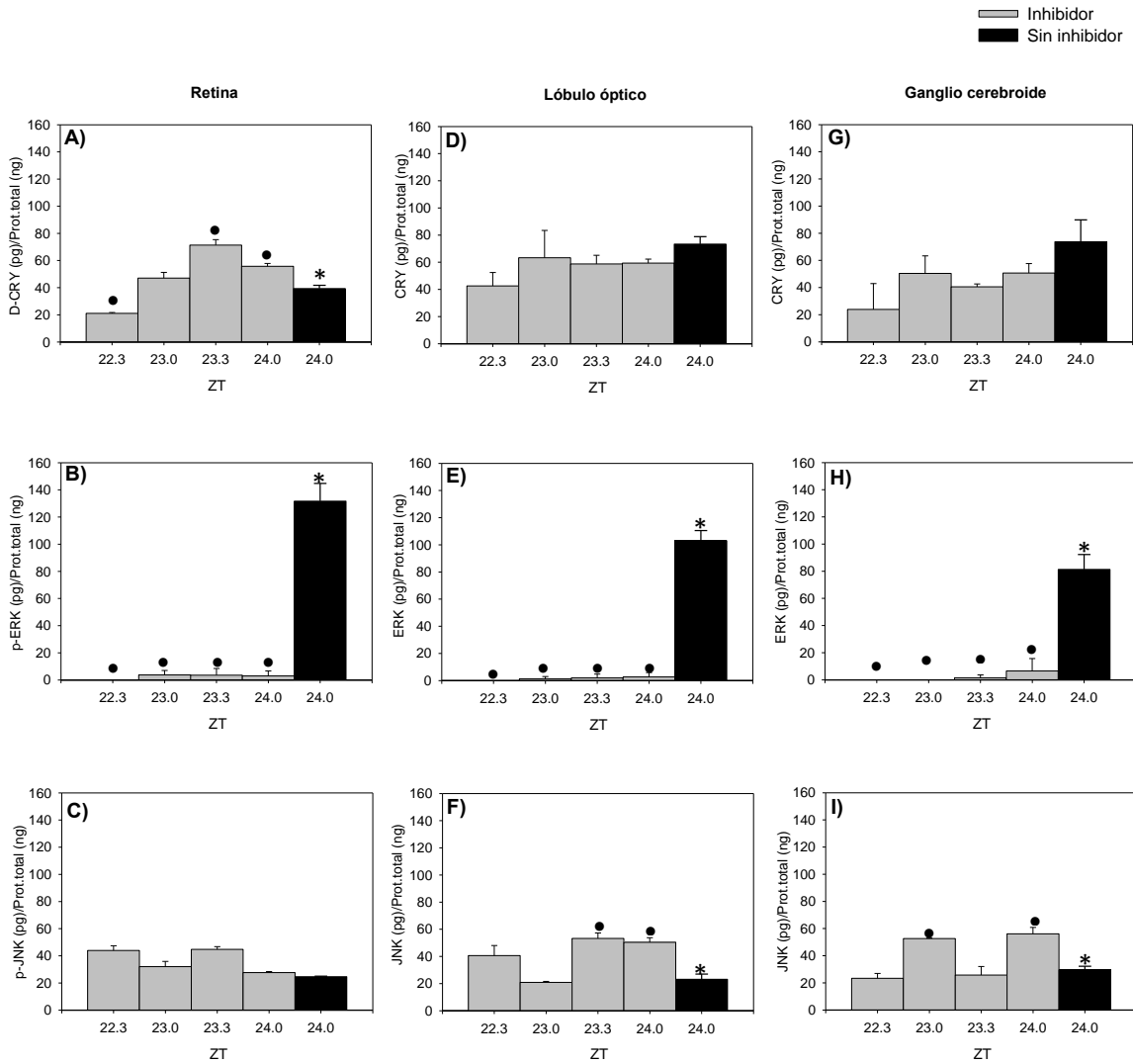


Figura 8. Efecto del inhibidor U0126 100 μ M en D-CRY, p-ERK y p-JNK en las tres estructuras marcapaso del acocil. El fármaco se inyectó solamente en ZT22 y se diseccionó las tres estructuras de un animal cada 30 minutos (barras en gris) a partir de la inyección. La última barra muestra los resultados de un animal al que no se le aplicó la inyección del inhibidor (barras negras). A, B y C) retina; D, E y F) lóbulo óptico; y G, H e I) ganglio cerebriode. En cada gráfica se muestra la cantidad de proteína según corresponda obtenida en 20 000 ng de proteína total (ver análisis de resultados) y las diferencias estadísticamente significativas de las medias en el animal sin inhibidor (*) con inhibidor (•) en los diferentes tiempos. N=1 Anova de un factor A) $F=56.448$, $P<0.001$; B) $F=108.873$, $P<0.00$; E) $F=191.752$, $P<0.001$; H) $F=43.932$, $P<0.001$; F) $F=20.608$, $P\leq 0.001$ y I) $F=16.936$, $P\leq 0.001$.

8.3. Oscilaciones diarias y circadianas

8.3.1. Criptocromo

8.3.1.1. Retina

Los análisis de Cosinor y Anova muestran que la proteína D-CRY presenta un ritmo diario significativo en LO 12:12 (ver tablas 1 y 2) con un periodo de 22.42 h y un porcentaje rítmico (PR%) de 22.07, estos resultados se muestran en el cronograma de la figura 9A. El cronograma muestra que 4 horas previas al encendido de la luz la abundancia de D-CRY está en el punto mínimo del ciclo (aproximadamente un 27%) y la acrofase se presenta en ZT0 que corresponde al encendido de la luz para después disminuir hasta casi un 46% en las siguientes 4 horas (Figura 9A). En tanto, después de 72h de oscuridad constante el análisis de cosinor muestra una oscilación significativa con un periodo de 23.53 h y un PR% de 35.75, también se puede observar un adelanto de la acrofase de 4 horas con respecto a las condiciones de LO 12:12. Los cambios de la abundancia de D-CRY 4 horas antes y después de la acrofase situada a las 20 horas del tiempo externo (TE 20) corresponden al 97% y 75% respectivamente.

8.3.1.2. Lóbulo óptico

En esta estructura no se presentaron cambios diarios significativos de la abundancia de D-CRY (ver tablas 1 y 2), sin embargo, se observa una oscilación bimodal en la que la abundancia de D-CRY en ZT0 corresponde al 94% y en ZT12 al 100%, ya lo largo del ciclo la abundancia no disminuye por debajo de 63% a diferencia de lo que ocurre en retina (Figura 9D). En la abundancia de D-CRY no se encontró una oscilación significativa en el análisis de Cosinor y Anova en oscuridad constante (tablas 1 y 2).

8.3.1.3. Ganglio cerebroide

En el análisis de los resultados se muestran ritmos diarios y circadianos de la abundancia de D-CRY con un periodo de 12.00 y 23.36 h, respectivamente (ver análisis de Cosinor y Anova, tablas 1 y 2). En la condición de LO 12:12 la acrofase (al igual que en retina) se observa en ZT0, 4 horas antes la abundancia de D-CRY tiene un 51% y un 41% después de 4 horas.

En OO la acrofase muestra un atraso de fase de 4 horas con respecto a la acrofase de LO 12:12 (figura 9G).

8.3.2. Extracellular Signal Regulated Kinase “ERK”

Se encontró que la proteína p-ERK está presente en la retina, el lóbulo óptico y el ganglio cerebroide del acocil *P.clarkii* en todas las condiciones experimentales.

8.3.2.1. Retina

El análisis de la proteína p-ERK muestra cambios temporales de su abundancia en la retina, los niveles de la proteína muestran oscilaciones diarias significativas para un periodo de 24.17 horas, el cronograma muestra que el máximo está en ZT0 y los resultados son significativos para Cosinor y Anova (tablas 1 y 2) y coincide con el máximo obtenido de D-CRY en LO 12:12 (figura 9A y B).

Los resultados muestran oscilaciones endógenas significativas con un periodo de 14.48 horas tan solo en el análisis de cosinor (tabla 1) ($P=0.020$), por otra parte, el máximo de p-ERK tiene un adelanto de fase de 4 horas con respecto al obtenido en LO12:12 (figura 9B)

8.3.2.2. Lóbulo óptico

A diferencia de D-CRY, la abundancia de p-ERK en esta estructura mostró variaciones diarias significativas, por Cosinor como por Anova. Cosinor revela un periodo de 23.36 horas (tablas 1 y 2). El máximo de la abundancia se encontró en ZT 16, y otro con el 96% de p-ERK en ZT0 (figura 9E).

Después de 72h de OO el análisis de Cosinor reveló una oscilación estadísticamente significativa, cuyo periodo de 12.23 horas y acrofase coincide con el máximo de LO 12:12, y la amplitud que en esta última condición de 0.56 pasó a 0.98 en OO (figura 9E y tabla 1). Sin embargo, no se encontró significancia en Anova (tabla 2).

8.3.2.3. Ganglio cerebroide

Cosinor y Anova no mostraron una oscilación diaria significativa en el ganglio cerebroide. El punto máximo de la abundancia de p-ERK se encuentra en ZT4 (figura 7H; tablas 1 y 2). Sin embargo Cosinor mostró una oscilación circadiana significativa en OO con $\tau = 18.23$ h (tabla 1), el punto máximo se encuentra a las 20 horas del tiempo externo (figura 9H).

8.3.3. Cinasa N-terminal Jun "JNK"

Se identificó inmunoreacción para la proteína JNK con el anticuerpo monoclonal **p-JNK** (G-7) (sc-6254, Santa Cruz Biotechnology) en la retina, lóbulo óptico y ganglio cerebroide.

8.3.3.1. Retina

Se obtuvo una oscilación de p-JNK diaria significativa tanto con Cosinor como con Anova (tablas 1 y 2). Esta oscilación mostró un periodo de 24 horas, un PR%57.84 y una amplitud de 24.73, el máximo de la abundancia de la proteína se presenta en ZT0 (figura 9C) y coincide con el máximo de D-CRY y p-ERK en LO 12:12 (cronogramas de la figura 9A, B y C). Esta abundancia disminuyó durante siguientes horas de luz hasta el momento del apagado después nuevamente incrementó.

En la condición de oscuridad constante se obtuvo una oscilación para un periodo de 11.48. Esta oscilación fue significativa tanto por Cosinor como por Anova (tablas 1 y 2). En esta condición la amplitud del ritmo disminuyó de 24.73 a 9.23; el 92% de la abundancia de p-JNK se situó en el inicio del día subjetivo (08:00 h del

tiempo externo) y el máximo se encontró en 16:00 h del tiempo externo (8 horas después) (figura 9C).

8.3.3.2. Lóbulo óptico

La abundancia de p-JNK mostró oscilaciones diarias y circadianas significativas con Cosinor y Anova (tablas 1 y 2). El periodo que se obtuvo en LO 12:12 es de 24 h y para 72 h OO es de 23.42 horas. El máximo de la abundancia en LO 12:12 de p-JNK obtenido ocurrió en ZT16 y la amplitud fue de 8.28. En 72 h OO la acrofase se situó a las 20:00 horas del tiempo externo (inicio de la noche subjetiva) (figura 9F).

8.3.3.3. Ganglio cerebroide

El máximo de p-JNK de LO 12:12 ocurrió en ZT20 (figura 9I), se obtuvo una oscilación bimodal significativa por Cosinor y Anova (Tablas 1 y 2) con un periodo de 11.53 horas, una amplitud de 10.58. Cosinor y Anova revelaron un ritmo estadísticamente significativo en OO (tablas 2 y 3), cuyo periodo fue de 24.24 horas, el máximo del ritmo se presentó a las 00:00 h del tiempo externo.

LO 12:12 y 72h OO

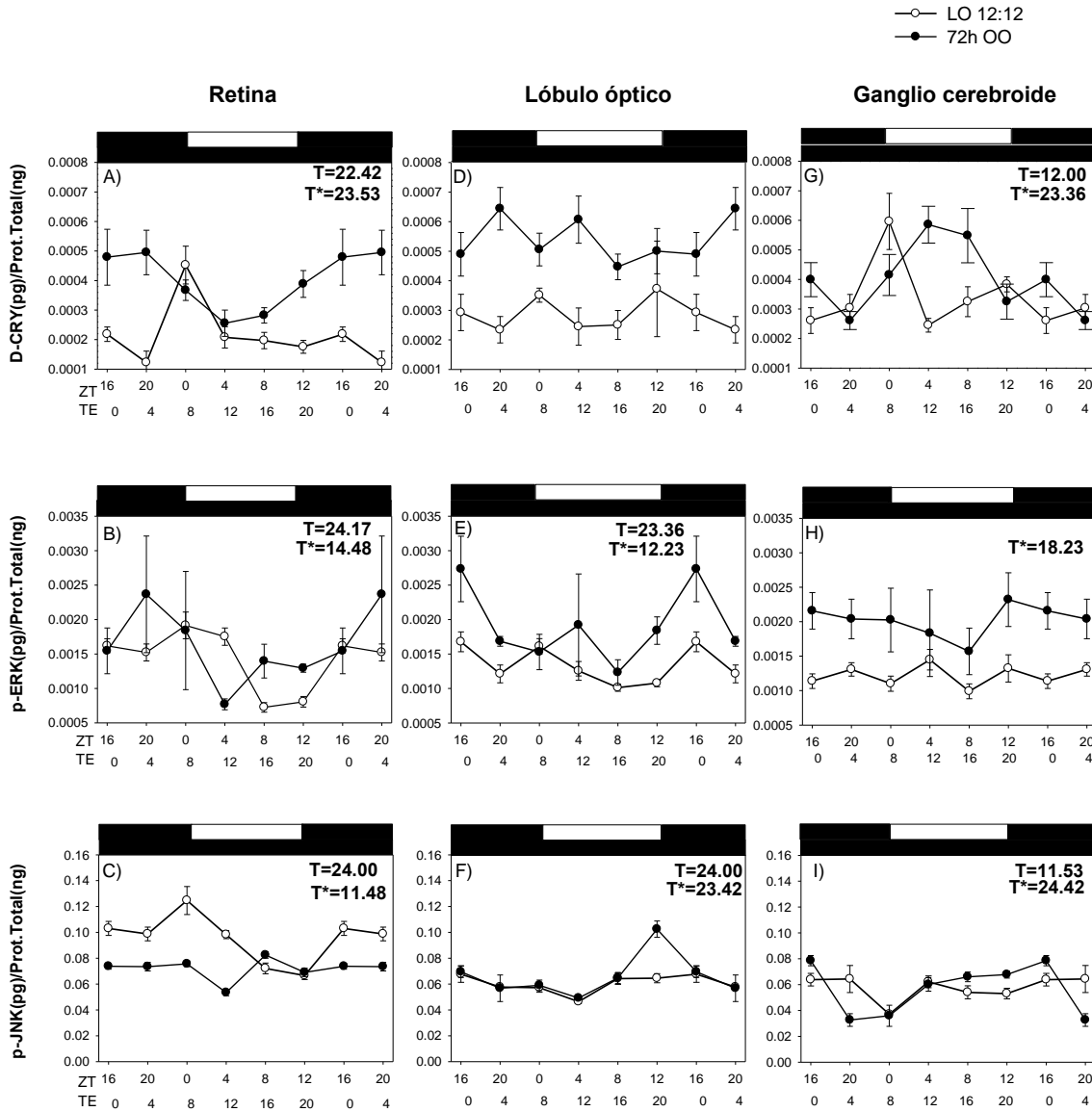


Figura 9. Cronogramas mostrando las variaciones diarias y circadianas de la abundancia de las proteínas D-CRY, p-ERK y p-JNK en condiciones de LO 12:12 (círculos vacíos) y 72 h OO (círculos negros). Las barras en la parte superior muestran las condiciones de luz y/o oscuridad. En la parte inferior se muestra ZT en las muestras en LO 12:12 y Tiempo externo (TE) en 72h OO. A, B, y C) corresponden a retina; D, E y F) a lóbulo óptico; G, H e I) muestran los resultados del ganglio cerebroide. Los valores son las medias \pm s.e.m. Los resultados que muestran el periodo en: T y T* son estadísticamente significativos con el análisis de cosinor para LO 12:12 y 72 h OO respectivamente ($P < 0.05$ N=3).

Tabla 1. Análisis de Cosinor de la abundancia de CRY, p-ERK y p-JNK en LO 12:12 y 72h OO en acociles adultos <i>P. clarkii</i>								
Proteína	Condición	Tejido	Periodo	Mesor	Amplitud	PR(%)	Acrofase	P
CRY	LO	Retina	22.42	0.22	0.09	22.07	06.20	0.016 *
		Lóbulo óptico	10.48	0.29	0.09	13.72	01.18	0.088
		Ganglio cerebroide	12.00	0.35	0.14	39.39	11.31	0.000 *
	OO	Retina	23.53	0.38	0.13	35.75	02.03	0.001 *
		Lóbulo óptico	13.36	0.62	0.21	10.73	14.05	0.154
		Ganglio cerebroide	23.36	0.42	0.14	30.84	06.39	0.002 *
p-ERK	LO	Retina	24.17	01.39	0.56	57.98	22.02	0.000 *
		Lóbulo óptico	23.36	01.31	0.23	23.33	21.11	0.012 *
		Ganglio cerebroide	08.48	01.22	0.22	22.60	09.43	0.015 *
	OO	Retina	14.48	01.85	0.98	21.19	08.39	0.020 *
		Lóbulo óptico	12.23	01.83	0.55	18.45	08.19	0.038 *
		Ganglio cerebroide	18.23	02.00	0.55	19.25	09.17	0.033 *
p-JNK	LO	Retina	24.00	93.91	24.73	57.84	22.34	0.000 *
		Lóbulo óptico	24.00	59.63	08.28	30.95	14.04	0.002 *
		Ganglio cerebroide	11.53	56.07	10.58	24.26	06.05	0.012 *
	OO	Retina	11.48	71.31	09.23	37.48	06.08	0.000 *
		Lóbulo óptico	23.42	66.91	19.86	44.88	21.23	0.000 *
		Ganglio cerebroide	24.42	52.51	23.46	45.99	17.55	0.000 *

*P<0.05

Tabla 2. Análisis de Anova de la abundancia de CRY, p-ERK y p-JNK en LO 12:12 y 72h OO en acociles adultos <i>P. clarkii</i>					
			F	Significancia	
CRY	LO	Retina	10.824	0.000	*
		Lóbulo óptico	0.668	0.651	
		Ganglio cerebroide	7.166	0.000	*
	OO	Retina	3.375	0.015	*
		Lóbulo óptico	1.496	0.221	
		Ganglio cerebroide	4.544	0.003	*
p-ERK	LO	Retina	20.211	0.000	*
		Lóbulo óptico	7.367	0.000	*
		Ganglio cerebroide	1.971	0.112	
	OO	Retina	0.444	0.814	
		Lóbulo óptico	1.897	0.126	
		Ganglio cerebroide	0.441	0.816	
p-JNK	LO	Retina	15.616	0.000	*
		Lóbulo óptico	4.641	0.003	*
		Ganglio cerebroide	3.365	0.016	*
	OO	Retina	15.758	0.000	*
		Lóbulo óptico	12.459	0.000	*
		Ganglio cerebroide	14.316	0.000	*

*P<0.05

8.4. Efecto del pulso de luz azul en ZT14 y el inhibidor U0126

A continuación muestro los resultados obtenidos al día siguiente de la aplicación de un pulso de luz azul por 1 hora en ZT14 con o sin inhibidor U0126 100 μ M en las retinas, los lóbulos ópticos y el ganglio cerebroide de animales LO 12:12, identificando la abundancia de D-CRY, p-ERK y p-JNK.

8.4.1. Criptocromo

8.4.1.1. Retina

La acrofase del ritmo de la abundancia de D-CRY después de aplicar un pulso de luz azul en ZT14 presento un atraso de fase de 8 horas (ZT12) y un incremento en la abundancia de la proteína (alrededor de 8 veces) con respecto al punto máximo de la condición LO 12:12 (Figuras 9A y 10A), la oscilación fue significativa en Cosinor y Anova (Tablas 3 y 4) con un periodo de 23.23 h, una amplitud de 1.24 y un PR 28.69%.

La aplicación del inhibidor U0126 100 μ M y el pulso de luz azul en ZT14 causó un adelanto de 4 horas (ZT8) con un incremento en la abundancia de D-CRY por casi 19 veces con respecto al punto máximo en los animales que únicamente recibieron el pulso de luz azul ZT14; y también se observa un incremento del 87% de abundancia de la proteína en ZT20. Los análisis de Cosinor y Anova mostraron una oscilación significativa. Cosinor reveló un valor de periodo de 12 horas, una amplitud de 19.16 y un PR 25.29%. El nadir de la oscilación se situó en ZT0 (Figura 10A).

8.4.1.2. Lóbulo óptico

La aplicación del pulso de luz azul (ZT4) incrementó 2.4 veces la abundancia del punto máximo de CRY comparada con la obtenida en el punto máximo del ritmo en LO 12:12 (Figuras 9D y 10D). Sin embargo este ritmo diario no fue estadísticamente significativo (Tablas 3 y 4).

El inhibidor U0126 100 μ M y la aplicar el pulso de luz azul en ZT14, se obtiene una oscilación diaria significativa con un periodo de 24.06 horas (resultados de Cosinor y Anova indicados en las tablas 3 y 4). Incrementando D-CRY 174 veces con respecto al punto máximo obtenido tan solo con el pulso de luz azul en ZT14 (ver figura 8D) en ZT12. Cosinor mostró una amplitud es de 41.13 y un PR 30.66% (tabla 3).

8.4.1.3. Ganglio cerebroide

Al aplicar el pulso de luz azul en ZT14, el punto máximo de D-CRY atrasó su fase a ZT16. La proteína CRY incrementó 39 veces con respecto al máximo obtenido en LO 12:12 sin pulso de luz (figura 9G y 10G). Cosinor y Anova mostraron una oscilación estadísticamente significativa después de la aplicación de luz azul en ZT14 (tablas 3 y 4). Esta oscilación presentó un periodo de 12.11 horas, una amplitud 4.57 y un PR 27.83%.

De manera interesante después de la aplicación del inhibidor U0126 100 μ M y el pulso de luz azul el ritmo mostró un incremento de 4 veces en el punto máximo de la abundancia de la proteína en relación con los valores obtenidos con el pulso de luz azul sin inhibidor (figura 10G). Este ritmo presentó adelanto de fase a ZT4. El periodo del ritmo 12.41 horas, presentó una oscilación significativa por Cosinor (tabla 3), la amplitud se incrementó a 21.24 y el PR 21.14%.

8.4.2. Extracellular Signal Regulated Kinase "ERK"

8.4.2.1. Retina

Después de la aplicación de un el pulso de luz azul en ZT14 la oscilación de p-ERK, cambia su periodo de 24.17 horas en LO 12:12 a 26.53 horas, presentando una oscilación significativa por de Cosinor y Anova (tablas 1, 3 y 4), la amplitud de la oscilación es la misma que se obtiene en LO 12:12 pero disminuye el PR a 14.22%. La máxima cantidad de p-ERK obtenida en la condición LO 12:12 tiene un atraso de 8 horas con referencia a la condición LO 12:12 (ZT8).

Y después de la inyección del inhibidor U0126 100 μ M y el pulso de luz azul en ZT14, el punto máximo se mantiene en ZT8 con una abundancia 3 veces menor a la obtenida con el pulso de luz azul (figura 10B). La oscilación diaria es significativa (Cosinor y Anova, tablas 3 y 4) con un periodo de 24.12 horas, la amplitud cambia a 0.17 y el PR a 50.63%.

8.4.2.2. Lóbulo óptico

El pulso de luz azul incrementó 0.9 veces la abundancia de p-ERK en el punto máximo (figura 10E) con respecto a la cantidad máxima obtenida en LO12:12. Se presentó una oscilación no significativa con el análisis de cosinor ($P=0.051$, tabla 3), sin embargo en análisis de Anova por una vía mostró diferencias estadísticamente significativas ($P=0.003$) (ver tabla 5). Esta oscilación mostró un periodo de 21.36 horas.

Al aplicar el inhibidor U0126 100 μ M y el pulso azul en ZT14, la acrofase fue encontrada en ZT12 (figura 10E) disminuyó 1.7 veces la abundancia de p-ERK con respecto a la cantidad máxima obtenida en la condición anterior. Cosinor reveló un ritmo con un valor de periodo de 23.17 horas, amplitud de 0.17 y PR de 35%. Esta oscilación diaria fue significativa por Cosinor y Anova (tablas 3 y 4).

8.4.2.3. Ganglio cerebroide

Esta estructura no mostró una oscilación diaria significativa de p-ERK después de la aplicación de luz azul en ZT14 por Cosinor o por Anova (tablas 3 y 4), el máximo de la abundancia presentó un atraso de fase de 8 horas (ZT 12) y p-ERK disminuyó hasta 3 veces su abundancia comparada con la obtenida en LO12:12 (figura 10H).

Sin embargo, paradójicamente después de la aplicación del inhibidor U0126 100 μ M y el pulso de luz azul incrementó hasta 2 veces la cantidad de p-ERK con respecto a la abundancia obtenida después de luz azul (cantidad parecida al máximo de LO 12:12). Este ritmo mostró con una oscilación diaria significativa (Cosinor y Anova, ver tablas 3 y 4) con un periodo de 12.06 horas, una amplitud de

0.43 y un PR 51.59%. En la figura 9H, también se observa un incremento del 86% en ZT12.

8.4.3. Cinasa N-terminal Jun “JNK”

8.4.3.1. Retina

El máximo de la abundancia de la p-JNK en la retina después del pulso de luz azul en ZT14, disminuye casi 30 veces y este ritmo mostró un atraso de fase de 4 horas con respecto al máximo encontrado en LO 12:12 (figuras 9C y 10C). La oscilación de p-JNK es significativa por el análisis de Cosinor y Anova (tablas 3 y 4) con un periodo de 23.42 horas.

La figura 10C, la tabla 3 y 4 muestran una oscilación significativa de p-JNK después de la aplicación del inhibidor U0126 y el pulso de luz azul en ZT14 en la retina con un periodo de 23.36 horas, la amplitud de 3.21 y el PR 46.67%, mientras el punto máximo tiene un atraso de 8 horas y un incremento de 4 veces con respecto al máximo obtenido con el pulso de luz azul en ZT14.

8.4.3.2. Lóbulo óptico

En esta estructura se observa una oscilación diaria significativa con un periodo de 21.36 horas (tablas de 3 y 4), con una amplitud de 0.27 y PR 55.2%. El punto máximo de la abundancia de la p-JNK tiene un atraso de fase de 4 horas y disminuye si abundancia en ZT20 hasta 39 veces comparado al máximo obtenido en LO 12:12 (Figura 9F y 10F).

El efecto del inhibidor en el lóbulo óptico incrementa la abundancia del pico máximo de p-JNK hasta 9 veces comparado con el pico obtenido solamente con el pulso de luz azul (Figura 10F). La oscilación resultante después de la inyección del inhibidor y la aplicación del pulso de luz azul ZT14 durante una hora muestra una oscilación significativa por Cosinor y Anova (tablas 3 y 4) con un periodo de 23.36 horas.

8.4.3.3. Ganglio cerebroide

Después de la aplicación del pulso de luz azul la abundancia p-JNK en esta estructura mostró una oscilación bimodal diaria significativa con un periodo de 11.53 horas (ver tablas de 3 y 4) (no cambió el periodo con respecto a la condición de LO 12:12), una amplitud de 5.14 y un PR de 25.98%. La máxima abundancia de p-JNK en ZT0 tiene un atraso de fase de 4 horas comparado con el máximo de LO 12:12 (ver figura 9I y figura 10I) y es 5 veces menor.

En respuesta a la aplicación del inhibidor se muestra un cambio de fase en la oscilación bimodal y significativa (Cosinor y Anova, ver tablas 3 y 4) en ZT12. Este punto máximo de la abundancia de p-JNK disminuyó 9 veces en relación con la cantidad obtenida con el pulso de luz azul. El ritmo bimodal mostró un periodo es de 12 horas, una amplitud de 0.89 y el PR 37.94%.

Pulso de Luz Azul en ZT14 y farmaco U0126

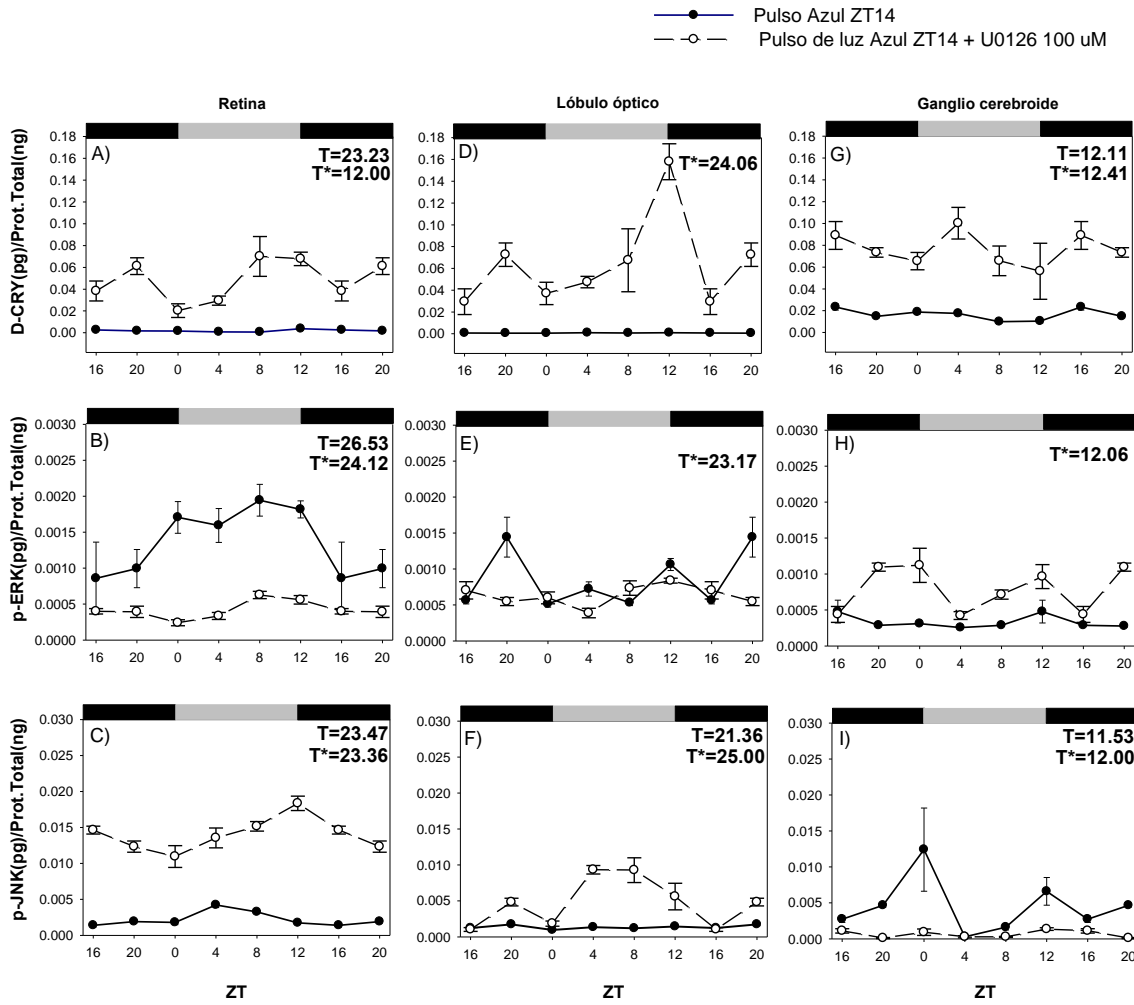


Figura 10. Efecto del pulso de luz azul en ZT 24 en D-CRY, p-ERK y p-JNK en las estructuras del sistema circadiano del acocil. En condiciones de LO 12:12 de pulso de luz azul (1 hora) y pulso de luz azul (1 hora) con U0126 μ l (círculos vacíos), después se mantuvieron en oscuridad constante y se muestreo en el siguiente ciclo. En los cronogramas A, B y C) se muestran los resultados en retina; D, E y F) en lóbulo óptico; y en G, H e I) en ganglio cerebroide. Las barras señalan las condiciones en la luz no se encendió (gris) y las horas de oscuridad (negra). Los valores son las medias \pm s.e.m. Los resultados que muestran T y T* son estadísticamente significativos con el análisis de cosinor con pulso de luz azul ZT14 y pulso de luz azul ZT14 con U0126 100 μ l ($P < 0.05$ N=3).

Tabla 3.								
Análisis de Cosinor de la abundancia de CRY, p-ERK y p-JNK con pulso de luz azul en ZT14 y pulso de luz en ZT14 con 100µM de U0126 en acociles adultos <i>P. clarkii</i>								
Proteína	Condición	Tejido	Periodo	Mesor	Amplitud	PR(%)	Acrofase	P
CRY	Azul	Retina	23.23	1.90	1.24	28.69	17.05	0.000 *
		Lóbulo óptico	08.18	0.75	0.24	20.84	03.40	0.017 *
		Ganglio cerebroide	12.11	15.72	4.57	27.83	01.57	0.003 *
	Azul+U0126	Retina	12.00	48.39	19.16	25.29	08.58	0.011 *
		Lóbulo óptico	24.06	72.73	41.13	30.66	11.5	0.006 *
		Ganglio cerebroide	12.41	71.62	21.24	21.14	02.23	0.022 *
p-ERK	Azul	Retina	26.53	1.49	0.56	14.22	19.50	0.000 *
		Lóbulo óptico	21.36	0.81	0.23	11.03	08.35	0.051
		Ganglio cerebroide	12.06	0.32	0.08	13.31	11.02	0.095
	Azul+U0126	Retina	24.12	0.43	0.17	50.63	09.48	0.000 *
		Lóbulo óptico	23.17	0.64	0.17	35.27	14.41	0.001 *
		Ganglio cerebroide	12.06	0.77	0.43	51.59	09.39	0.000 *
p-JNK	Azul	Retina	23.47	02.38	01.24	55.21	05.44	0.000 *
		Lóbulo óptico	21.36	01.32	0.27	27.37	03.35	0.005 *
		Ganglio cerebroide	11.53	04.63	05.14	25.98	11.56	0.008 *
	Azul+U0126	Retina	23.36	14.20	03.21	46.67	12.27	0.000 *
		Lóbulo óptico	25.00	05.46	03.75	50.22	03.49	0.000 *
		Ganglio cerebroide	12.00	0.83	0.89	37.94	12.34	0.000 *

*P<0.05

Tabla 4. Análisis de Anova de la abundancia de CRY, p-ERK y p-JNK con pulso de luz azul ZT14 (1 hora) y pulso de luz azul ZT14 (1 hora) con U0126 100 μ M en acociles adultos *P. clarkii*

		F	Significancia	
CRY		Retina	6.646	0.000 *
	Azul	Lóbulo óptico	1.461	0.230
		Ganglio cerebroide	8.748	0.000 *
		Retina	6.256	0.001 *
	Azul+U0126	Lóbulo óptico	11.480	0.000 *
		Ganglio cerebroide	1.324	0.283
ERK		Retina	3.739	0.004 *
	Azul	Lóbulo óptico	9.420	0.000 *
		Ganglio cerebroide	1.839	0.135
		Retina	8.655	0.000 *
	Azul+U0126	Lóbulo óptico	4.709	0.003 *
		Ganglio cerebroide	6.501	0.000 *
JNK		Retina	16.589	0.000 *
	Azul	Lóbulo óptico	4.349	0.004 *
		Ganglio cerebroide	2.923	0.030 *
		Retina	16.589	0.000 *
	Azul+U0126	Lóbulo óptico	4.349	0.004 *
		Ganglio cerebroide	0.444	0.814

*P<0.05

9. Discusión

Uno de los hallazgos de esta tesis es la presencia de CRY en la retina del *P. clarkii*, aunque en trabajos anteriores de nuestro laboratorio se había encontrado inmunoreactividad a esta proteína tanto en el protocerebro lateral del tallo cerebral así como en el cerebro central (Fanjul-Moles *et al.* 2004; Escamilla-Chimal *et al.* 2008; Sullivan *et al.* 2009) la inmunoreactividad a CRY en retina no se había detectado, quizá debido a la menor sensibilidad de las técnicas utilizadas: inmunohistoquímica y WB. Estos resultados muestran que CRY oscila en condiciones LO y OO, mostrando cambios diarios y circadiano tanto en la retina como en el ganglio cerebroide, lo que corrobora la participación de la retina en el sistema circadiano como un posible oscilador (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998; Escamilla-Chimal y Fanjul-Moles, 2007). Existe la posibilidad al encontrarse en retina que CRY participe como un fotorreceptor circadiano como se ha demostrado en el cerebro (Sullivan *et al.* 2009) y/o como una proteína reloj como se ha reportado en *Drosophila* en el caso de osciladores periféricos (Zheng *et al.* 2008), sin embargo esta proteína se encuentra bajo el control del reloj circadiano y es una proteína sensible a la luz pues su abundancia disminuye con la luz tanto en retina como en cerebro, mientras que en lóbulo óptico no parece ser afectada por la luz.

En los vertebrados e invertebrados como *Drosophila* (Weber *et al.* 2006) la familia de proteínas cinasa activadas por mitógeno juega un papel clave en la fotosincronización (Obrietna *et al.* 1998; Coogan *et al.* 2003 and 2004). La actividad de las tres MAPKs clásicas muestra oscilaciones circadianas en el NSQ que es controlada por la luz (Pizzio *et al.* 2003). Esta tesis propuso e identificó por primera vez la presencia y actividad de las proteínas MAPK/ERK y MAPK/JNK en las estructuras que conforman el sistema circadiano del acocil *P. clarkii* lo que abre nuevas vías a la investigación del reloj multioscilar de los crustáceos.

En el acocil las cinasas JNK y ERK mostraron oscilaciones diarias significativas en retina, lóbulo óptico y cerebro (Tabla 1). En la actividad de estas cinasas, podemos comparar que CRY disminuyó su abundancia de D-CRY y p-ERK

en la retina después del encendido de la luz, aunque la oscilación de CRY disminuye unas horas antes. Lo anterior sugiere una interacción entre la luz la reducción de las cinasas por acción de alguna fosfatasa. Es decir, parecería que la máxima actividad de ERK está relacionada con el incremento de la abundancia de CRY, lo que no es claro en el caso de JNK. Sin embargo, el efecto de la luz azul en las cinasas produjo el esperado retraso de fase en la noche esto puede indicar que ambas cinasas posiblemente participan en la vía de sincronización del reloj.

En esta tesis se encontró que la proteína CRY no cambia en presencia del inhibidor U0126 inhibidor directo y específico de MEK1 y MEK2 y sin el pulso de luz azul en el lóbulo óptico y en el ganglio cerebroide mientras la disminución como se esperaba de p-ERK (Figura 8) en los tres tejidos del (Halogowder *et al.* 2012). En los resultados obtenidos en el ciclo después de la aplicación del inhibidor y el pulso de luz azul en ZT14 incrementó la abundancia de D-CRY (Figura 5A, D y C), en tanto la aplicación del inhibidor U01226 100 μ M y el pulso de luz azul en ZT14 producen un mayor incremento de la abundancia de CRY en todos los tejidos, sugiriendo que la proteína CRY a través de la actividad de ERK1-2 y el incremento del calcio intracelular y cAMP (Yu *et al.* 2007) pueden producir la fosforilación de CREB que en los mamíferos, activa los elementos-cis CRE los cuales participan en la modulación de la transcripción de genes del reloj (Yoshitane *et al.* 2012; Autoun *et al.* 2012; Mendoza *et al.* 2009; Yu *et al.* 2007). En el pez cebra se describió un módulo de respuesta a la luz compuesto por la caja E que regula la transcripción de los elementos del reloj y la caja D que dirige la expresión de genes como *per2* en respuesta a la luz (Vatine *et al.* 2009). Por lo tanto, esta CRY tiene un papel dual como se ha propuesto en otras especies, por una parte como una proteína fotosincronizadora en el modelo de *Drosophila* que a través de la luz azul (por medio de la vía PKC-MAPK en el pez cebra, Yu *et al.* 2007) puede estar señalizando al sistema circadiano, y por otra como componente negativo del reloj molecular como el NSQ de mamíferos (Mazzotta *et al.* 2010).

Los resultados en este trabajo, se centran en la participación de ERK por medio de un inhibidor de MEK. El inhibidor U0126 es selectivo y directo de MEK1 y MEK2, sin

embargo, el efecto de la aplicación del inhibidor a una concentración de 100 μ M incrementa la abundancia de p-JNK endógeno en el lóbulo óptico y el ganglio cerebroide (Figura 8), mientras en la retina no muestra cambios, en trabajos previos se menciona que U0126 tiene poco efecto en la actividad de otras cinasas como JNK y P38 (Dudley *et al.* 1995; Favata *et al.* 1998),

En el acocil p-ERK muestra oscilaciones diarias significativas en retina y lóbulo óptico (Tabla 1), en el ganglio cerebroide no se muestra una oscilación diaria significativa. En OO la oscilación de p-ERK es bimodal y significativa en las tres estructuras por lo que su actividad tiene un origen circadiano.

La activación de la cascada de MAPK/ERK en el caso de los mamíferos es clave para la sincronización de ritmos de actividad. Pizzio y colaboradores mencionan que a los 15 minutos de un pulso de luz en CT18 con una duración de 5 minutos produce cambios en la fosforilación de MAPK (ERK, JNK y P38) y después de 60 minutos del pulso de luz se recupera la actividad MAPK, mientras tanto la aplicación del pulso de luz en CT6 (corresponde al día subjetivo) no presentan cambios de actividad en el hámster sirio (Pizzio *et al.* 2003). La luz azul pueden excitar CRY activando a través de PKC la vía MAPK y producir cambios de fase en la expresión de los genes circadianos, por lo tanto nosotros investigamos el efecto que produce la luz azul sobre la actividad ERK. Nuestros resultados indican que la estimulación por luz azul durante una hora al inicio de la noche subjetiva temprana en la retina muestra un atraso del máximo de p-ERK y que el periodo se alargó e incrementó el porcentaje rítmico de la actividad, mientras la amplitud no cambió. En el lóbulo óptico se encontró una oscilación diaria y circadiana de p-ERK, a diferencia del ganglio cerebroide que no mostró cambios diarios pero si se obtuvo una oscilación endógena bimodal significativa, la estimulación con pulso de luz azul no mostró una oscilación significativa en ambas estructuras, esto nos indica que la actividad de ERK tiene un origen circadiano en las tres estructuras como también se ha descrito en los osciladores circadianos de otros organismos. Es interesante saber si la actividad de CRY coincide con la fosforilación de ERK. La aplicación del fármaco y el pulso de luz azul atenúa los niveles de p-ERK en la retina y el lóbulo

óptico durante el ciclo, sin embargo se presenta un ritmo diario significativo con un periodo parecido al que se obtiene en las condiciones de LO 12:12 lo mismo sucede en el hámster, en donde encontraron que la administración de U0126 a una hora de sensibilidad circadiana presenta cambios de fase inducidos por la luz en los ritmos de comportamiento, en donde la actividad de ERK está relacionada a la estimulación fótica por activación del receptor NMDA a través del glutamato (Coogan y Piggins, 2003), también la vía ERK tiene varias moléculas efectoras como factores de transcripción, cinasas, reguladores de la traducción que cambian la expresión de genes, incluidos los involucrados en la génesis del reloj circadiano. En el pez cebra que el heterodímero CLOCK-BMAL inducen la expresión de varios genes de CRY los cuales muestran oscilación circadiana, y estos inhiben su transcripción, a excepción de CRY1a cuya oscilación parece ser independiente del heterodímero, y se ha asociado a la regulación de la vía MAPK/ERK (Miyamura *et al.* 2009). El efecto del tratamiento del fármaco U0126 previo a la estimulación luminosa muestra que MAPK/ERK puede modular negativamente el ciclo de la abundancia de CRY, pero en el ganglio cerebroide del acocil después de la inhibición de MEK y la estimulación por medio del pulso de luz azul, los niveles de p-ERK se mantienen con un ritmo bimodal significativo.

La vía MAPK/JNK ha sido una de las vías menos estudiada que la MAPK/ERK en relación a la respuesta a la luz y su participación en el control de los ritmos circadianos. En los mamíferos se ha demostrado que p-JNK se expresa de manera circadiana en el NSQ y que responde a pulsos de luz al igual que p-ERK y también se ha sugerido que su actividad regula directamente la fosforilación del complejo BMAL-CLOCK (Pizzio *et al.* 2003; Yositané *et al.* 2012). En los resultados, la actividad de JNK muestra oscilaciones diarias y circadianas en las tres estructuras en el acocil (figura 5C, F e I, tabla 1 y 2). En la retina se muestra un incremento de p-JNK en el encendido de la luz en LO 12:12, coincidiendo con el pico de D-CRY y p-ERK, lo cual sugiere que la actividad de la cascada de señalización de MAPK/JNK no solo muestra oscilaciones diarias sino también puede inducirse a través de la luz en dicha estructura. En el lóbulo óptico y en el ganglio cerebroide la máxima

abundancia de p-JNK encontrada en ZT12 y ZT20 respectivamente en LO12:12 (Figura 4F e I). JNK se activa a través de las señales de estrés ambiental como la radiación ultravioleta, sin embargo hasta el momento no se ha reportado el posible efecto de la luz azul sobre la fosforilación de JNK y su oscilación circadiana en el acocil. El pulso de luz azul disminuyó los niveles de p-JNK cambiando la amplitud y el periodo en la retina y el lóbulo óptico, también disminuyó la amplitud de p-JNK en el ganglio cerebroide pero no cambio el periodo (Tabla 3) de la actividad obtenida en LO12:12 en esta cinasa. La abundancia máxima de p-JNK obtenida después del pulso de luz azul en ZT14 produjo un atrasó de 4 horas del que se obtuvo en las condiciones de LO 12:12 en la retina, el lóbulo óptico y el ganglio cerebroide. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la luz azul modula negativamente la actividad de JNK en las tres estructuras. En el NSQ de ratón, se ha señalado que JNK tiene un papel esencial en las oscilaciones circadianas de componentes moleculares del reloj circadiano como la fosforilación de BMAL1, el control del periodo de la actividad locomotora y también en la regulación fótica como los cambios de fase inducidos por pulsos de luz y la respuesta dependiente de la intensidad de la luz. La actividad de JNK es importante para la estabilidad de PER2 lo cual disminuye su degradación a través del proteosoma (Yoshitane *et al.* 2012; Uchida *et al.* 2010).

La luz azul aplana el ritmo de CRY (ver figura 10), sin embargo al aplicar la luz azul con el inhibidor U0126 la amplitud del ritmo aumentó 19 veces en la retina. Se ha propuesto que la luz azul actúa activando la transcripción de los genes reloj mediante la facilitación de los elementos promotores y la ERK/MAPK y que participa como un regulador negativo de la transcripción activada por la azul (Mracek *et al.* 2013). Los resultados obtenidos en esta tesis parecen ir en la misma dirección pues la luz azul incrementa los parámetros de los ritmos de ERK, principalmente en retina y lóbulo óptico. Sin embargo al inhibir la vía ERK/MAPK con U0126 los parámetros y abundancia de ERK disminuyen (hasta 3 veces en retina y casi 2 veces en lóbulo óptico) lo que sugiere que el efecto de la luz azul disminuye liberando la posible retroalimentación negativa sobre los elementos promotores de la caja E que puede

sugiere una posible facilitación sobre la transcripción de los genes reloj, en este caso un aumento en la expresión rítmica de CRY en retina.

Este efecto es paradójico en el caso de los ritmos observados en la expresión de JNK en los que la luz azul y su inhibición parecen tener el mismo efecto que tienen sobre la ritmicidad de CRY. Esto parece indicar una posible interacción cruzada entre la vía ERK y JNK. Se requieren experimentos con inhibidores específicos de JNK para probar esta hipótesis.

10. Conclusiones

1.- Este es el primer reporte que identifica a CRY en la retina, además de encontrarse en el lóbulo óptico y en el ganglio cerebroide del acocil *P. clarkii*. Esta proteína mostró una gran sensibilidad a la luz durante el encendido en ciclos LD 12:12 en la retina y el ganglio cerebroide, oscilando de manera diaria y circadiana. Estos datos fortalecen a la retina como un oscilador.

2.- Se identificaron dos proteínas de la vía de señalización ERK y JNK presentes en la retina, lóbulos ópticos y ganglio cerebroide. Ambas proteínas oscilan diaria y circadianamente en las tres estructuras. En la retina la actividad de CRY y ERK posiblemente está relacionada y que ambas pueden estar participando en la sincronización en el acocil.

3.- La aplicación del fármaco U0126 disminuye la abundancia de la proteína p-ERK encontrada en el acocil en las tres estructuras del acocil y aumentó la abundancia de CRY, y durante la exposición a un pulso de luz azul en ZT14. Esto sugiere la vía de señalización MAPK-ERK puede modular negativamente la abundancia de CRY.

4.- La expresión de p-JNK mostró oscilaciones diarias y circadianas en todas las estructuras del acocil empleadas en el presente trabajo. Se destaca el incremento de JNK en el encendido de la luz en la retina, por lo que también la luz podría

interferir en su actividad. El pulso de luz azul disminuye p-JNK en las tres estructuras.

11. Apéndice

Tabla A. Curva estándar de BSA escalada en un rango de 50 a 500 µg/ml:					
Tubo	Stock BSA µl	NaCl (0.15M) µl	Bradford µl	BSA(µg)	BSA (µg/ml)
1	0	15	200	0	0
2	1.5	13.5	200	0.75	50
3	3	12	200	1.5	100
4	4.5	10.5	200	2.25	150
5	7.5	7.5	200	3.75	250
6	10.5	4.5	200	5.25	300
7	15	0	200	7.5	500

12. Literatura citada

- **Antoun G, P. B. Cannon and H-Y. M. Cheng (2012)** Regulation of MAPK/ERK signaling and photic entrainment of the suprachiasmatic nucleus circadian clock by Raf kinase inhibitor protein. *J. Neurosci.* 32(14):4876-4877.
- **Aréchiga H. (2003)** Sustrato neural de los ritmos biológicos. *Rev en Neurociencia Ed. J.V. Sánchez-Andrés* 36(1):49-60
- **Aréchiga H. and L. Rodríguez-Sosa 1998** Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *Proc. R. Soc.* 265:1819-1823.
- **Aréchiga H. and L. Rodríguez-Sosa (1997)** Coupling of Environmental and Endogenous Factor in the Control of Rhythmic Behavior in Decapod Crustaceans. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 77:17-29.
- **Aréchiga H. and Rodríguez-Sosa L. (1998)** Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 265(1408):1819-1823.
- **Bennett L.D, P. Beremand, T. L. Thomas and D. Bell-Pedersen (2013)** Circadian Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase MAK-1 Facilitates Thythms in Clock- Controlled Genes in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 12(1):59
- **Bernal-Moreno, J.A., Miranda-Anaya, M. and Fanjul-Moles, M. L. (1996)** Phase shifting the ERG amplitude circadian rhythm of juvenile crayfish by caudal monochromatic illumination. *Biol. Rhythm Res.* 27:299-301.
- **Butcher G. Q, H. Dziema, M. Collamore, P W. Burgoon and K. Obrietan (2002)** The p44/44 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Couple Photic Input to Circadian Clock Entrainment. *The J. Biol. Chemistry.* 277(33):29519-29525
- **Brady J. 1979** Biological clocks. The Carmelior Press Ltd, Southampton Baltimore University. Institute of biology's Studies in Biology. 1-59
- **Carnello M. and P.P. Roux (2011)** Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75: 50-85.

- **Czarna A, A. Berndt, H. R. Singh, A. Brudziecki, A. G. Ladurner, G. Timinszky, A. Kramer y E. Wolf (2013)** Structures of Drosophila Cryptochrome and Mouse Cryptochrome1 Provide Insight into Circadian Function. *Cell* 153:1394-1405
- **Cermakian N, M.P. Pando, C.L. Thompson, A. B. Pinchak, Ch. P. Selby, L. Gutierrez, D. E. Wells, G.M. Cahill, A. Sancar and P. Sassone-Corsi. (2002)** Light induction of a vertebrate clock gene Involves Signaling through blue-light receptors and MAP Kinases. *Current Biology* (12)10: 844-848
- **Collins B., Mazzoni E. O., Stanewsky R., Blau J. (2006)** Drosophila CRYPTOCHROME is a circadian transcriptional repressor. *Curr. Biol.* 16:441-449.
- **Coogan A. and H.D. Piggins (2003)** Circadian and Photic Regulation of Phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 in the Suprachiasmatic Nuclei of the Syrian Hamster. *J. Neurosc.* 23(7):3085-3093
- **Coogan A. and H.D. Piggins (2004)** MAP kinases in the mammalian circadian system –key regulators of clock function. *J. of Neurochemistry* 90:769-775
- **Coso O.A, M. Chiariello, J-Ch. Tu, H. Teramoto, P.Crespo, N. Xu, T. Miki, and J. S. Gutlind (1995)** The small GTP-Binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81(7): 1137-1146
- **Chansard M, P. Molyneux, K. Nomura, M.E. Harrington and C. Fukuhara (2007)** c-Jun N-terminal Kinase inhibitor SP600125 modulates the period of mammalian circadian rhythms. *Neuroscience* 145(3):812-823.
- **Chaves I., R. Pokorny, M. Byrdin, N. Hoang, T. Ritz, K. Brettel, Lars-Oliver Essen, G. T. J. van der Horst, A. Batschauer and M. Ahmad (2011)** The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:335–64
- **Chen Z, T.B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B-e Xu, A. Wright, C. Vanderbilt and M.H. Cobb (2001)** MAP Kinases. *Chem. Rev.* 101;24449-2472

- **Déléris P, M. Trost, I. Topisirovio, P. L Tanguay, K.L.B. Borden, P. Thibault and S. Meloche (2011)** Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK 3/4-MAPK-Activated protein kinases signaling pathway. *J. Biol. Chemistry* 286(8): 6470-6478
- **Devlin P.F. and S.A. Kay (2001)** Circadian Photoperception. *Annu. Rev.Physiol.* 63:677-94
- **Dudley D.T, L. Pang, S.J. Decker, A.j. Bridges and A.R. Saltiel (1995)** A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. 92:7686-7689
- **Escamilla-Chimal E.G and M.L. Fanjul (2007)** Daily and circadian expression of cryptochrome during the ontogeny of crayfish. *Comp. Bioch. And Physiol. Part. A* 151:461.470
- **Escamilla-Chimal E.G, Velázquez-Amado R. M, Fiordelisio T. and Fanjul-Moles M. L. (2010)** Putative pacemakers of crayfish show clock proteins interlocked with circadian oscillations. *The Journal of Experimental Biology* 213; 3723-3733.
- **Fanjul-Moles M.L, Escamilla-Chimal E.G, Gloria-Soria A and Hernández-Herrera G. (2004)** The crayfish *Procambarus clarkii* shows daily and circadian variation. *J. of Exp. Biol.* 207:1453-1460
- **Fanjul-Moles M.L. y J. Prieto-Sagredo (2003)** The circadian system of crayfish: a developmental approach. *Microsc. Res. Tech.* 60(3):291-301.
- **Fanjul-Moles M.L, E.G. Escamilla-Chimal, A.G. Gloria-Soria and G. Hernández-Herrera. J. (2004)** The crayfish *Procambarus clarkii* CRY show daily and circadian variation. *Exp. Biol.* 207:1453-1460
- **Favata M, K.Y. Horiuchi, E.J. Manos, A.J. Daulerio, D.A. Stradley, W.S. Feeser, D.E. V. Dyk, W.J. Pitts, R.A. Earl, F. Hobbs, R.A. Copeland, R.L. Magolda, P.A. Scherle, and J.M. Trzaskos (1998)** Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *J. Biol. Chem.* 273(29):18623-18632

- **Golombek D. and R. Rosenstein. (2010)** Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90:1063-1102
- **Gruart A, J.M. Delgado, C. Escobar, R. Aguilar Robledo (2002)** Los relojes que gobiernan la vida. *La ciencia para todos* 188. Fondo de cultura económica.
- **Hafner G.S and T.R. Takarski (1998)** Morphogenesis and pattern formation in the retina of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Cell and Tissue Research* 293:535-50
- **Hainich E.C, G.A. Pizzio, D.A. Golombek (2006)** Constitutive action of the ERK- MAPK pathway in the suprachiasmatic nuclei inhibits circadian resitting. *FEBS* 580; 6665-6668.
- **Halagowder D and A. Natarajan (2006)** Molecular mechanisms regulating molting in crustacean. *FeBS* 278:839-846.
- **Halagowder D, M. Saravanakumar and M. Thiyagu (2012)** Induction of ovarian maturation in *Panaeus monodon* by molecular signal interventional approach. *J. Exp. Zool.* 3188:572-585
- **Haitian Q, H. Liu, Ch. Li and L. Lou. (2009)** 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(methylthio)butadiene (U0126) Enhances the Cytotoxicity of Combretastatin A4 Independently of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase. *Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 330(1): 326-333
- **Johnson C.H, J.A. Elliott and R. Foster (2003)** Entrainment of circadian programs. *Chronobiol Int.* 2003 Sep;20(5):741-74.
- **Koh K, X. Zheng and A. Sehgal (2006)** JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science* 312: 1809-1812
- **Lamb T.M, K.E. Finch and D. Bell-Pedersen (2012)** The *Neurospora crassa* OS MAPK pathway-activated transcription factor ASL-1 contributes to circadian rhythms in pathway responsive clock-controlled genes. *Fungal Genet Biol.* 49(2):180-188.

- **Madhani H.D. and G.E. Fink (1998)** The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Eukaryotic Cell* 12(1); 59-69
- **Manning G, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam (2002)** The Protein Kinase Complement Of the Human Genome. *Science Rev* 298:1912-1934.
- **Mazzota G.M, C. De Pittà, C. Benna, S. C. E. Tosatto, G. Lanfranchi, C. Bertolucci and R. Costa (2010)** A CRY from Krill. *Chronobiology International*, 27(3):425-445
- **Menaker M. and Wisner S. (1983)** Temperature-compensated circadian clock in the pineal of *Anolis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6119-6121
- **Mendoza J, P. Pévet, E. Challet. (2009)** Entrainment and coupling of the hamster supraquiasmatic clock by daily dark pulses. *J. Neurosci Res.* 87(3): 758-765
- **Miyamura N, J. Hirayama, K. Sawanobori, T. Tamaru, Y. Asaoka, R. Honda, T. Yamamoto, H. Uno, K. Takamatsu and H. Nishina (2009)** CLOCK:BMAL-Independent Circadian Oscillation of Zebrafish *Cryptochrome1a* Gene. *Biol. Pharm. Bull.* 32(7):1183-1187
- **Moore-Ede M.C, F.M. Sulzman and C.A. Fuller (1982)** The clocks that time us. *Physiology of the circadian timing system.* Harvard University Press. England. 1-151.
- **Mracek P, C. Pagano, N. Fröhlich, M. L. Idda, I. H. Cuesta, J. F. Lopez-Olmeda, F. J. Sánchez- Vázquez, D. Vallone and N. S. Foulkes (2013)** ERK Signaling regulates light-induced gene expression via D-Box Enhancers in a differential, wavelength-dependent manner. *Plos one* 8(6): e67858
- **Naidoo N, W. Song, M. Hunter-Ensor and A. Sehgal (1999)** A role for the proteasome in the light response of the Timeless clock protein. *Science* 285: 1737-1741
- **Nishimoto S. and E. Nishida (2006)** MAPK Signalling ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep.* 7(8): 782-786

- **Obrietan K, S. Impey, D.R. Storn (1998)** Light and circadian rhythmicity regulate MAP Kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat. Neuron* 1(8): 693-700.
- **Öztürk N, S-H C Song, Ch. P. Selby y A. Sancar (2008)** Analysis of the redox state of the Flavin cofactor by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 283 (6):3256-3263.
- **Ozturk N, Ch. P.Selby, Y. Annayev, Dongping Zhong and A. Sancar (2011)** Reaction mechanism of Drosophila cryptochrome. *PNAS.* 108, 2: 516-521
- **Paranje D.A. and V.K. Sharma (2005)** Evolution of temporal order in living organisms. *J. of Circadian Rhythms* 3:7
- **Pearson G, F. Robinson, T. B. Gibson, B-E Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001)** Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Rev.* 22(2):153-183.
- **Petrzilka S, C. Taraborrelli, G. Cavadini, A. Fontana and T. Birchler (2009)** Clock gene modulation by TNF-alpha depends on calcium and p38 MAPK kinase signaling. *J. Biol Rhythms.* 24(4): 283-294
- **Pizzio G.A, E.C. Hainich, G.A. Ferreyra, O.A. Coso and D.A. Golombek (2003)** Circadian and photic regulation of ERK, JNK y p38 in the hamster SCN. *Neuroreport* 14(11): 1417-1419
- **Refinetti R. (2000)** Circadian physiology. CRC Press. 1-688
- **Reinberg A. and H. Smolensky (1983)** Investigate Methodology for Chronobiology. In: Reinberg, *et al.* Biological Rhythms and Medicine, cellular metabolic, physiopathologic and pharmacologic Aspects. Topics in Environmental Physiology and Medicine. Springer Pp. 305
- **Roberts P.J. and C.J. Der (2007)** Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26;3291–3310
- **Rodríguez- Sosa L, G. Calderón-Rosete and G. Flores (2008)** Circadian and Ultradian Rhythms in the crayfish caudal photoreceptor. *Synapse* 62:643-652.

- **Rosato E, V. Codd, A. Piccin, M. Zordan, R. Costa and Ch. P. Kyriacou. (2001)** Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Current Biology*. 11,12:909–917
- **Roux P.P. and J. Blenis (2004)** ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(2):320
- **Roenneberg T and M. Merrow (1998)** Molecular circadian oscillators : An alternative hypothesis. *J. of Biol. Rhyth.* 13(2): 167-179.
- **Sancar A (2000)** Cryptochrome: The second Photoactive Pigment in the Eye and Its Role in Circadian Photoreception. *Annu.Rev. Bioch.* 69:31-67
- **Saucedo García M y Gavilanes Ruíz M (2005)** Las MAP cinasas: elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. *REB* 24(1):4-11
- **Seay D. J. and C. S. Thummel (2011)** The Circadian Clock, Light, and Cryptochrome Regulate Feeding and Metabolism in *Drosophila*. *J Biol Rhythms* 26: 497-506
- **Strauss J. and H. Dirksen (2010)** Circadian clocks in crustacean: identified neuronal and cellular systems. *Front. Biosci.* 15:1040-1074
- **Sullivan J.M, M.C. Genco, E.D. Marlow, J. L. Benton, D.C. Sandeman. (2009)** Brain Photoreceptor Pathways Contributing to circadian Rhythmicity in Crayfish. *Chronobiology International* 26(6): 1136-1168
- **Uchida Y, J. Hirayama and H. Nishina (2010)** A Common Origin: Signaling Similarities in the Regulation of the Circadian Clock and DNA Damage Responses. *Biol. Pharm. Bull.* 33(4):535:544
- **Vatine G, D. Vallone, Y. Gothilf and N. S. Foulkes (2011)** It's time swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett.* 585(10):1485-94
- **Vega A. (1993)** Análisis estadístico en cronobiología. *Psiquis.* 2(6):139-149.
- **Voisin L, MK. Saba-EI-Leil, C. Julien, C. Frémin and S. Meloche (2010)** Genetic demonstration of redundant role of extracellular signal-regulated

kinase 1 (ERK1) and ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinases in promoting fibroblast proliferation. 30(12):2918-2932

- **Weber F, H. Hung, Ch. Maurer and S. A. Kay (2006)** Second messenger and Ras/MAPK signaling pathways regulate CLOCK/CYCLE-dependent transcription. J. of Neurochemistry. 98:248-257
- **Wortzel I. and R. Seger (2011)** The ERK cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. Genes Cancer 2(3): 195-209
- **Yoshii T, M. Ahmad and Ch. Helfrich-Förster (2009)** Cryptochrome Mediates Light-Dependent Magnetosensitivity of Drosophila's Circadian Clock. PLoS Biology. 7(4);813-819
- **Yoshitane H, S. Honma, K. Imamura, H. Nakajima, S.Y. Nishide, D. Ono, H. Kiyota, N. Shinozaki, H. Matsuki, N Wada, H. Doi, T. Hamada, K. Honma and Y. Fukada. (2012)** JNK regulate the photic response of the mammalian circadian clock. EMBO Rep. 1;13 (5):455-461
- **Yu Ch-J, Y. Gao, C. L. Willis, P. Li, J. P. Tiano, P. A. Nakamura, D. r. Hyde and L. Li (2007)** Mitogen-associated protein kinase- and protein kinase a-dependent regulation of rhodopsin promoter expression in zebrafish rod photoreceptor cells. J. of Neuroscience Research 85:488-496
- **Yuan Q, F. Lin, X. Zheng and A. Sehgal (2005)** Serotonin Modulates Circadian Entrainment in Drosophila. Neuron 47:115-127
- **Zhang W. and H. T. Lui (2002)** MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Research; 12(1):9-18
- **Zheng X. and Sehgal (2008)** Probing the Relative Importance of Molecular Oscillations in the Circadian Clock. Genetics. 178: 1147-1155.
- **Zheng H, F. Ng, Y. Liu and P. E. Hardin (2008)** Spatial and Circadian Regulation of *cry* in *Drosophila*. J. Biol. Rhyth. 23(4):283-295