



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DE *Azadirachta indica* (MELIACEAE) EN EL RITMO DE  
SEROTONINA DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDÓPTERA:  
NOCTUIDAE).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

ERICK OYARZABAL ARMENDARIZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis de licenciatura a mis Padres **Elvira Armendariz Monsivais** y **Ciro Oyarzabal López**. A Mis hermanas **Carolina** y **Vanessa Oyarzabal Armendariz**.

*“El muchacho se quitó los lentes, que había usado desde los siete años, y los dejó caer al suelo. Se encontraban tan cerca, que pudo distinguir cada manchita dorada en las pupilas de la fiera, mientras los ojos de ambos se trababan en un silencioso diálogo. Todo desapareció: se encontró solo frente al animal en una vasta planicie de oro, rodeado de altísimas torres negras, bajo un cielo blanco donde flotaban seis lunas transparentes, como medusas. Vio que el felino abría las fauces, donde brillaban sus grandes dientes perlados... En el sueño se levantaba de su hamaca y se alejaba cautelosamente del campamento, sin ser visto por los centinelas. Al entrar al bosque, fuera del alcance de la luz de la hoguera y las lámparas de petróleo, veía al felino negro echado sobre la gruesa rama de un inmenso castaño, su cola moviéndose en el aire, sus ojos brillando en la noche como deslumbrantes topacios, tal como apareció en su visión, cuando bebió la poción mágica de Walimai. Con sus dientes y garras podía destripar a un caimán, con sus poderosos músculos corría como el viento, con su fuerza y valor podía enfrentar a cualquier enemigo. Era un animal magnífico, rey de las fieras, hijo del Sol Padre, príncipe de la mitología de América...”*

**Isabel Allende, 2002 “La Ciudad de las Bestias”.**

**El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Neurofisiología y Ritmos Biológicos, Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Elsa G. Escamilla Chimal. La técnica de HPLC se llevó a cabo en el Departamento de Hiperreactividad Bronquial del INER con el apoyo del Dr. José Luis Arreola Ramírez y del M. en C. Jesús Alquicira Mireles. El cultivo de la colonia de *S. frugiperda* se desarrolló con el apoyo técnico de la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruíz y los extractos de Azadiractina fueron proporcionados por la Dra. Patricia Guevara Fefer, ambas de la Facultad de Ciencias, UNAM.**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por brindarme la oportunidad de haber crecido personal y profesionalmente dentro de las aulas, los pasillos, el Amoxcalli y el Laboratorio de Neurofisiología y Ritmos Biológicos.

Agradezco a la Dra. Elsa G. Escamilla Chimal, mi tutora de tesis, por todo el aprendizaje, el apoyo y la paciencia durante este proyecto; que después de tanto tiempo por fin se ve concluido y con los frutos esperados, ¡gracias por todo! Así mismo, a la Dra. Patricia Guevara Fefer, por la confianza, el apoyo, el aprendizaje y la paciencia; gracias por todos los consejos y la sabiduría que se vieron reflejados en la culminación de este proyecto. Especialmente a la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruíz por el apoyo técnico, las observaciones y todas las recomendaciones para que se logrará el montaje de la colonia de *S. frugiperda*.

Gracias a los sinodales Dra. Patricia Guevara Fefer, Dr. José Luis Arreola Ramírez, Dra. María del Carmen Miñana Solís, M. en C. Beatriz Zúñiga Ruíz y Dra. Elsa G. Escamilla Chimal por el apoyo, tiempo y sugerencias para el desarrollo y revisión de la presente tesis.

Les agradezco al Dr. José Luis Arreola Ramírez y al M. en C. Jesús Alquicira Mireles del Departamento de Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por abrirme las puertas del laboratorio y apoyarme en la realización de la técnica experimental, gracias por los acertados consejos, comentarios y la ayuda para que este trabajo viera la luz.

Muchas gracias a la M. en C. Laura Patricia Lina García del Laboratorio de Control Biológico del Centro en Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por la donación del pie de colonia de huevecillos y larvas de *S. frugiperda*, indispensable para la realización de este trabajo. Extiendo el agradecimiento a la M. en F. P. Ana Isabel Bieler Antolín por permitirme aprender, tomar y asistir en las fotografías de *S. frugiperda* que se incluyen en la presente tesis.

A Maripaz, Alejandra, Fernando, César, Guadalupe, Dulce, Mariana, Fermín y Doña Paty por la ayuda, los consejos, la compañía y los buenos momentos que vivimos dentro del laboratorio, indispensables para la realización de este trabajo. Especialmente, a Gabriela por el apoyo y el soporte durante el desarrollo y la realización de la etapa experimental de la presente tesis.

A mi familia, gracias por empujarme y enseñarme que siempre hay que ir por más. A mis padres, Elvira y Ciro, que son el ejemplo a seguir, quisiera ser la mitad de las grandes personas que son ustedes ¡Gracias por todo el amor, la comprensión y el apoyo! A mis hermanas por el amor, apoyo y cariño incondicionales; que a pesar de ser más pequeñas me han dejado grandes enseñanzas. A Misael, gracias por todo el apoyo, consejos y regañadas que hubo durante el trayecto.

A todos mis amigos de la honorable Facultad de Ciencias. A los cachorros: Gonzalo, Antonio y Lalo ¡vaya travesía amigos! A Inari ¿Qué hubiera hecho yo sin tí? A todos los que formaron parte de este largo camino, Ariel, Neto, German, Jorge, Erick Alejandro, Citlali, Nayeli, Carolina, Susana, Vences, Juan Carlos, Hugo, Tonantzi y Edith. A mis amigos de la vida, Marco Antonio, Jesús y Quirino. A mis primos hermanos: Julio César, Luis Enrique, Jesús, Alejandro, Víctor, Fernando, Mariamme y Marco ¡son lo mejor!

Al Dr. Juan Alberto Cárdenas Medina por ayudarme a comprender y entender los procesos, las complejidades y las adversidades que se generan en mi cerebro ¡muchas gracias!

A todos los que están y estuvieron por cada momento, sonrisa y día que fueron precisos para llegar hasta aquí ¡Gracias!

## ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	9
2. RESUMEN.....	11
3. INTRODUCCIÓN.....	12
3.1. Los ritmos biológicos en la naturaleza.....	12
3.1.1. Propiedades generales de los ritmos circadianos.....	14
3.1.2. Sistema circadiano: responsable de los ritmos circadianos.....	15
3.1.3. Organización y ritmos circadianos en los insectos.....	17
3.1.4. La serotonina: importante neuromodulador en el sistema circadiano de los insectos.....	20
3.1.5. Sistema nervioso de los insectos.....	22
3.2. <i>Spodoptera frugiperda</i> como modelo de investigación en el estudio de los ritmos circadianos.....	26
3.2.1. Aspectos de la biología de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	26
3.2.2. Ciclo de vida.....	28
3.2.3. Daños e Importancia.....	30
3.2.4. Ritmos circadianos caracterizados en <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	31
3.3. <i>Azadirachta indica</i> : modelo de investigación con acción bioinsecticida y efectos en los ritmos circadianos de los insectos.....	33
3.3.1. El árbol del Nim.....	33
3.3.2. Importancia de los metabolitos secundarios producidos por <i>Azadirachta indica</i> .....	35
3.3.3. Efectos de los metabolitos secundarios de <i>A. indica</i> sobre el desarrollo y crecimiento de <i>S. frugiperda</i> .....	38
3.3.4. Influencia de los metabolitos secundarios de <i>A. indica</i> sobre los ritmos circadianos de insectos.....	40

3.3.5. Efectos de los metabolitos producidos por <i>A. indica</i> sobre la biosíntesis de serotonina.....	42
4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN.....	43
5. HIPOTESIS.....	45
6. OBJETIVO.....	45
6.1. GENERALES.....	45
6.2. PARTICULARES.....	45
7. MÉTODO.....	46
7.1. Modelo experimental.....	46
7.2. Diseño experimental.....	47
7.3. Preparación de las muestras.....	48
7.4. Técnica de HPLC.....	49
7.5. Identificación y Curva de calibración de la 5HT.....	50
7.6. Análisis estadístico.....	50
7.6.1. Análisis de Varianza de una vía (ANOVA).....	50
7.6.2. COSINOR.....	51
7.6.3. Cronogramas.....	51
8. RESULTADOS.....	52
8.1. Identificación de la 5HT en el ganglio cerebroide y el tubo digestivo de la larva de <i>S. frugiperda</i> .....	52
8.2. Cambios rítmicos de la concentración de 5HT en el ganglio cerebroide de la larva de <i>S. frugiperda</i> .....	54
8.2.1. Condición de LO.....	54
8.2.2. Condición de OO.....	56

<b>8.3. Cambios rítmicos de la concentración de 5HT en el tubo digestivo de la larva de <i>S. frugiperda</i>.....</b>	<b>60</b>
8.3.1. Condición de LO.....	60
8.3.2. Condición de OO.....	63
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
9.1. Identificación de la 5HT en el ganglio cerebroide y el tubo digestivo de la larva de <i>S. frugiperda</i> .....	66
9.2. Cambios rítmicos de la concentración de 5HT en el ganglio cerebroide de la larva de <i>S. frugiperda</i> bajo condiciones de LO y OO.....	67
9.3. Efecto del extracto químico de <i>A. indica</i> sobre la oscilación y concentración de 5HT en el ganglio cerebroide de la larva de <i>S. frugiperda</i> .....	74
9.4. Oscilaciones de la concentración de 5HT en el tubo digestivo de la larva de <i>S. frugiperda</i> .....	79
9.5. Efecto del extracto químico de <i>A. indica</i> sobre la oscilación y concentración de 5HT en el tubo digestivo de la larva de <i>S. frugiperda</i> .....	83
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>88</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>89</b>

## 1. ABREVIATURAS

<b>20-E</b>	20-hidroxiecdisona
<b>5-HIIA</b>	Ácido 5-hidroxiindolacético
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>5-HTP</b>	5-hidroxitriptófano
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza de una vía (Analysis Of Variance por sus siglas en inglés)
<b>AZA</b>	Azadiractina
<b>CA</b>	<i>Corpora allata</i>
<b>CB</b>	Cuerpo central
<b>CC</b>	<i>Corpora cardíaca</i>
<b>CRY</b>	Criptocromo
<b>CT</b>	Tiempo circadiano (Circadian Time por sus siglas en inglés)
<b>DDC</b>	Enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa
<b>DMC</b>	Dieta merídica control
<b>DME</b>	Dieta merídica experimental
<b>GCE</b>	Ganglio cerebroide
<b>GP</b>	Glándula protorácica
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography)
<b>JET</b>	Jet lag
<b>HJ</b>	Hormona juvenil
<b>LA</b>	Lóbulos antenales
<b>LCB</b>	Parte inferior del cuerpo central
<b>LO</b>	Luz-Oscuridad
<b>LOPS</b>	Lóbulos ópticos
<b>MAO</b>	Enzima monoamina oxidasa
<b>MB</b>	Mushrooms bodies o corpora pedunculata
<b>NL</b>	Neuronas laterales
<b>NV</b>	Neuronas ventrolaterales
<b>OC</b>	Oscilador central
<b>OO</b>	Oscuridad constante
<b>OP</b>	Oscilador periférico

<b>PB</b>	Puente protocerebral
<b>PBAN</b>	Neuropéptido activador de la biosíntesis de la feromona
<b>PDF</b>	Factor de dispersión pigmentaria
<b>PI</b>	<i>Pars intercerebralis</i>
<b>PL</b>	<i>Pars lateralis</i>
<b>PTTH</b>	Hormona protoracicotrópica
<b>SF</b>	Señal fóptica
<b>SGG</b>	SHAGGY
<b>SNCI</b>	Sistema nervioso central de los insectos
<b>SNF</b>	Señal no fóptica
<b>SOG</b>	Ganglio suboesofágico
<b>TD</b>	Tubo digestivo
<b>TIM</b>	TIMELESS
<b>TPH</b>	Enzima triptófano hidroxilasa
<b>Tr</b>	Tiempo de retención
<b>Tr-5HT</b>	Tiempo de retención de la serotonina
<b>XL</b>	Lóbulos accesorios
<b>ZT</b>	Tiempo del sincronizador (Zeitgeber Time por sus siglas en inglés)

## 2. RESUMEN

*Spodoptera frugiperda* es una polilla considerada la principal plaga del maíz. La fase larval produce pérdidas de hasta el 60% del rendimiento total de los cultivos. Extractos químicos provenientes de la planta *Azadirachta indica* tienen efectos negativos en el desarrollo de este insecto, por lo cual se ha propuesto a esta planta como materia prima para la elaboración de biopesticidas. Hay pocos estudios sobre el efecto de estos extractos en la fisiología de *S. frugiperda*. Por otra parte, la 5HT es un neuromodulador muy importante en el sistema nervioso de los insectos. Está implicada en las asas de retroalimentación del sistema circadiano, en la liberación de hormonas y la digestión. En el presente trabajo se caracterizó el ritmo circadiano de la concentración de 5HT en el ganglio cerebroide y el tubo digestivo de la larva de *S. frugiperda* y se evaluó el efecto del extracto metanólico de *A. indica* sobre dichas oscilaciones. El diseño experimental consistió en los grupos control en el que se utilizaron 144 larvas alimentadas con dieta meridica control; para el grupo experimental se utilizaron 144 larvas alimentadas con dieta meridica adicionada con 1ppm de extracto metanólico de semilla de *A. indica*. Ambos grupos se sometieron a condiciones controladas; cada grupo se dividió en dos grupos sometidos a un fotoperiodo LO 12:12 y OO, respectivamente. Los ganglios cerebroides y tubos digestivos fueron extraídos en seis diferentes horas del día; la 5HT se cuantificó mediante HPLC, los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* Tukey, así como el análisis de Cosinor. Los resultados obtenidos en el ganglio cerebroide no mostraron un ajuste a 24h en LO, mientras que sí existe un ajuste significativo en OO; por lo que la oscilación de 5HT en el ganglio cerebroide podría estar enmascarada por la luz. En el tubo digestivo tanto en fotoperiodo LO como en OO, se detectó que la oscilación de la concentración de 5HT se ajustó a un periodo de 24 h presentando un circadiano. Por otra parte, se observó que el extracto no suprimió la expresión de los ritmos circadianos de 5HT en ninguno de los tejidos, pero sí provocó un desfase de las acrofases y un aumento en la concentración en ganglio cerebroide, así como una disminución en el tubo digestivo.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Los ritmos biológicos en la naturaleza.

La duración de los movimientos de la Tierra ha fluctuado a lo largo de millones de años desde la formación del Sistema Solar. Hace 4450 millones de años, dicha duración era aproximadamente de 6 horas para el movimiento rotatorio y 1430 días para el movimiento de traslación. Fue hasta hace 65 millones de años cuando la duración aumentó a 23.60 horas y 370 días, respectivamente (Arbab, 2009; Williams, 2000). Esta modificación ha actuado como una presión de selección para los organismos que los han provisto de mecanismos para medir el tiempo, los relojes biológicos. Actualmente, la gran mayoría de los ritmos expresados por estos relojes tienen un periodo concordante con el periodo de rotación de la Tierra (Bell-Pedersen, *et al.*, 2005).

Los marcapasos biológicos, como también se conocen a los relojes biológicos, son ubicuos y están presentes en diferentes niveles de organización: bacterias, hongos, plantas, peces, anfibios, reptiles, insectos y mamíferos, éstos relojes les proporcionan una ventaja adaptativa a los organismos para sobrevivir a entornos cambiantes, permitiéndoles anticipar eficientemente eventos periódicos como: la disponibilidad de alimento, la presencia de competidores y depredadores, el amanecer y el anochecer, las migraciones, la búsqueda de una pareja sexual, etc. (Roenneberg y Merrow, 2002; Bell-Pedersen, *et al.*, 2005). Por lo tanto, estos mecanismos confieren un nicho temporal a los organismos, lo que les permite restringir procesos internos y actividades conductuales a establecidas horas o fases del día, al aumentar así las posibilidades de sobrevivir (Roenneberg y Merrow, 2002; Bloch, *et al.* 2013; Rodrigo, *et al.*, 2007).

La cronobiología es la rama científica encargada del estudio de los ritmos biológicos, que abarca aspectos oscilatorios a diferentes niveles como molecular, celular, fisiológico, ecológico, etc. (Vega, 1993). El desarrollo de esta disciplina está dado por el análisis y la interpretación de la expresión cíclica de las variables biológicas, que a través del tiempo se ajustan a una forma ondular, muy similar a la función matemática del coseno.

Las características de los ritmos biológicos se pueden definir de la siguiente manera y se observan gráficamente en la figura 1 (Vega, 1993; Cornelissen, 2014):

**I. *Periodo*:** es el intervalo de tiempo que ocurre entre dos fases idénticas (p. ej. entre acrofase y acrofase) respecto a un punto o valor de referencia. Es decir, la duración de un ritmo completo expresado en unidad de tiempo; se denomina con  $\tau$  (tau) cuando se trata de un ritmo endógeno y con **T** cuando se refiere al periodo del ritmo del *zeitgeber* (principal agente externo capaz de sincronizar el ritmo endógeno de algún organismo con el ritmo propio; el sincronizador más importante y estudiado es la luz).

**II. *Frecuencia*:** se refiere al número de veces que se repite un suceso en determinado tiempo.

**III. *Mesor o media*:** es el valor promedio de todos los valores de un ritmo.

**IV. *Amplitud*:** es la magnitud de la variación de un suceso en determinado tiempo. Es decir, la diferencia entre el valor máximo y mínimo del ritmo; y se representa con **a**, en tanto que la amplitud del *zeitgeber* se representa con **A**.

**V. *Fase*:** es el valor de un evento dado durante el ritmo y se simboliza  $\phi$  (phi).

**VI. *Acrofase*:** es el valor máximo que alcanza un ritmo.

**VII. *Batifase*:** es el valor mínimo de un ritmo.

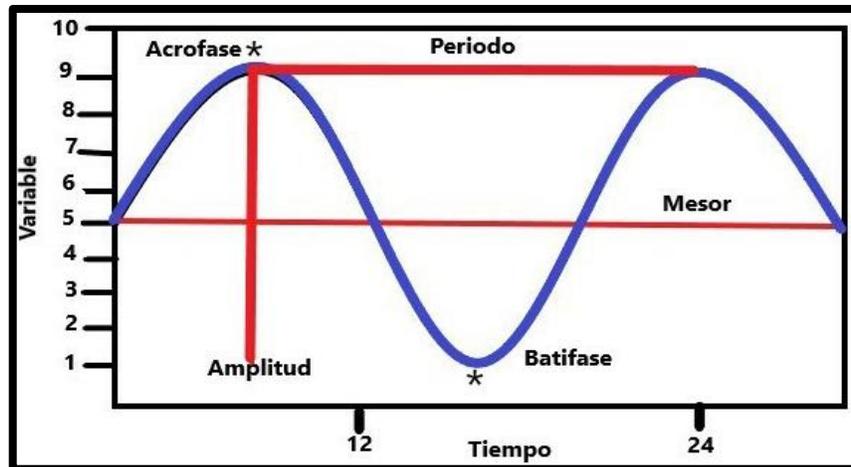


Figura 1. Características de un ritmo biológico (modificado de Vega, 1993 y Cornelissen, 2014).

### 3.1.1. Propiedades generales de los ritmos circadianos.

Los ritmos circadianos son las variaciones rítmicas biológicas que tienen origen endógeno y periodo que fluctúa entre 20 y 28 horas por ciclo. Aquellos ritmos cuya duración es menor a 20 horas se denominan ultradianos, mientras que los ritmos infradianos tienen periodo mayor a 28 horas (Cardinali y Bernasconi, 2009). Además de periodo definido, los ritmos circadianos presentan las siguientes propiedades:

- a) Se expresan y persisten bajo condiciones ambientales constantes de luz y temperatura, lo cual denota que el organismo tiene un mecanismo endógeno que le da noción del tiempo; que le permite presentar oscilación espontánea en condiciones constantes, que se debe mantener a lo largo de varios días, a lo que se conoce como libre corrimiento (Goto, 2013; Tauber y Kyriacou, 2001). A diferencia de los ritmos circadianos, los ritmos diarios presentan un periodo cercano a las 24 horas; sin embargo, la expresión de este ritmo está dada por las condiciones ambientales de luz-oscuridad y no están regulados endógenamente (Saunders 2002).
- b) La capacidad de sincronizarse con un ciclo ambiental. Esto ocurre cuando la fase y frecuencia del ritmo del organismo se ajustan a la fase y la frecuencia de los ciclos ambientales, estableciéndose una relación de fase estable. En la sincronización, el ciclo ambiental da razón del tiempo al organismo. Las señales ambientales más importantes son los ciclos de luz-oscuridad, la ingesta alimentaria, la temperatura y

entre otros (Goto, 2013; Saunders, 2002; Cardinali y Bernasconi, 2009; Tauber y Kyriacou, 2001).

- c) Los ritmos biológicos presentan mínimas y sutiles variaciones con respecto a los cambios de la temperatura. Esto se debe a la independencia entre el periodo del ritmo y de la temperatura. Los cambios de temperatura son permisibles siempre y cuando se encuentren dentro del rango en el que las funciones metabólicas no sean afectadas. La capacidad compensatoria que tienen los organismos es muy importante para la vida diaria (Goto, 2013; Saunders, 2002; Cardinali y Bernasconi, 2009; Tauber y Kyriacou, 2001).

### **3.1.2. Sistema circadiano: responsable de los ritmos circadianos.**

El sistema circadiano es la compleja red de osciladores que da lugar a la expresión de los ritmos biológicos; siendo un mecanismo efectivo para medir el tiempo. Esta organización temporal de la vida ha evolucionado en una estrecha relación con los fluctuantes ciclos ambientales de la Tierra. Sin embargo, este sistema en ausencia de estímulos externos es capaz de mantener la expresión de los ritmos biológicos con un periodo muy cercano a las 24 horas (Saunders, 2002; Hirota y Fukada, 2004). A continuación, se describen los componentes (ver fig. 2):

**I. Las vías de entrada** reciben y procesan las señales temporales provenientes de la luz (SF), la temperatura, alimentación (SNF), etc. (Hirota y Fukada, 2004; Cermakian y Sassone-Corsi, 2000; Saunders, 2002).

**II. Los relojes biológicos** son los encargados de organizar temporalmente al sistema. Al reloj u oscilador central o maestro se le llama marcapasos, que es el encargado de procesar y enviar la información hacia el resto de las estructuras o componentes del sistema; como los osciladores periféricos, pero con el periodo y frecuencia establecidos por el marcapasos y el acoplamiento entre ellos. Los marcapasos poseen las siguientes características (Saunders, 2002; Hirota y Fukada, 2004; Cermakian y Sassone-Corsi, 2000):

- a) Actividad oscilatoria circadiana autónoma en condiciones constantes de oscuridad o luz.
- b) Sincronización con señales externas para ajustar la fase propia a la fase de los parámetros ambientales como la luz, predominantemente, temperatura y/o alimentación, etc.
- c) Pérdida del ritmo circadiano después de la ablación de tejidos o grupos celulares específicos pertenecientes al marcapasos.
- d) El trasplante de células específicas del oscilador o el marcapasos íntegro, puede restaurar los ritmos biológicos en organismos arrítmicos por lesiones del reloj propio. Después de la cirugía, los ritmos reflejados presentan el período de los ritmos del donante.
- e) La expresión de actividad circadiana del tejido marcapaso aislado *in vitro* por un lapso razonable (depende de la especie).

**III. Los efectores** son las estructuras que expresan y transmiten los ritmos circadianos ya sea a otras estructuras del sistema y/o hacia las **vías de salida**. Las asas de retroalimentación son las vías aferentes y eferentes entre los diferentes componentes del sistema.

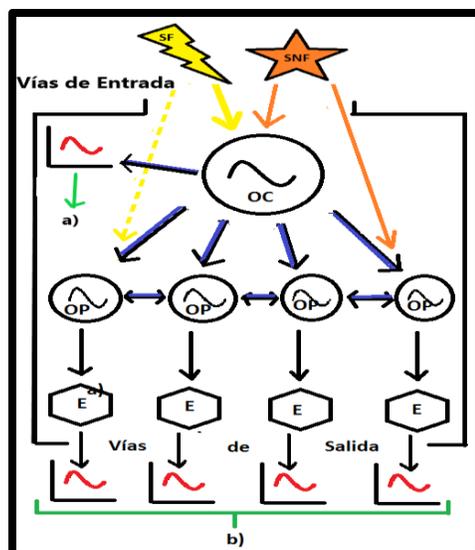


Figura 2. Sistema circadiano en mamíferos. a) Ritmo circadiano generado por el marcapasos, b) Ritmos circadianos, ultradianos, infradianos generados por el sistema circadiano. OC, oscilador central; OP, oscilador periférico; E, efector. (Modificado de Rodríguez-Muñoz, 2011).

### 3.1.3. Organización y ritmos circadianos en los insectos.

Los insectos manifiestan gran variedad de ritmos biológicos. Los más evidentes son los conductuales: las abejas visitan las flores en ciertos momentos del día; los mosquitos buscan la sangre al amanecer y al anochecer; durante la noche las polillas vuelan y se reproducen, mientras que los grillos machos estridulan para atraer pareja y las cucarachas buscan resquicios de comida (Tomioka y Matsumoto, 2015; Bell-Pedersen, *et al.*, 2005; Bloch, *et al.* 2013). También, presentan los ritmos fisiológicos que dan pauta para la alimentación, la oviposición, la pupación, la eclosión de los huevecillos y de la pupa, la liberación de feromonas, la producción del espermatozoido, la respiración, la deposición de cutícula. Así mismo, estas oscilaciones están restringidas a una fase, ya sea el día o la noche (Tomioka y Matsumoto, 2015; Bell-Pedersen, *et al.*, 2005; Bloch, *et al.* 2013). Por otra parte, los insectos son el grupo de animales más próspero y altamente divergente; viven en diversos ambientes, que van desde regiones tropicales a zonas polares y desde el nivel mar hasta las altas montañas (Bloch, *et al.* 2013). El estudio y la elucidación de los mecanismos del sistema circadiano son esenciales para comprender la evolución y la diversificación de dichos artrópodos.

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, ha resultado modelo efectivo para la identificación de las estructuras del sistema circadiano en insectos, mediante técnicas de ablación y lesión de las estructuras putativas como relojes biológicos (Tataroglu y Emery, 2014). Existen diferencias en la localización de los osciladores circadianos entre los insectos hemimetábolos y holometábolos. En las cucarachas y los grillos se han identificado neuronas reloj en los lóbulos ópticos (LOPS) (Tomioka y Matsumoto, 2015); mientras que en las moscas y los lepidópteros estas neuronas fueron identificadas en diversos ganglios en el protocerebro (Tataroglu y Emery, 2014; Kyriacou, 2009). A diferencia de los mamíferos, donde prácticamente todas las áreas del cerebro son un reloj periférico; en los dípteros y lepidópteros, las regiones del cerebro fuera de la red neuronal del reloj maestro no contienen todos los componentes moleculares necesarios para ser reloj circadiano funcional, pero si existen relojes periféricos (Nitabach y Taghert, 2008; Kyriacou, 2009). En *Drosophila* se han identificado como los osciladores circadianos a: las NV, NL, al *PL*, al CB, a los MB y la *PI* (Tomioka y Matsumoto, 2019). Para los lepidópteros se han corroborado varios marcapasos circadianos dentro del protocerebro, que oscilan en sincronía: los LA, la *PI* y la *PL* (Reppert, *et al.*, 2010; Tomioka y Matsumoto, 2019).

La célula es la unidad fundamental de la vida, los estudios cronobiológicos coadyuvan esta premisa, ya que se ha encontrado que las células de los relojes biológicos oscilan con un período aproximado de 24 horas de forma autosostenida. Este periodo es exacto cuando oscilan multicelularmente, en sincronía con el fotoperiodo (Saunders, 2002; Goto, 2013; Lazzari e Insausti, 2008). El mecanismo de las neuronas reloj en *D. melanogaster* y *Danaus plexippus* (la mariposa monarca) consiste en un asa de retroalimentación negativa entre la transcripción de genes y la traducción de proteínas que impulsan las oscilaciones circadianas, como se puede ver en la figura 3 (Reppert, *et al.*, 2010; Tomioka y Matsumoto, 2019; Kyriacou, 2009).

La fotorrecepción es una de las vías de entrada al sistema circadiano que transmite la señal de la fase del *zeitgeber*, está mediada por los lóbulos ópticos y los osciladores circadianos de *Drosophila* y los lepidópteros (Reppert, *et al.*, 2010; Tomioka y

Matsumoto, 2019; Kyriacou, 2009; Lamba, *et al.*, 2014). No obstante, existen otras vías fóticas y no fóticas que restablecen e influyen sobre el ritmo de las neuronas reloj.

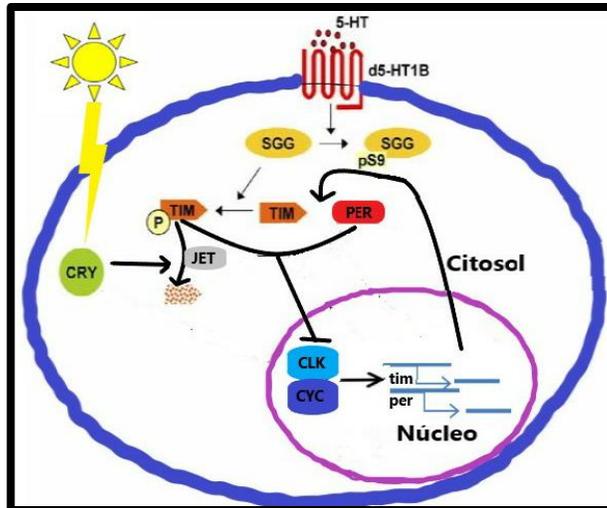


Figura 3. Mecanismo del reloj molecular en *D. melanogaster*. SHAGGY (SGG) fosforila a TIM en el citosol de la célula reloj y promueve la translocación de la asociación de las proteínas TIM-PER. El aumento de 5HT o del receptor d5-HT1B disminuye la fosforilación de TIM. Asimismo, el criptocromo (CRY), en conjunto con JETLAG (JET), degrada a TIM fosforilado; induciendo un cambio de fase del reloj. En el núcleo, TIM-PER reprimen la actividad transcripcional de CLK/CYC, lo que reduce los niveles de mRNA de *per* y *tim*, a su vez se reducen los niveles de PER y TIM, lo que libera al CLK/CYC y se inicia la transcripción de *per* y *tim* al inicio de la noche (Yuan, *et al.* 2005).

El marcapasos le da razón del tiempo a los osciladores periféricos que se encuentran fuera del cerebro, a lo largo del sistema nervioso y en el resto del cuerpo, para que estén en sincronía y cumplan con las diversas funciones biológicas. En el caso de los lepidópteros se han identificado como osciladores periféricos dentro del cerebro a los LOPS, las CC y CA. Mientras que el intestino, la epidermis y los tejidos reproductivos son osciladores periféricos que se encuentran en el cuerpo de estos artrópodos (Reppert, *et al.*, 2010; Tomioka y Matsumoto, 2019; Kyriacou, 2009). Por ejemplo, en las palomillas, el PBAN (neuropéptido activador de la biosíntesis de la feromona) es un regulador hormonal circadiano que sincroniza la producción de las feromonas sexuales (Bloch, *et al.*, 2013). La *PI* y el SOG sintetizan el PBAN durante la fotofase, que posteriormente es transportado a la CC. La HJ, que se encuentra en la CA (este oscilador periférico está sincronizado a la *PI*, oscilador circadiano), regula la liberación rítmica del PBAN a la hemolinfa. Al igual que la 5-HT, el PBAN se une a receptores ubicados en la membrana

de las células de la glándula productora de feromona, que activan la entrada de calcio al citoplasma y vía segundo mensajero estimula la síntesis de las moléculas de la feromona sexual. La neurosecreción de otros mensajeros es similar a la del PBAN (Bloch, *et al.*, 2013; Groot, 2014). También, la transmisión del mensaje es similar mediante receptores que vía segundo mensajero activan cascadas de señalización que dan la pauta para el inicio de diversas funciones, dependiendo del tejido o estructura (Neckameyer y Leal, 2017).

#### **3.1.4. La serotonina: importante neuromodulador en el sistema circadiano de los insectos.**

La 5-Hidroxitriptamina o mejor conocida como serotonina actúa como neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona (cuando es liberada al sistema de circulación); siendo idéntica la síntesis tanto en vertebrados como en invertebrados e incluso es sintetizada por organismos vegetales (Blenau y Baumann, 2001; Cardinali, 1994; Pelagio-Flores, *et al.* 2011). La 5-HT es una monoamina que se sintetiza a partir del aminoácido esencial L-triptófano, por medio de dos reacciones químicas: en la primera, la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), unida al cofactor tetrahidrobiopterina añade un grupo hidroxilo al triptófano, dando como resultado la molécula de 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Posteriormente, la enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa (DDC) quita un grupo carboxilo al 5-HTP, formando así la molécula de 5-HT (ver figura 4). Después, esta monoamina puede ser precursora de la melatonina, o bien, ser degradada por la monoamina oxidasa (MAO) en ácido 5-hidroxitriptacético (5-HIAA) (Blenau y Baumann, 2001; Blenau y Thamm, 2011; Vleugels, *et al.* 2015).

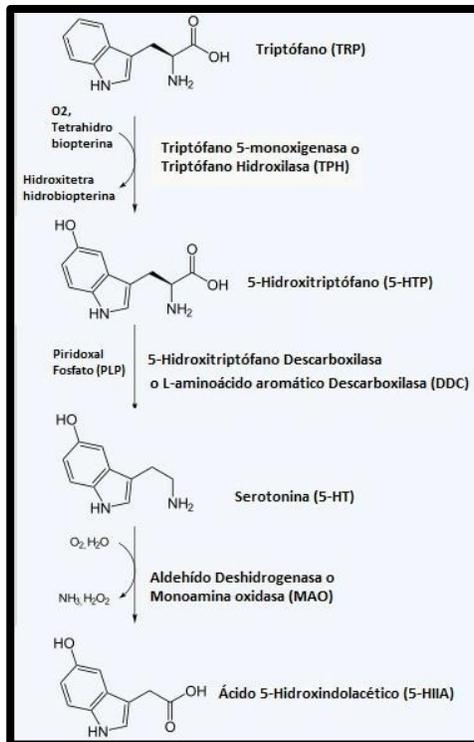


Figura 4. Biosíntesis de 5-HT a partir del TRP y degradación en 5-HIAA (Modificada de Blenau y Baumann, 2001; Blenau y Thamm, 2011; Vleugels, *et al.* 2015).

Las funciones específicas de la serotonina están mediadas por su unión y la posterior activación de los receptores de membrana; la 5HT está almacenada en las terminales sinápticas para ser liberada en las sinapsis químicas, cuando se une a proteínas específicas del receptor. La gran mayoría de estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, que posteriormente activan o inhiben vía segundo mensajero diferentes cascadas intracelulares (Blenau y Thamm, 2011; Wu y Cooper, 2012). En los insectos han sido identificados cinco receptores de 5HT, que se han denominado: d5HT1a, d5HT1b, d5HT2a, d5HT2b y d5HT7 (Wu y Cooper, 2012; Yuan, *et al.* 2005; Yuan; *et al.*, 2006). La 5HT está mediando la sensibilidad del mecanismo molecular de las neuronas reloj a la luz. Durante la fotofase (fase lumínica) el receptor d5-HT1b trasloca a la 5HT al interior de la célula. El aumento de 5HT promueve la fosforilación de SGG en el citoplasma, inactiva a esta enzima, por ende, disminuye la fosforilación de TIM, como se puede ver en la figura 3 (Yuan, *et al.* 2005).

### 3.1.5. Sistema nervioso de los insectos.

El sistema nervioso central de los insectos (SNCI) consiste en la serie de estructuras (el protocerebro, el deutocerebro y el tritocerebro) que conforman el ganglio cerebroide (GCE) y la cadena ganglionar o nerviosa ventral que se extiende sobre los segmentos torácicos y algunos segmentos abdominales, dependiendo de la especie (Ito, *et al.*, 2014; Zordan y Sandrelli, 2015). Existe una diferencia entre los GCE de las fases juveniles de los insectos holometábolos y hemimetábolos: los ganglios cefálicos de las larvas están diferenciados pero fusionadas; mientras, que en las ninfas existe mayor grado de diferenciación y tejido intermedio entre dichas estructuras (Ito, *et al.*, 2014; Zordan y Sandrelli, 2015). El protocerebro es el ganglio que se encuentra en la parte más anterior de la cabeza y contiene muchas subestructuras o ganglios complejos (ver figura 5):

Los LOPS de los insectos se compone de tres ganglios que van desde distal a proximal: lámina (L), médula (M) y lóbula (Lo). Los LOPS son los osciladores circadianos de los grillos *Gryllus bimaculatus* y *Acheta domesticus* (Cymborowski, 1998; Tomioka, *et al.* 1993). Durante la fotofase, el acoplamiento entre ambas estructuras está mediado por las neuronas bilaterales medulares, que mediante la liberación y captación de 5-HT reciben e intercambian información fótica de los fotorreceptores e información circadiana de los osciladores (Cymborowski, 1998; Nishinobuki y Tomioka, 2000; Tomioka *et al.*, 1993; Tomioka, 1999). En el moscardón, *Calliphora vicina*, se observó la importancia de la 5-HT como mediador en los cambios circadianos en el sistema visual de este insecto, incluyendo a los fotorreceptores extrarretinianos, al igual que en el sistema visual de *D. melanogaster*, *G. bimaculatus* y *A. domesticus* (Cantera y Carlberg, 1988; Cymborowski, 1998; Yuan, *et al.* 2005).

Los MB: Aproximadamente son 2500 neuronas que conforman este ganglio en *D. melanogaster* y 170, 000 en *Apis mellifera*, y que están mediando el aprendizaje, la memoria olfativa, la memoria asociativa, el sueño y el control locomotor (Blenau y Thamm, 2011). Todas las fibras serotoninérgicas detectadas en los MB son extrínsecas que se extienden desde el cuerpo o cerebro central. Yuan y colaboradores (2006) probaron que el receptor d5HT1a está implicado en la promoción del sueño. Las moscas

que expresaron una variante mutada de d5HT1a mostraron el periodo de sueño reducido y fragmentado. Pero al restaurar la expresión de este receptor en los MB, los dípteros mostraron el patrón de sueño típico (Yuan, *et al.*, 2006).

El complejo o cerebro central: es un ganglio que recibe inervaciones multimodales serotoninérgicas de la mayoría de las estructuras del GCE; está compuesto por el puente protocerebral (PB), el CB y la parte inferior del cuerpo central (LCB) (Ito, *et al.*, 2014; Zordan y Sandrelli, 2015). El cerebro central integra y controla la actividad locomotora, regulando varios aspectos del comportamiento como caminar y volar; también, es el centro de integración de la información visual, desempeñando un papel en la memoria visual y el aprendizaje (Sitaraman, 2008).

Las *PI*, *PL*, *CC* y *CA* son cuatro ganglios diferenciados que conforman el sistema neuroendocrino de los insectos. Las *PI* y *PL* son los marcapasos de los insectos holometábolos y están encargadas de la neurosecreción de diversas moléculas neurotransmisoras y hormonas (Zordan y Sandrelli, 2015; Ito, *et al.*, 2014; Tomioka y Matsumoto, 2019). La biosíntesis de la 5-HT se ajusta al periodo circadiano en la palomilla del algodón *B. mori*, en el grillo *A. domesticus* y en la mosca *D. melanogaster* (Fowler *et al.*, 1972; Muszynska y Cymborowski, 1978). Por otro lado, la *PI* está encargada de liberar 5-HT en el complejo central; controlando la intensidad de la actividad locomotora: a una mayor concentración de 5HT los insectos son más activos en todas las conductas y viceversa a una menor concentración (Pandey y Habibulla, 1982). En la cucaracha, *P. americana*, la disminución de 5HT repercutió en la digestión de la alimentación suministrada; por lo que, también tiene efectos en la actividad alimentaria de estos animales (Matsui, 2009). Las *CC* y *CA* producen la HJ que, junto con la ecdisona producida y liberada por la glándula protorácica, controlan el crecimiento y la muda de los insectos (Jagota y Habibulla, 1992). En las larvas, pupas y los adultos de *D. melanogaster* se ha corroborado que existen neuronas serotoninérgicas que inervan a la glándula protorácica y regulan la biosíntesis de los ecdiesteroides (ecdisona, la PTTH, entre otras hormonas) (Shimada-Niwa y Niwa, 2014). En la polilla de la seda china, *A. pernyi*, la liberación de la PTTH en las neuronas neurosecretoras y el cuerpo

provoca la metamorfosis, mientras que el bloqueo de esta hormona promueve la diapausa (Wang, *et al.*, 2013). El receptor d5HT1b es el mediador en el bloqueo de la síntesis y la liberación de PTTH, manteniendo la diapausa en condiciones de un fotoperiodo corto y promoviendo la metamorfosis en un fotoperiodo largo (Wang, *et al.*, 2013). Por otra parte, Range y colaboradores (2002) demostraron la síntesis de varias isoformas de la HJ en la CA de gusanos cogolleros en el quinto y sexto estadio y en las CC y CA de palomillas hembras de *S. frugiperda*. Las estructuras empleadas en este estudio fueron obtenidas *in vitro*. La HJ en los adultos induce la producción de vitelogenina, proteína esencial para la formación de huevecillos; en el caso de las larvas promueve la muda entre los estadios y cuando está en bajos niveles se lleva a cabo la pupación (Range, *et al.*, 2002).

El deutocerebro es la segunda división del GCE. Los LA son ganglios que se encuentran en esta región del cerebro. El deutocerebro también recibe aferencias mecanosensoras de la superficie de la cabeza, de los LOPS, los lóbulos accesorios (XL) y del CB (Ito, *et al.*, 2014; Zordan y Sandrelli, 2015). La 5HT modula la respuesta del centro olfatorio principal (LA) de los machos de *B. mori* y *M. sexta*, a las feromonas; la información recabada por estas neuronas es enviada al protocerebro (Gatellier, *et al.*, 2004).

El tritocerebro es el tercer ganglio cerebral de los insectos, que se encuentra ventralmente a ambos lados del inicio del tubo digestivo. El tritocerebro, al igual que el deutocerebro, también da lugar a neuronas serotoninérgicas eferentes y aferentes de los ganglios más anteriores; la eferencias de este ganglio conectan al cerebro con las estructuras bucales (Ito, *et al.*, 2014; Zordan y Sandrelli, 2015). En el caso de *D. melanogaster*, la 5HT modula las respuestas de la alimentación, activando la locomoción de los insectos para la búsqueda de comida, la masticación o deglución del bolo alimenticio y la señalización de la sensación de hambre (Schoofs, *et al.* 2018).

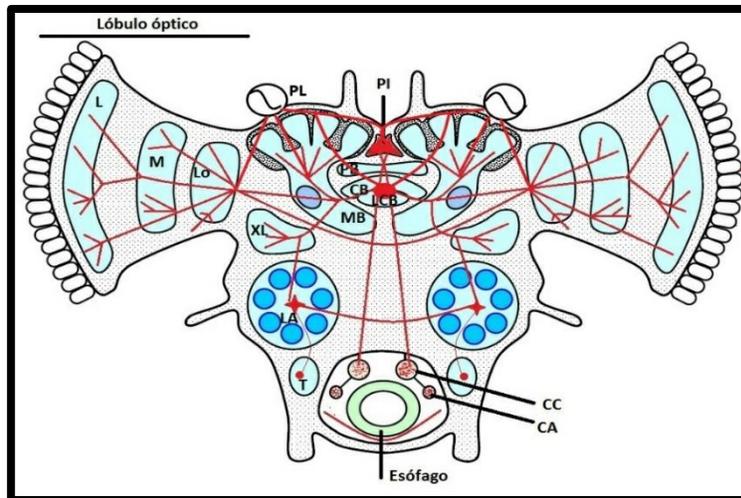


Figura 5. Esquema general del GCE de los insectos holometábolos, en color rojo se localiza la red neuronal serotoninérgica. T, tritocerebro (modificada de Nässel, 1988; Granger, *et al.* 1989; Nässel y Elekes, 1985; Homberg y Hildebrand, 1989; Blenau y Thamm, 2011; Vleugels, *et al.* 2015; Shimada y Niwa, 2014).

La 5HT también está presente en los ganglios mesotorácicos y órganos neurohemales. En el insecto palo, *Carausius morosus*, se ha corroborado la inervación de axones serotoninérgicos que se ramifican por todos los ganglios estomatogástricos (Luffy y Dorn, 1991). Flanagan (1984) mediante trabajos de inmunohistoquímica encontró la presencia de 5HT en los ganglios mesotorácicos del hemíptero *Rhodnius prolixus*; sin embargo, no obtuvo resultados positivos en los órganos neurohemales. También, en el caso de los lepidópteros se ha identificado inmunorreactividad de 5HT en la cadena ganglionar del gusano de la píceca oriental, *Choristoneura fumiferana*, y del gusano de la seda, *M. sexta*. En los sistemas nerviosos de estas larvas se observó que el SOG tiene seis pares de neuronas inmunorreactivas a 5HT; mientras que cada ganglio de la cadena nerviosa ventral tiene dos pares de neuronas serotoninérgicas, cuyas proyecciones axonales se extienden en forma de red en el lado dorsal de dicha cadena, como se puede observar en la figura 6 (Sivasubramanian, 1992; Homberg y Hildrebrand, 1989; Granger, *et al.*, 1989). Por otra parte, en la larva de *D. melanogaster*, las neuronas serotoninérgicas contribuyen al control motor de la alimentación; el aumento de 5HT promueve los movimientos peristálticos del tubo digestivo y la disminución de esta monoamina los ralentiza (Schoofs, *et al.* 2018; Wu y Cooper, 2012).

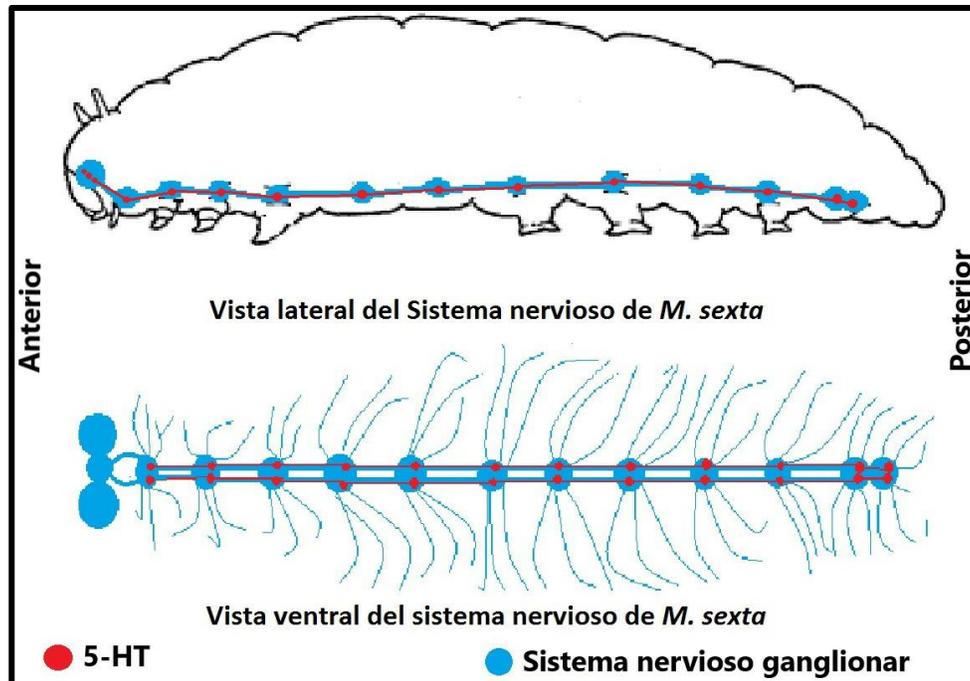


Figura 6. Distribución de la 5HT en la cadena ganglionar de *C. fumiferana* y *M. sexta*.

### 3.2. *Spodoptera frugiperda* como modelo de investigación en el estudio de los ritmos circadianos.

#### 3.2.1. Aspectos de la biología de *Spodoptera frugiperda*.

*S. frugiperda* es un insecto holometábolo que pertenece a la familia Noctuidae, dentro del orden Lepidóptera, que agrupa a más de 35,000 especies de polillas. A este insecto fitófago comúnmente se le conoce como el gusano cogollero, la palomilla del maíz o el gusano vainero (Peairs y Saunders, 1979). La especie fue descrita por primera vez en 1797 como *Phaleana frugiperda*; para 1958 este ya pertenecía al género *Spodoptera*. En dicho género se encuentran agrupadas otras 37 especies. En la tabla 1 se desglosa la clasificación taxonómica completa de *S. frugiperda*.

Tabla 1 Clasificación taxonómica del gusano cogollero.

<b>Reino</b> Animalia
<b>Phylum:</b> Arthropoda
<b>Subphylum:</b> Hexapoda
<b>Clase:</b> Insecta
<b>Subclase:</b> Endopterygota
<b>División:</b> Pterygota
<b>Orden:</b> Lepidoptera
<b>Suborden:</b> Frenatae
<b>Superfamilia:</b> Noctuoidea
<b>Familia:</b> Noctuidae
<b>Tribu:</b> Prodeniini
<b>Género:</b> <i>Spodoptera</i> Guenée, 1852
<b>Especie:</b> <i>S. frugiperda</i> J. E. Smith 1797.

*S. frugiperda* es endémica del continente americano. El gusano cogollero no presenta diapausa y es difícil observarlo en lugares con temperaturas menores a los 10°C, por lo que su centro de origen se ubica en el Trópico Americano (Luginbill, 1928; Carpenter, et al. 1986). No obstante, se distribuye desde el sur de Canadá hasta el norte de Argentina y Chile, como se puede observar en la figura 7, dichas regiones se caracterizan por ser regiones templadas con temperaturas que llegan hasta los 5°C (Ashley, 1986; Nagoshi y Meagher, 2008). Debido a la estacionalidad, se han registrado migraciones que van de generación en generación en búsqueda del sitio óptimo en condiciones ambientales y ecológicas para su sobrevivencia a lo largo del continente americano. Desde la mitad del verano, poblaciones de *S. frugiperda* se dirigen del norte de Estados Unidos hacia zonas más cálidas como el Golfo de México y Cuba a pasar el invierno, recorriendo distancias de más 480km por solo una generación (Nagoshi y Meagher, 2008; Meagher y Nagoshi, 2004; Carpenter, et al. 1986). En México, la abundancia poblacional es más alta en Morelos, Michoacán, Oaxaca, Quintana Roo y Yucatán; tiende a disminuir en regiones templadas ubicadas ya sea en el norte del país o por encima de los 2,000 msnm como Puebla, Tlaxcala, Querétaro y Estado de México (Sifuentes, 1976). Sin embargo, existen otros factores que influyen sobre la dinámica poblacional: el calendario de siembra de gramíneas y otras especies agrícolas, el manejo de plagas en los cultivos, así como los agentes biológicos que actúan como enemigos naturales (Carpenter, et al. 1986).

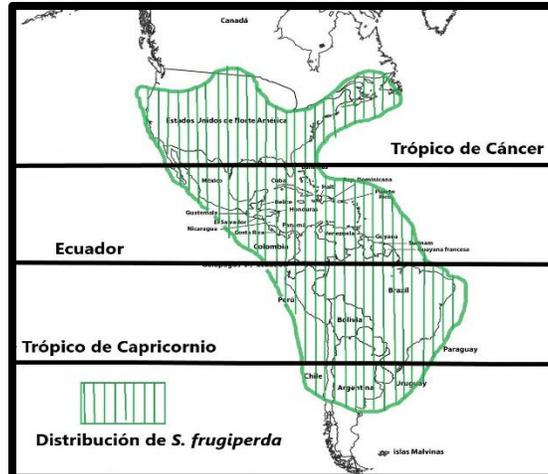


Figura 7. Distribución geográfica del gusano cogollero (modificado de Ashley, 1986).

### 3.2.2. Ciclo de vida.

La duración del desarrollo o ciclo de vida de *S. frugiperda* varía mucho de acuerdo a las condiciones ambientales y alimentarias (Villa-Castorena y Catalán-Valencia, 2004). Este ciclo de vida se completa aproximadamente en 30 días durante el verano, pero dura más de 60 días en la primavera y el otoño, y de 80 a 90 días durante el invierno (Capinera, 1999). Además de la temperatura, otro factor importante e influyente en la duración del ciclo de vida es la especie hospedera, se ha reportado que la duración del ciclo es de 24 días en cultivos de maíz (*Zea mays*), para el sorgo (*Sorghum spp.*), el frijol terciopelo (*Stizolobium deeringianum*) y la hierba de elefante (*Pennisetum purpureum*) es de 26, 28 y 29 días, respectivamente (Piedra, 1974). Entonces, la palomilla del maíz puede tener hasta 12 generaciones en un solo año, hecho que repercute enormemente cuando el hospedero se trata de un cultivo con importancia agroalimentaria y económica.

*S. frugiperda* se caracteriza por presentar desarrollo holometábolo, se distinguen cuatro etapas de la metamorfosis (Fig. 8); al igual que los demás insectos endopterigotos, las alas se encuentran en el interior del insecto durante las etapas juveniles y se exteriorizan cuando llega a la adultez (Bernays, 1986).

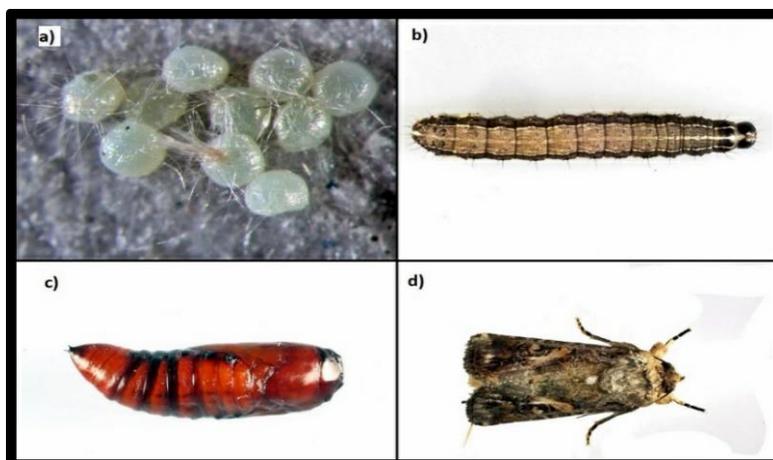


Figura 8. Ciclo de vida de *S. frugiperda*: a) huevecillos con escamas alares, b) gusano cogollero del sexto estadio, c) pupa madura, d) palomilla macho del maíz.

El huevo, es el embrión envuelto por el vitelo y el corión. En el caso de *S. frugiperda*, los huevos son depositados en masas o grupos compactos por la noche, preferentemente en el envés de las hojas, cubiertos por escamas de la hembra. El tiempo de incubación va de los 2 a 10 días. Cada masa puede contener 100 huevos, y por lo general, cada hembra deposita entre 600 y 1500 huevos (fig. 8a) (Meneses-Carbonell, *et al.*, 2001).

La larva puede presentar hasta 6 estadios larvales, en esta etapa el insecto se prepara energéticamente para la metamorfosis (Sosa, 2002). Los gusanos cogolleros suelen emerger más rápidamente y en mayor número a temperaturas superiores a 26. 5°C (Piedra, 1974). En su parte dorsal presenta una faja media longitudinal de color café oscuro y un par de fajas laterales de color más claro, a ambos lados de la anterior, se despliega una sutura epicraneana en forma de “y” invertida (Fig. 9b).

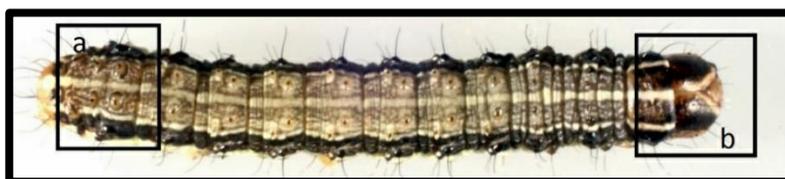


Figura 9. Principales características diagnósticas de la larva de *S. frugiperda*. a) en el antepenúltimo segmento abdominal se observan cuatro puntos negros característicos del gusano cogollero. b) en la cabeza, existe una sutura cefálica amarillenta en forma de “Y” invertida, también diagnóstica de la especie.

La prepupa dura en promedio de 2 días, tiene color café y de forma elíptica (Villa-Castorena y Catalán-Valencia, 2004). La pupa tiene textura lisa y color café oscuro brillante, ver figura 8 c, puede durar entre 12 y 15 días en cultivos de maíz, llega a medir hasta 26 mm. En esta etapa se dan los cambios morfológicos y fisiológicos que darán paso a la conformación del insecto adulto (Piedra, 1974; Villa-Castorena y Catalán-Valencia, 2004). El adulto es una palomilla grisácea oscura, con una extensión alar de los 36 a 40 mm, en la figura 8d se puede observar la palomilla macho. Tanto hembras como machos son de hábitos nocturnos fácilmente atraídos por las luces. La etapa adulta dura de 10 a 12 días. La palomilla hembra oviposita en las hojas de maíz con el menor daño posible ocasionado por los gusanos cogolleros (Alonso, 1991; Villa-Castorena y Catalán-Valencia, 2004; Sosa, 2002).

### **3.2.3. Daños e Importancia.**

La larva de *S. frugiperda* o gusano cogollero es la etapa de desarrollo que causa más daño durante todo el periodo vegetativo de los cultivos hospederos; pero prefiere hojas y brotes tiernos, especialmente los cogollos (Meneses-Carbonell, *et al.*, 2001). Es considerada una de las plagas de los cultivos de arroz y maíz con mayor importancia económica en el sur de EUA, Centro y Sur de América (De Polanía, *et al.*, 2009; Piedra, 1974; Villa-Castorena y Catalán-Valencia, 2004; Meneses-Carbonell, *et al.*, 2001; Sosa, 2002). Sin embargo, se han reportado 186 especies hospederas, entre ellas están el algodón, el sorgo, la soja, el girasol y otras hortalizas (Sosa, 2002; Casmuz, *et al.*, 2010). Para el periodo 2015-2016, México fue el séptimo productor de maíz a nivel mundial con una cosecha cercana a los 25 millones de toneladas de grano en una superficie de 7 millones de hectáreas. El estado de Sinaloa es el principal productor de este grano, con una cosecha mayor a las 3.5 millones de toneladas en una superficie superior a las 470,000 hectáreas; otros estados importantes en la producción son Jalisco, Michoacán, México y Guanajuato (Venegas-García, 2016). El gusano cogollero está presente en más de 3 millones de hectáreas destinadas al cultivo del maíz, lo que representa el 45% del total de la superficie sembrada con este grano (Fernández, 2002).

Durante las etapas del crecimiento vegetativo del maíz, las larvas consumen el tejido meristemático de los brotes tiernos, lo que ocasiona la modificación de la arquitectura

vegetal (Alonso, 1991; Murillo, 1991; Sosa 2002). En los dos primeros estadios, las larvas roen la epidermis de las hojas, dejando manchas translúcidas; también, migran hacia otras plantas para encontrar disponibilidad de superficie, ya que presentan hábitos caníbales. A partir del tercer estadio, consumen toda la lámina foliar dejando huecos irregulares en el follaje y luego migran hacia el cogollo, donde encuentran protección, como se puede ver en la figura 10. No obstante, El mayor consumo, 80 % de la ingesta, lo realizan en los dos últimos estadios. El gusano cogollero puede afectar hasta en 30% el rendimiento del maíz y dependiendo del grado de infestación puede llegar a causar la pérdida total del cultivo, ver figura 10 (Alonso, 1991; Murillo, 1991; Fernández, 2002).

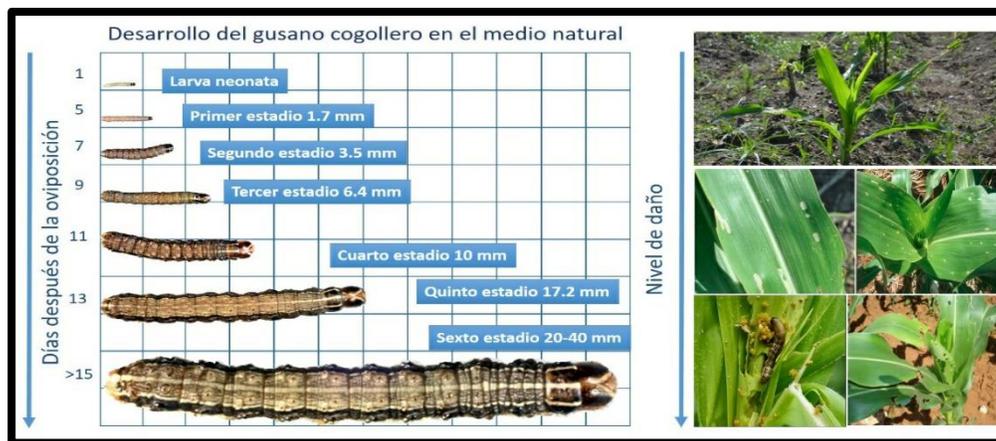


Figura 10. Etapa larval de *S. frugiperda* y daños que provoca en un cultivo de maíz a lo largo de los seis estadios.

### 3.2.4. Ritmos circadianos caracterizados en *Spodoptera frugiperda*.

Los gusanos cogolleros son activos al anochecer y al amanecer atacan a la planta hospedera como cortadores, defoliadores y cogolleros, según en el estadio larval en el que se encuentren (Willink, *et al.*, 1993). En la escotofase, las palomillas vuelan, se reproducen y ovipositan en las hojas del maíz (Alonso, 1991). Hänniger y colaboradores (2017) demostraron la presencia de los genes involucrados en las principales asas moleculares de retroalimentación del reloj circadiano en *S. frugiperda*; también, detectaron que la síntesis de los ARN mensajeros de *per*, *tim* y *cry2* ocurre en la escotofase, como sucede en el reloj molecular de *B. mori* y *D. plexippus*, que presentan actividad nocturna y diurna, respectivamente.

En otro estudio, Miranda-Anaya y colaboradores (2002) caracterizaron el ritmo de actividad locomotora de las larvas y palomillas de *S. frugiperda* en condiciones controladas de fotoperiodo (luz-oscuridad y oscuridad constante), temperatura y humedad relativa. Los gusanos cogolleros alimentados con dieta basada en maíz opaco molido presentaron ritmo circadiano de actividad locomotora típicamente diurno en oscuridad constante. Por otro lado, cinco de veintidós larvas sometidas al fotoperiodo de luz-oscuridad mostraron un ajuste del ritmo circadiano de actividad locomotora a la fotofase; mientras, que en los gusanos cogolleros restantes no se observó una relación de fase clara entre el ritmo circadiano de actividad locomotora y la señal de luz. En el caso de los adultos, tanto las palomillas sometidas a oscuridad constante como al fotoperiodo de luz-oscuridad presentaron un ritmo circadiano nocturno de la actividad locomotora. Así, mediante retrasos de la fotofase (encendido de luces posterior a la hora habitual) lograron observar que persistía la relación de fase entre la luz y la actividad locomotora; es decir, que los animales se sincronizaban a este cambio en el encendido posterior de la luz. Por otra parte, la incorporación a la dieta de la variedad de maíz CML67 tuvo un efecto negativo sobre la expresión del ritmo de actividad locomotora en las larvas y las palomillas de *S. frugiperda*. La reformulación de la dieta con esta variedad de maíz disminuyó el porcentaje y alargó el período de la actividad locomotora de los gusanos cogolleros. En el caso de las palomillas solamente se observó la disminución del porcentaje de la actividad locomotora. La línea de maíz CML67 es una variedad de maíz resistente al ataque de *S. frugiperda*. Los autores proponen que las diferencias observadas en el ritmo circadiano de actividad locomotora entre los animales alimentados con el maíz opaco y la variedad CML67 se deben a la posible desnutrición; ya que posiblemente los flavonoides producidos por esta variedad estén disuadiendo en cierto grado la actividad alimentaria de los gusanos cogolleros (Miranda-Anaya, *et al.*, 2002). Evidentemente, las larvas alimentadas con CML67 expresaron estas deficiencias nutricionales a través de todo el ciclo de vida. Estos antecedentes son la base para la profundización en el estudio de los ritmos circadianos de *S. frugiperda* y podría dilucidar una forma de control de esta plaga.

### 3.3. *Azadirachta indica*: modelo de investigación con acción bioinsecticida y efectos en los ritmos circadianos de los insectos.

#### 3.3.1. El árbol del Nim.

La familia Meliaceae es el grupo de plantas, cuya gran parte son maderables (p. ej. cedro, *Cedrela odorata*; caoba, *Swietenia sp.*; etc.) ampliamente distribuido en los trópicos y subtropicos; con algunos representantes en zonas templadas. Se compone por 52 géneros y 575 especies. Una de estas especies es el Nim, *A. indica* A. Juss. (Varela y Carlos, 2010; Pennington, 2004).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *A. indica* A. Juss (Hashmat, *et al.*, 2012).

<b>Reino</b> Plantae
<b>Subreino</b> Tracheobionta
<b>Superdivisión</b> Spermatophyta
<b>División</b> Magnoliophyta
<b>Clase</b> Magnoliopsida
<b>Subclase</b> Rosidae
<b>Orden</b> Sapindales
<b>Familia</b> Meliaceae
<b>Subfamilia</b> Melioideae
<b>Genero</b> <i>Azadirachta</i> A. Juss. P
<b>Especie</b> <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. 1830

El centro de origen del árbol del Nim se ubica en el sur y sureste de Asia, exactamente entre Birmania y Assam (Hashmat, *et al.* 2012). Se introdujo a otras zonas geográficas debido a la amplia gama de usos, que van desde la fabricación de insecticidas hasta la elaboración de medicamentos naturistas. Actualmente, se distribuye en regiones subáridas y subhúmedas de Australia, India, Centro y Sur de América, África y en diversas Islas del Archipiélago Malayo; regiones que se caracterizan por albergar los bosques tropical caducifolio y subcaducifolio (ver Fig. 11).



Figura 11. Distribución de *Azadirachta indica*, (modificado de thecompositaehut.com, 2016).

En América, el Nim se distribuye específicamente en E.U.A., Honduras, Guatemala, Argentina, Brasil, Bolivia, Ecuador, Cuba, y Jamaica. En México, se introdujo por el Gobierno del estado de Nuevo León y la Universidad Autónoma de Nuevo León entre los años de 1988 a 1990, con fines de reforestación e investigación; otros estados en los que se encuentra son Baja California Sur, Veracruz, San Luis Potosí, Michoacán, Sinaloa, Nayarit, Oaxaca, Yucatán, Tabasco, Guerrero, Morelos, Chiapas, Guanajuato, Tamaulipas y Durango. Los árboles del Nim suelen crecer en zonas en las que prevalecen los climas tropical y subtropical, con el rango de temperatura de 21°C a 32°C y con altitud entre los 700 y 1500m. No obstante, el Nim puede subsistir en ambientes secos con temperatura máxima de 50°C; siendo más intolerante a temperaturas por debajo de 4°C. Por otra parte, el Nim tiene un desarrollo óptimo en suelos profundos, arenosos o arcillosos con un pH entre 6 y 7 (Hashmat *et al.* 2012).

El Nim es una especie arbórea de rápido desarrollo que puede alcanzar hasta los 35 m de altura en condiciones muy favorables (Fig. 12a). El ancho del tronco llega a medir hasta 120 cm, la tonalidad de la corteza va de gris claro a café rojizo. El follaje se caracteriza por presentar hojas pinnatocompuestas (Fig. 12b), cuyo raquis tiene longitud que va de los 20 a los 40 cm y cada foliolo de borde serrado presenta longitud que va desde los 3 a los 8cm; el color del follaje varía a lo largo del desarrollo, de color rojo-púrpura pasa a verde en las etapas de desarrollo superiores. Las flores se agrupan en inflorescencias de 250 individuos que presentan color violáceo claro y un olor característico (Fig. 12d), su período de floración es de abril a mayo. Los frutos de color verde tienen una forma ovalada, similar a una aceituna (Fig. 12c) y un sabor

desagradable (CONABIO 2019; NEEMFOUNDATION 2019). Desde hace más de 400 años, el árbol del Nim ha sido utilizado con fines médicos; ya que las hojas, los frutos, las semillas, las raíces y la corteza de este árbol tienen propiedades antiinflamatorias, antisépticas, antifúngicas, antivirales, diuréticas, analgésicas y antibacteriales (Ogbuewu, *et al.*, 2011).

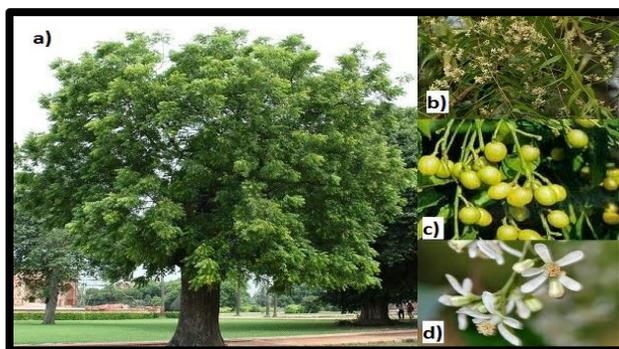


Figura 12. *A. indica*, en el inciso a) árbol del Nim. En el b) el follaje con, c) los frutos maduros y d) las flores (modificado de NEEMFOUNDATION, 2019).

### 3.3.2. Importancia de los metabolitos secundarios producidos por *Azadirachta indica*.

Actualmente, se han identificado más de 300 metabolitos secundarios, que tienen aplicaciones tanto en el sector medicinal como en los sectores económico, agrícola y doméstico. La importancia utilitaria *A. indica* ha sido tan revolucionaria que ha sido denominada como el árbol del siglo XXI (Ogbuewu, *et al.*, 2011). Recientemente, el uso de insecticidas químicos sintéticos ha venido a menos, debido a las consecuencias que dejan tras su empleo en los campos de cultivo, impactando negativamente sobre las especies silvestres, las especies benéficas (entomopatógenas, reguladoras de las poblaciones de insectos plaga) y sobre la calidad del agua y el suelo. Por otra parte, la OMS (1990) data que hasta 1, 000 000 de personas padecen alguna enfermedad y por lo menos unas 220, 000 personas mueren anualmente a causa de que consumir alimentos contaminados con pesticidas o algún otro contacto directo e indirecto. En este contexto, el árbol del Nim y otras plantas, caracterizadas por presentar alta diversidad y concentración de metabolitos secundarios, han adquirido gran relevancia en el desarrollo de plaguicidas naturales muchísimo menos dañinos que los químicos sintéticos producidos industrialmente.

El Nim es considerado la planta con más acción antimicrobiana dentro de un listado de 2,400 plantas y es una de las especies vegetales más documentadas en cuanto a metabolitos secundarios y su acción negativa sobre insectos plaga (Ogbuewu, *et al.*, 2011). Afecta a más de 350 especies de insectos, nemátodos, caracoles, virus, hongos y crustáceos; sumando más de 400 plagas que se ven afectadas por esta planta. Se conocen miles de metabolitos secundarios provenientes, prácticamente, de todas las partes del árbol del Nim; no obstante, aquellos metabolitos con acción biológica se encuentran en mayor concentración en las semillas y hojas (Brahmachari, 2004). Los compuestos de *A. indica* con mayor acción biológica son los terpenoides, conociéndose actualmente más de 100. Sin embargo, los triterpenos limonoides son los mayores efectos tienen sobre el desarrollo y crecimiento de las plagas (Schmutterer, 1990). Este tipo de compuestos provienen del tirucarol, un triterpenoide tetracíclico, que a través de una serie de reacciones de oxidación da origen a compuestos como la azadiractina, azadirona, melantriol, salanina, nimbina, nimbolina, nimbidina, amorastaitina, vepinina, vilasinina y gedunina (Schmutterer, 1990). En la figura 13 se pueden apreciar las estructuras químicas de los metabolitos secundarios con más estudios acerca de acción sobre diversos organismos.

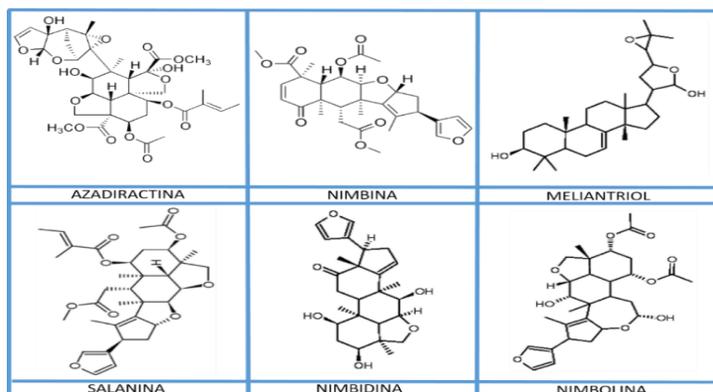


Figura 5. Principales metabolitos secundarios de *A. indica* con acción biológica.

La azadiractina (AZA), es el compuesto que mayor efecto tiene sobre el desarrollo y crecimiento de los insectos. Principalmente, afecta la alimentación, provoca efecto disuasorio al entrar en contacto con quimiorreceptores ubicados en el aparato bucal de los organismos. Por tanto, los individuos se alimentan en menor medida (Mikolajczak y Reed, 1987). De todos los órdenes de insectos, el orden Lepidóptera es el más sensible

a la AZA, ya que las especies pertenecientes a este grupo puede reducir la alimentación hasta un 50%, desde concentraciones que van desde los 0.001 ppm (Senthil-Nathan, 2013). En comparación con órdenes como Coleoptera, Hymenoptera y Hemiptera, los cuales se ven afectados desde concentraciones que van desde los 100 ppm. No obstante, el ortóptero, *Schitocerca gregaria*, también se ve afectado por concentraciones desde los 0.001 ppm, al igual que los lepidópteros. Entre mayores sean las concentraciones a las que se exponen los organismos mayores son los efectos disuasorios en ellos hacia el alimento, los cuales fueron condensados en la tabla 3 (Mordue y Nisbet, 2000; Schmutterer, 1990; Mordue y Nisbet, 2000; Senthil-Nathan, 2013):

Tabla 3. Efectos de AZA sobre los insectos.

<b>Efecto</b>	<b>Objetivo (mecanismos moleculares, células, tejido y/o estructura)</b>	<b>Modo de acción</b>
<b>Antialimentario primario</b>	Parte bucal y otros quimiorreceptores.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estimulación de células disuasorias.</li> <li>- Antagonismo de los quimiorreceptores del gusto.</li> </ul>
<b>Antialimentario secundario</b>	Intestino	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibición de la peristalsis.</li> <li>- Reducción de la producción enzimática.</li> <li>- Inhibición del reemplazamiento de las células muertas.</li> </ul>
<b>Regulación del crecimiento de insectos</b>	Cutícula	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alteraciones en los niveles del ecdisona y de la hormona juvenil, debido a disrupciones en los niveles de los neurotransmisores que median la muda.</li> </ul>
<b>Esterilidad</b>	Órganos reproductivos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alteraciones en los niveles de ecdisona y la hormona juvenil que conducen a la reducción en el número de huevos viables y de la progenie viva.</li> </ul>
<b>Procesos celulares</b>	Músculos Maquinaria sintética celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obstrucción de la división celular.</li> <li>- Pérdida de tono muscular.</li> <li>- Bloqueo de la producción enzimática digestiva en el intestino.</li> <li>- Inhibición de la síntesis de proteínas en varios tejidos.</li> </ul>

### **3.3.3. Efectos de los metabolitos secundarios de *A. indica* sobre el desarrollo y crecimiento de *S. frugiperda*.**

La resistencia de *S. frugiperda* a diversos insecticidas sintéticos, incluyendo a la toxina *Bt* del hongo *Bacillus thuringiensis* presente en cultivos transgénicos, ha provocado la búsqueda de alternativas para su control (De Polanía, *et al.*, 2009; Huang, *et al.*, 2014; Nascimento, *et al.*, 2016; Santos-Amaya, *et al.*, 2017). La amplia diversidad química de las plantas representa una interesante materia prima para la elaboración de insecticidas más eficientes en el control de este insecto y demás fitófagos (Ayil-Gutiérrez, *et al.* 2018). Por otro lado, el posible diseño de bioinsecticidas a partir de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de plantas, como *A. indica*, puede subsanar y disminuir el daño que provocan los insecticidas sintéticos a los sistemas agroecológicos. Actualmente, se han realizado diversos ensayos biológicos de diferentes extractos del árbol del Nim que han demostrado efectos ovicidas, espermatocidas, inhibitorios del desarrollo y crecimiento, antialimentario y disrupción hormonal sobre *S. frugiperda*.

Gutiérrez-García y colaboradores (2010) realizaron un bioensayo, en el cual, a dos variedades de maíz, una resistente (CML-67) y una menos resistente (CML-131), les rociaron soluciones con tres concentraciones de aceite de Nim (NEEM OIL EXTRACT), con la finalidad de medir el impacto producido por el gusano cogollero sobre las plantas de maíz. Ellos observaron que las plantas rociadas con la solución del 20.8% presentaron menor daño que las que fueron rociadas con las otras soluciones, sobre todo a las plantas de la variedad CML-67. También, notaron que el desarrollo de las dos variedades de maíz fue mayor con la aplicación del aceite del Nim, adelantándose la etapa de floración de manera más abrupta en las plantas que fueron rociadas con la solución del 20.8%. También, el desarrollo de las plantas fue mayor al agregar la solución cuando la población de larvas apenas sobrepasaba el 2% de ocupación de las plantas de maíz. Este estudio proporciona panorama indirecto sobre el efecto negativo del Nim sobre el desarrollo del gusano cogollero, pero no distingue exactamente el tipo de efecto.

En otro estudio, Maredia y colaboradores (1992) evaluaron el efecto del Nim sobre el desarrollo y crecimiento de los lepidópteros *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Diatraea*

*saccharalis* (barrenador del tallo del maíz), *D. grandiosella* (barrenador del tallo del maíz del suroeste), *S. frugiperda* (gusano cogollero); y los coleopteros, *Sitophilus zeamais* (gorgojo del maíz) y *Prostephanus truncatus* (barrenador mayor de los granos de maíz). Estos insectos son las principales plagas del maíz, cada una de ellas ataca a las plantas a lo largo del ciclo de vida; incluso, las infestaciones de estos insectos suelen darse en el almacenamiento de los granos y mazorcas de *Z. mays*. En el caso de los lepidópteros, el bioensayo consistió en la incorporación de distintas concentraciones, 1 mL de extracto o aceite metanólico, 5 y 10 g de polvo de la semilla de *A. indica* por kilogramo de dieta merídica utilizada en el CIMMYT. Para los coleópteros aplicaron 5 y 10 mL de extracto de *A. indica* por kilogramo de grano de maíz no infestado. En general, los resultados demostraron que hubo mayor mortandad en los lepidópteros, principalmente las larvas de *H. zea* y *S. frugiperda*; hubo 100% de mortandad de los gusanos eloteros alimentados con las tres concentraciones de *A. indica*, y, 70% (aceite) y 100 % (polvo) de mortandad de los gusanos cogolleros después de los 10 días. Mientras que los coleópteros presentaron mayor número de sobrevivientes, aun cuando las concentraciones del aceite de *A. indica* fueron mayores que las aplicadas a la dieta de las larvas de Lepidóptera. Además, este estudio demostró que las larvas sobrevivientes de los lepidópteros tuvieron menor peso y alargamiento de la fase larval cuando fueron alimentadas con la dieta con el aceite de la semilla del Nim. Por lo tanto, corroboraron que los metabolitos secundarios de la semilla de *A. indica* tienen efecto antialimentario sobre larvas de estas seis especies plagas del maíz.

En otro trabajo de investigación, Trujillo y colaboradores (2008) observaron que los extractos etanólicos provenientes de suspensiones celulares de callos de *A. indica* tuvieron efecto negativo sobre el porcentaje de sobrevivencia de los gusanos cogolleros alimentados con discos de hojas de maíz. Este efecto fue dependiente de la concentración, expresando el 76% de mortandad con concentración de 2,5000 ppm (la más baja) a las 25 horas después de la aplicación y el 100% de mortandad con concentración de 30,000 ppm (la más alta) a las 18 horas después de la aplicación. Los autores proponen que el tipo de efecto depende de la concentración utilizada de los extractos de *A. indica*: con la aplicación de concentraciones menores se observan

efectos sobre la digestión y movimientos musculares; y conforme aumenta la concentración se observan conductas alimentarias (disuasión e inanición), hasta que causan efecto neurotóxico mayor que impide la liberación de las hormonas de crecimiento (la ecdisona y la HJ).

La bibliografía consultada demuestra los efectos negativos de los metabolitos secundarios de *A. indica*, principalmente de AZA, sobre el crecimiento y el desarrollo de *S. frugiperda*. Estos trabajos de investigación nos permiten analizar y observar que la acción de AZA es sistémica y sinérgica, sin importar la manera en la que se aplique. No obstante, estas investigaciones describen solamente los efectos visibles y conductuales. No existen trabajos de investigación que aborden directamente los efectos de los metabolitos secundarios del Nim sobre el sistema neuroendocrino de los ritmos biológicos de *S. frugiperda*. La profundización en el estudio de la neurofisiología de este organismo y la interacción con los metabolitos secundarios de *A. indica* permitiría la identificación del modo específico de acción de estas sustancias sobre el sistema circadiano del gusano cogollero.

#### **3.3.4. Influencia de los metabolitos secundarios de *A. indica* sobre los ritmos circadianos de insectos.**

La comunicación entre los componentes del sistema circadiano permite que se expresen los ritmos biológicos pertinentes para la sobrevivencia de los insectos, como de cualquier otro ser vivo. La base de esta comunicación son las vías de señalización y las asas de retroalimentación positiva y negativa que están mediadas por los neurotransmisores, los neuropéptidos y las hormonas. La inclusión de algún factor externo, dependiendo de la naturaleza, puede influir positiva o negativamente sobre el funcionamiento del sistema circadiano. Existen algunos trabajos que abordan las consecuencias de la inyección de AZA en el ritmo circadiano de actividad locomotora de los insectos.

La inyección de diferentes concentraciones de AZA provocó la abolición del ritmo de actividad locomotora en la mosca (*Musca domestica*) y la cucaracha (*Leucophaea maderae*) (Han y Engelmann, 1987; Smietanko y Engelmann 1989). Los experimentos fueron muy similares en los dos estudios. En el caso de las cucarachas, los actogramas

resultantes mostraron que el 88% de las cucarachas presentan reducción en el periodo del ritmo de actividad locomotora, mientras que la solución de etanol no presentó ningún efecto sobre el periodo de los blatodeos tratados. Entre 7 y 10 días después las inyecciones de AZA provocaron arritmia en el 40% de las cucarachas, según la dosis empleada días después mostraron el típico patrón del ritmo circadiano. Han y Englemann (1987) proponen que la azadiractina influye en la comunicación entre los LOPS, los relojes circadianos de insectos hemimetábolos, lo que provoca la abolición de ritmo de actividad locomotora.

El estudio en *M. domestica* es una continuación de la línea de investigación realizada por Han y Engelmann (1987) en *L. maderae*. En este estudio utilizaron 171 moscas que fueron inyectadas con 1µl de la solución una solución de etanol al 20% con 0.05 mg/g de insecto; el grupo control consistió en 60 moscas inyectadas solamente la solución de etanol al 20%. La inyección de la AZA provocó la muerte del 50% de las moscas tratadas, del grupo control se murió el 25% de animales. La solución con AZA aumentó el periodo del ritmo de actividad locomotora en el 83% de las cucarachas; mientras que la solución de etanol provocó solamente un aumento del periodo de dicho ritmo en el 22%. Después de 5 días de la inyección, el 46% de las moscas presentaron arritmia en la actividad locomotora. Por lo tanto, al igual que las cucarachas, la abolición de los ritmos en las moscas posiblemente está provocada por el debilitamiento en el acoplamiento de los marcapasos circadianos y los osciladores periféricos; *M. domestica* es una especie holometábola, por lo cual el efecto negativo estaría implicado en la comunicación entre los XL, los osciladores circadianos de los dípteros.

### **3.3.5. Efectos de los metabolitos producidos por *A. indica* sobre la biosíntesis de serotonina.**

Pese a la importancia de la 5HT como uno de los principales neuromoduladores del sistema circadiano en insectos solamente existe un trabajo acerca del efecto que tiene AZA sobre la concentración de esta monoamina. Banerjee y Rembold (1992) observaron que cuando la AZA es inyectada en el abdomen de ninfas y adultos de *Locusta migratoria* y *S. gregaria* se distribuye en todo el cuerpo, pero exhibe mayor concentración en el GCE, la CC y el SOG. También, observaron que la inyección de AZA provocó el aumento de 5HT en estas estructuras, sin importar la dosis (1.8 y 2.4 µg/g de insecto en ninfas; 2.5, 3 y 4 µg/g de insecto en adultos) o el sexo de los animales. La retención de 5HT en estas estructuras podría estar influyendo negativamente en todas las vías de señalización neuronales y hormonales que están siendo mediadas por esta monoamina, incluyendo la síntesis y liberación de la ecdisona, la HJ y la PTTH.

#### 4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica, modificaciones en el fotoperíodo, la ablación de estructuras, la aplicación de 5HT exógena, agonistas y antagonistas de esta monoamina, se ha identificado que la serotonina está presente prácticamente en todas las regiones del sistema nervioso de los insectos (Nässel, 1988; Granger, *et al.* 1989; Nässel y Elekes, 1984; Homberg y Hildebrand, 1989; Blenau y Thamm, 2011; Vleugels, *et al.* 2015; Shimada y Niwa, 2014; Nässel, *et al.* 1988). La 5HT es una de las moléculas mensajeras más importantes en las vías de señalización y regulatorias del sistema circadiano de estos artrópodos: está implicada en la sincronización del reloj circadiano a la luz, actúa como mensajera entre los osciladores e influye en los procesos de locomoción y alimentación (masticación, deglución, digestión, búsqueda de alimento, reproducción, etc.) (Blenau y Thamm, 2001; Wu y Cooper, 2012; Yuan, *et al.* 2005; Yuan *et al.* 2006; Nishinobuki y Tomioka, 2000; Matsui, *et al.* 2009; Gatellier, *et al.*, 2004; Schoofs, *et al.* 2018). Además, en diversas especies de insectos se ha identificado que la biosíntesis de la 5HT se ajusta al periodo del ritmo circadiano (Fowler *et al.*, 1972; Muszynska y Cymborowski, 1978); la expresión de este ritmo consecuentemente afecta el ritmo de actividad locomotriz, lo que evidencia que también existe el posible efecto sobre las demás funciones reguladas por esta monoamina (Xiong *et al.*, 2019; Yuan, *et al.* 2006).

Como ya se mencionó anteriormente, *S. frugiperda* es una especie que tiene importancia agroecológica y socioeconómica, que se caracteriza por ser muy resistente a diversos medios de control: virus, entomopatógenos, pesticidas sintéticos, organismos genéticamente modificados, etc. (De Polanía, *et al.*, 2009; Huang, *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2016; Santos-Amaya, *et al.*, 2017). Hay muy pocos estudios cronobiológicos del gusano cogollero (Hänniger, *et al.*, 2017; Miranda-Anaya, *et al.*, 2002). En otras especies de insectos, la realización de este tipo de investigaciones ha ayudado a dilucidar diversos mecanismos y variables biológicas que han contribuido a la ampliación del conocimiento sobre la conducta, el aprendizaje y la memoria, o bien a la conservación (Reppert, *et al.*, 2010; Blenau y Thamm, 2001; Zordan y Sandrelli, 2015). En el caso de *S. frugiperda* caracterizar el ritmo de 5HT en el GCE y el tubo digestivo

(TD) de *S. frugiperda* podría ser el inicio de un campo de investigación que permita conocer la fisiología circadiana de este organismo; y, por ende, ampliar el conocimiento para el desarrollo de técnicas innovadoras para su control.

Por otro lado, las semillas del árbol del Nim son utilizadas como materia prima para la elaboración de biopesticidas. Incluso, se observado que extractos provenientes de *A. indica* tienen un efecto negativo sobre la alimentación, el desarrollo y el crecimiento del gusano cogollero (Gutiérrez-García, *et al.*, 2010; Maredia, *et al.*, 1992; Trujillo, *et al.*, 2008). No obstante, no se han realizado trabajos que caractericen y diluciden los efectos a nivel fisiológico y neuroendocrino. Existen trabajos previos de los efectos de AZA sobre el ritmo de actividad locomotora y la biosíntesis de serotonina de insectos (Han y Engelmann, 1987; Smietanko y Engelmann 1989; Banerjee y Rembold, 1992). Por todo lo anterior, en este trabajo se pretende evaluar la repercusión de los metabolitos secundarios provenientes de la semilla de *A. indica* sobre el posible ritmo circadiano de 5HT en el GCE y el TD del gusano cogollero. Los resultados obtenidos en este trabajo podrían respaldar y coadyuvar la idea de ampliar e incluir a las investigaciones cronobiológicas de *S. frugiperda* y otros insectos fitófagos en el proceso de la elaboración y la caracterización de medidas de control y retención de las comunidades y poblaciones de estos insectos dentro de los sistemas agroecológicos.

## **5. HIPOTESIS.**

Si los gusanos cogolleros alimentados con dieta merídica control posiblemente expresen un ritmo circadiano de serotonina en el ganglio cerebroide y el tubo digestivo; entonces, la adición del extracto metanólico de la semilla de *A. indica* a la dieta merídica alterará la expresión del posible ritmo de 5HT en dichas estructuras de la larva de *S. frugiperda*.

## **6. OBJETIVOS.**

### **6.1. GENERALES.**

- a) Determinar la presencia de un ritmo circadiano de 5HT en el GCE y en el TD de la larva de *S. frugiperda*.
- b) Evaluar los efectos del extracto químico de las semillas de *A. indica* sobre el ritmo de 5HT en el GCE y el TD de la larva de *S. frugiperda*.

### **6.2. PARTICULARES.**

- a) Determinar las concentraciones de 5HT en el GCE y en el TD de las larvas alimentadas con DMC y las alimentadas con dieta merídica adicionada con un extracto químico de la semilla de *A. indica* o experimental.
- b) Determinar la presencia de un ritmo circadiano de 5HT del GCE y en el TD de las larvas alimentadas con DMC y las alimentadas con DME.

## 7. MÉTODO.

### 7.1. Modelo experimental

Huevecillos de *S. frugiperda* fueron obtenidos del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Posteriormente, en el taller de Química de la Facultad de Ciencias, UNAM, después de la eclosión, las larvas neonatas se trasladaron a vasos de plástico tapados (10 mL) (ver figura 14) y se mantuvieron en una cámara de incubación a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa superior al 60%, fotoperiodo de Luz-Oscuridad (LO) 12:12 (encendido de luces: 6:00 h), la alimentación fue *ad libitum*, con 5g de DMC (Chacón, *et al.*, 2009; Mihm, 1983; Maredia, *et al.* 1992). Estos organismos sirvieron como pie de cría, ya que la reproducción de los adultos dio pauta al establecimiento de la colonia, y las dos generaciones posteriores sirvieron para observar la duración de las etapas de desarrollo.

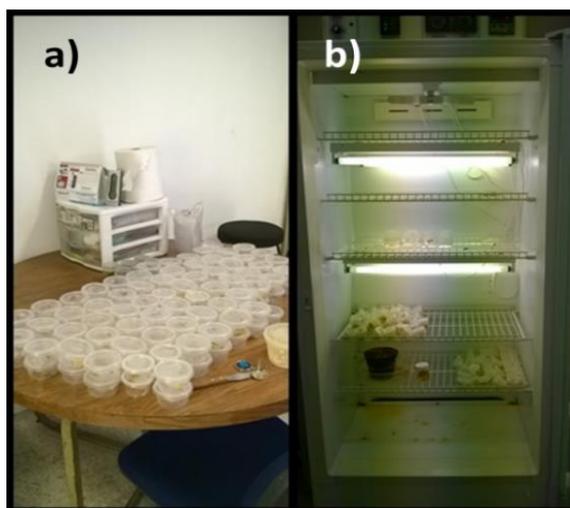


Figura 14. Colonia de *S. frugiperda*. a) larvas neonatas en vasos de plástico transparente con tapas agujeradas (5 orificios); b) cámara de incubación.

Para preparar la DMC, en un recipiente se disolvieron 15.7g de agar en 500mL de agua destilada caliente, y con una espátula se mezcló rápidamente para evitar la formación de grumos. La disolución se llevó a ebullición y se enfrió con 500mL de agua destilada fría. Posteriormente, se mezcló con una licuadora doméstica y se incorporaron 71.1g de harina de soya, 31.7g de germen de trigo, 13g de sacarosa, 10.6g de sales de Wesson, 1.1g de ácido sórbico, 4.3g de ácido ascórbico, 12mL de ácido acético al 25%, 4.4mL de

formalina al 10%, 7.3mL de cloruro de colina al 15%, 1.6g de Metil Paraben. A la mezcla fría se añadieron 3.5mL de solución vitamínica para insectos, licuándose de nuevo. Después la dieta se transfirió a recipientes cerrados y se mantuvo en refrigeración para su posterior uso.

## 7.2. Diseño experimental.

A partir de la tercera generación de la colonia se consideraron dos lotes de larvas de *S. frugiperda* para cumplir el objetivo de este trabajo:

a) Grupo control: 144 larvas alimentadas con DMC.

b) Grupo experimental: 144 larvas alimentadas con DME. Se preparó la dieta merídica normal, como se describió anteriormente, y se añadió 1mg por 1kg para obtener la concentración de 1ppm/Kg de dieta.

Los lotes fueron sometidos a las condiciones antes mencionadas, pero a dos condiciones distintas de iluminación (tabla 4): 72 organismos de cada grupo a un fotoperiodo de LO 12:12 durante toda la etapa larval y los otros 72 individuos restantes de cada grupo a fotoperiodo de LO 12:12 hasta el cuarto estadio (entre el onceavo y doceavo día desde la eclosión de los huevecillos) más 72 horas de oscuridad constante (OO). Esta división se hizo para ver la persistencia del ritmo de 5HT en OO. Para las dos condiciones de iluminación, el encendido de las luces fue a las 6:00.

Tabla 4. Diseño experimental.

Condiciones de Luz - Oscuridad \ Grupo	Control (dieta artificial normal).	Experimental (dieta artificial + 1ppm de extracto químico de <i>A. indica</i> ).
LO 12:12	LO control (n= 72 larvas).	LO experimental (n= 72 larvas).
LO 12:12 + 72 horas de OO	OO control (n= 72 larvas).	OO experimental (n= 72 larvas).

### 7.3. Preparación de las muestras

La obtención de las muestras se realizó en un cuarto oscuro iluminado con luz roja, debido a que la 5HT es fotosensible. Los animales de los grupos control y experimental bajo LO se anestesiaron 5 minutos en frío. Después, en un microscopio estereoscópico (Olympus SZ514S), se hizo un corte en la mitad del primer segmento torácico de las larvas y se extrajeron los GCE y los TD a diferentes ZT (tiempo del sincronizador): ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT 16 y ZT 20. Los organismos de los grupos control y experimental bajo OO también se anestesiaron 5 minutos en frío y fueron diseccionados de la forma antes descrita a diferentes CT (tiempo circadiano): CT0, CT4, CT8, CT12, CT16, CT20. Se sacrificaron 12 larvas cada ZT y CT para cada grupo.

Posteriormente, cuatro GCE y cuatro TD (por separado) fueron puestos en 350µL de buffer de extracción (100µM EDTA, 0.1M ácido perclórico; Cohen, *et al.* 1988) dentro de un tubo eppendorf 1.5mL. Después, el contenido de los tubos fue homogeneizado manualmente con un homogeneizador de plástico y centrifugado en una microcentrífuga refrigerada (LABNET) durante 30 min a 13500 x g a 4°C, y los sobrenadantes se centrifugaron por segunda vez durante 10 min a 10000 X g a 4°C. Posteriormente, los botones obtenidos se desecharon y los sobrenadantes se pasaron por filtros con un poro de 0.2µm; después, se transfirieron a tubos eppendorf ámbar y mantuvieron a -70°C en un ultracongelador (REVCO).

#### 7.4. HPLC

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) es la técnica de análisis químico que se utiliza para separar una muestra en sus diversos componentes o analitos. Se basa en el principio de la elución: un solvente, denominado fase móvil, circula de forma constante en íntimo contacto con la fase estacionaria, un sólido inmisible; al introducir la muestra en la corriente de la fase móvil, cada analito avanzará a lo largo de la fase estacionaria con velocidad diferente (tiempo de retención, Tr) dependiendo de la afinidad de éstos con cada una de las fases. Entonces, al terminar el recorrido de la muestra por la columna, la mezcla estará separada y cada analito tendrá Tr específico. Bajo este principio, se cuantificó la 5HT de las muestras del GCE y el TD de las larvas de *S. frugiperda* alimentadas con la dieta control y experimental, empleando una curva de calibración de 5HT.

El sistema de cromatografía, para este estudio, consistió en un inyector refrigerante automático Varian 410 con asa de inyección de 100µl a una temperatura de 4°C; que inyectaba 40µL; 20µL pasaban a la columna analítica, los microlitros restantes se quedaban en el sistema de inyección. La columna analítica o fase estacionaria Supelcosil LC18 de 100 x 4.6mm con partículas de 5µm fue conectada al inyector y a la bomba, y se puso dentro de un horno Varian a temperatura de 26°C. El flujo de la fase móvil se mantuvo constante a través del sistema con una bomba Varian 9012 a una tasa de 0.8ml por minuto. La fase móvil se modificó de Lesniak y colaboradores (2013) y consistió de 90% de agua filtrada (MilliQ) y 10% de acetonitrilo (ACN); después a esta solución, lentamente, se añadió ácido trifluoracético al 0.1% y se ajustó el pH a 2.68. La separación de la muestra en sus diversos componentes o analitos se observó a través de cromatogramas. Los cuales fueron obtenidos con el software Varian Worstation en una PC conectada a un detector ultravioleta Varian 9050 (longitud de onda: 280nm, tiempo de corrida por inyección de muestra: 10 minutos).

## **7.5. Identificación y Curva de calibración de la 5HT.**

Para identificar el pico de la 5HT, se preparó la solución stock de 5HT estándar (Sigma Aldrich) a la concentración de 1mg/mL. Posteriormente, a partir de esta disolución se prepararon 4 diluciones seriadas (factor de dilución= 0.1) con rango de concentración de 100 – 1ug/mL. Después, a partir de la dilución de 1µg/mL se prepararon diluciones seriadas con los antilogaritmos de 2.75, 2.5, 2.25 y 2; quedaron diluciones de 562, 316, 178 y 100 ng/mL. Para obtener la curva de calibración de este experimento se utilizaron las diluciones de 100ng, 316 y 1000ng/µL. Consecutivamente, se hicieron inyecciones de prueba para observar el tiempo en que eluía la 5HT estándar, los picos de la monoamina estudiada salieron en el mismo Tr para las diluciones estándar.

Las muestras de los grupos control (LO y OO) y experimental (LO y OO) se analizaron por sesiones con el cromatógrafo. Como se mencionó anteriormente, son muchas las variables que influyen en las lecturas del HPLC, así que antes de cada inyección de las muestras se inyectaron las diluciones de la curva de calibración. Debido a dificultades técnicas el grupo OO control se analizó en dos sesiones.

## **7.6. Análisis estadístico**

### **7.6.1. Análisis de Varianza de una vía (ANOVA)**

Por otra parte, se aplicó a los datos una ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* de Tukey para corroborar la significancia de las diferencias entre los distintos puntos muestreados y ver las diferencias en concentración de los distintos grupos (programa XSLAT, Addinsoft, Belmont, MA). El ANOVA es una prueba estadística que compara los promedios de las fases y evalúa si las diferencias entre ellos son significativamente mayores que la variación inherente de los datos. Con la detección de diferencias significativas se puede asumir que la variable medida puede presentar un ritmo (Vega, 1993).

### **7.6.2. Cosinor**

Posteriormente los resultados obtenidos por HPLC fueron analizados mediante el método matemático Cosinor utilizando el programa COSANA (Benedict Silva. GMDRB, Departamento de Fisiología y Biofísica. ICB/UPS, Brasil) para determinar la presencia de ritmos de la 5HT en el GCE y el TD de la larva de *S. frugiperda*. Cosinor es un método de análisis que por medio del ajuste de mínimos cuadrados la función cosenoidal ideal de un ritmo biológico al obtener el intervalo de confianza de sus principales parámetros como son el mesor, la amplitud, el periodo y la acrofase. El análisis estadístico de Cosinor permite realizar pruebas objetivas bajo la hipótesis de que la amplitud del ritmo difiere de cero al utilizar diferentes longitudes de periodos (Vega, 1993; Cornelissen, 2014). Se probaron distintos periodos para analizar si los ritmos observados tanto en el TD como en el GCE efectivamente eran circadianos.

### **7.6.3. Cronogramas.**

A partir de los resultados obtenidos de las curvas de calibración se construyeron cronogramas; se representaron los promedios  $\pm$  el error estándar (e.e) de las concentraciones de 5HT a lo largo de los seis puntos temporales muestreados para las dos condiciones fotoperiódicas de los grupos control y experimental. Los resultados están expresados como micromoles de 5HT por microlito ( $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ), porque algunas mediciones resultaron muy altas en nanogramos; por lo que, para facilitar la comparación, la interpretación y la construcción de las gráficas se transformaron los datos de nanogramos a micromoles de 5HT. A continuación, en las siguientes secciones se describen cada uno de los cronogramas obtenidos y se detallan los ritmos presentes en el GCE y el TD del gusano cogollero.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Identificación de la 5HT en el ganglio cerebroide y el tubo digestivo de la larva de *S. frugiperda*

Se identificó la presencia de 5HT en el GCE y el TD del gusano cogollero mediante HPLC. Las muestras se analizaron en distintas sesiones por lo que al inicio de cada sesión se realizaron y se prepararon las diluciones de las curvas de calibración de 5HT estándar (Sigma Aldrich); dichas curvas se condensan en la figura 15: la figura 15a es del grupo OO control (segunda sesión), la figura 15d es del grupo LO experimental y la figura 15e es la del grupo OO experimental. Los valores del coeficiente de correlación (15a,  $R^2= 0.999921$ ; 15b,  $R^2= 0.999432$ ; 15c,  $R^2= 0.999640$ ; 15d,  $R^2= 0.999127$ ; 15e,  $R^2= 0.999375$ ) indican que presentan un comportamiento lineal en el rango de concentraciones 100ng, 316 y 1000ng/ $\mu$ L de 5HT estándar. Con los valores obtenidos de la ecuación de la recta y la concentración conocida de la 5HT estándar se obtuvieron los valores reales de la concentración de serotonina en los GCE y los TD de los grupos control y experimental. Además de que se corroboraron las concentraciones de la curva de calibración de 5HT estándar; también, se observó que la serotonina eluyó en diferentes tiempos de retención para cada sesión de trabajo (tabla 5).

Tabla 5. Tiempos de retención de 5HT para los grupos control y experimental.

Grupo	Tiempo de retención (Tr; minutos)
LO control	4.5
LO experimental	7.0
OO control (primera sesión)	5.9
(segunda sesión)	3.5
OO experimental	4.5

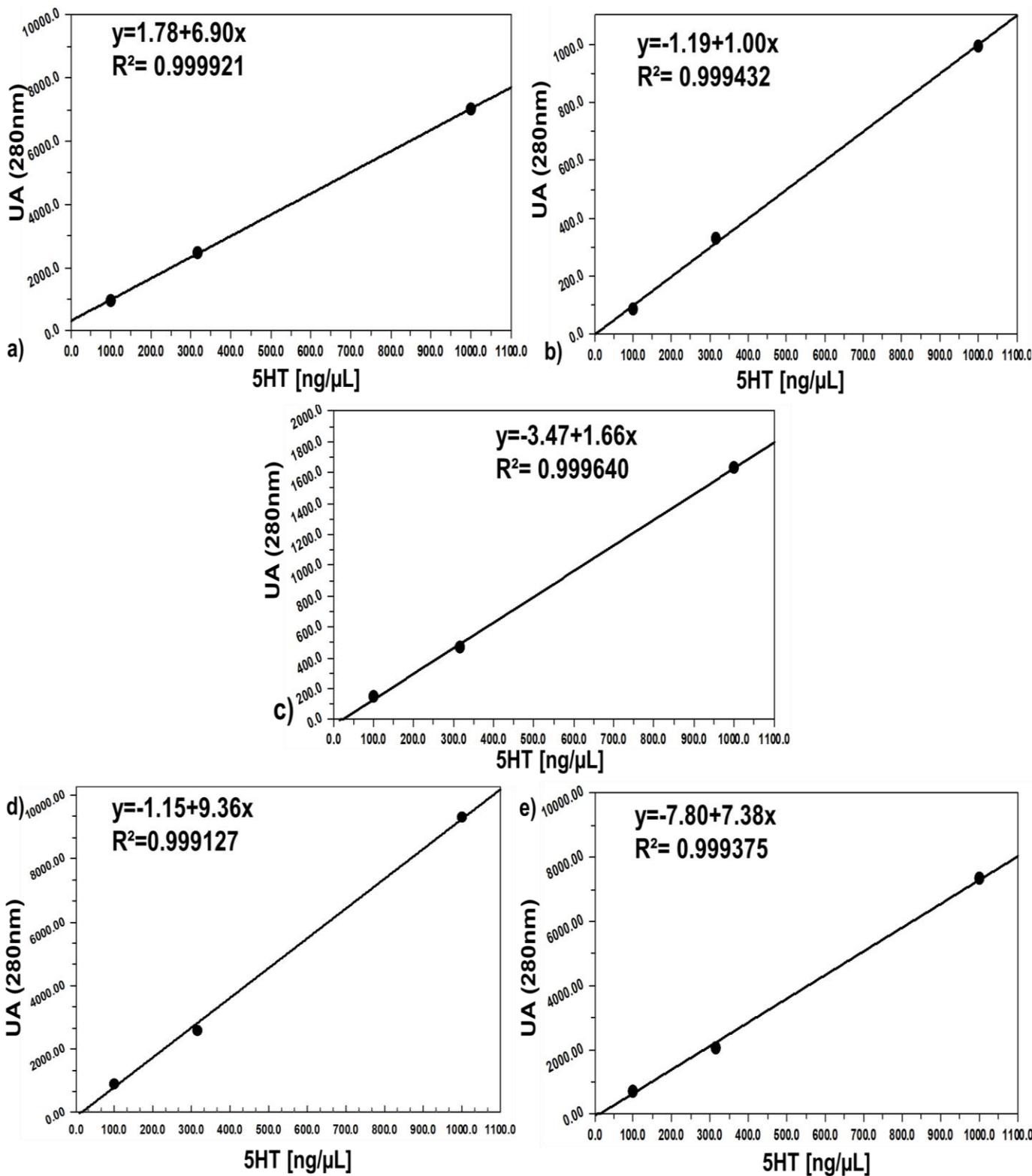


Figura 15. Curvas de calibración de 5HT estándar de los grupos: a) LO control; b) OO control (primera sesión); c) OO control (segunda sesión); d) LO experimental; e) OO experimental. En cada curva se muestra la ecuación de la recta ( $y=mx+b$ ) y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). La línea negra representa el ajuste de los datos (puntos negros) a la recta. La lectura se realizó a 280nm.

## 8.2. Cambios rítmicos de la concentración de 5HT en el ganglio cerebroide de la larva de *S. frugiperda*

### 8.2.1. Condición de LO

En el GCE de los gusanos cogolleros del grupo control se encontró una variación en la concentración de 5HT bajo la condición de LO (Fig. 16a). La concentración más alta [ $14.68 \pm 10.14 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] se presentó en ZT8, durante la fotofase (4 horas antes del apagado de las luces); mientras que la concentración más baja [ $0.81 \pm 0.60 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] se encontró en ZT20, durante la escotofase (4 horas antes del encendido de las luces). También, durante la fase de oscuridad, en ZT16 se presentó otro aumento en la concentración de 5HT [ $7.52 \pm 4.68 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ], 4 horas después del apagado de las luces. No obstante, con el análisis de ANOVA con el ajuste de Tukey no mostró diferencias significativas ( $p > 0.601$ ) entre las fases y con el análisis de Cosinor esta oscilación de la concentración de 5HT no se ajustó significativamente ( $p > 0.318$ ) a algún periodo circadiano o ultradiano; por lo que, no se puede aseverar que esta oscilación sea un ritmo diario bimodal en la concentración de 5HT.

El GCE de los gusanos cogolleros de grupo experimental exhibió una oscilación de la concentración de 5HT bajo la condición de LO (ver Fig. 16b). La concentración más alta de esta monoamina [ $271.45 \pm 70.90 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] se encontró en ZT0, en la fotofase (exactamente en el encendido de las luces); por otro lado, la concentración más baja [ $14.46 \pm 8.25 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] se presentó en ZT8 durante la fotofase, 4 horas antes del apagado de las luces. El análisis de ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre las fases ( $p < 0.007$ ) y la prueba *post-hoc* de Tukey arrojó que estas diferencias se presentaban entre ZT0 y las demás fases (ver tabla 6). Mientras que el análisis de Cosinor demostró que la oscilación de este grupo se ajustó significativamente ( $p < 0.031$ ) a un periodo de 24 horas; por lo tanto, se puede considerar que la oscilación presentada en esta condición se ajusta a un ritmo diario de la concentración de 5HT. Los valores arrojados de los parámetros del ritmo son los siguientes: mesor  $86.15 \pm 8 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , amplitud  $87.39 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$  y el porcentaje del ritmo de 37.04%.

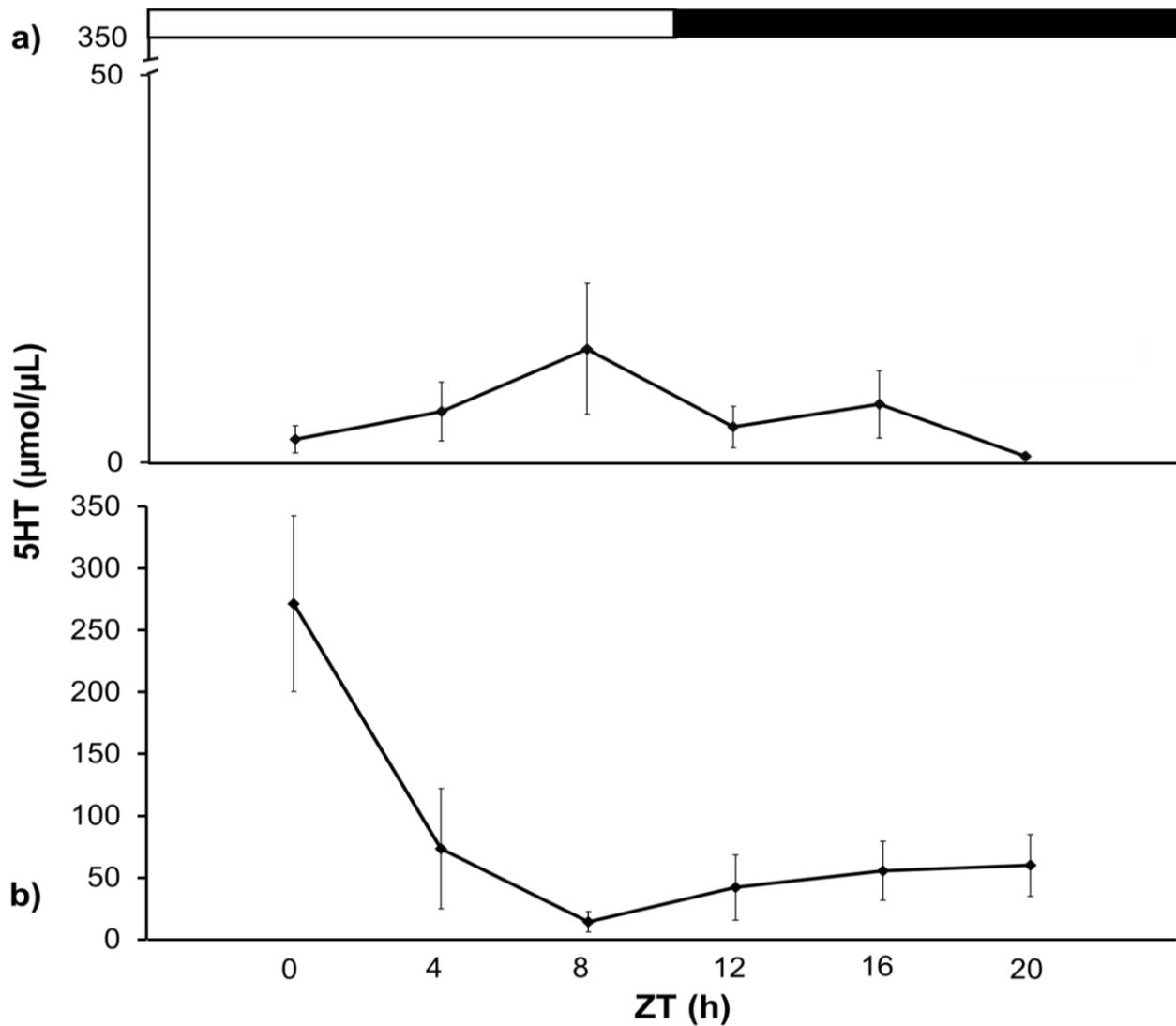


Figura 16. Cronogramas de la concentración de 5HT en el GCE de los grupos control y experimental bajo LO 12:12 (la barra superior expresa la condición de iluminación, la sección blanca indica la fotofase y la negra la escotofase). a) Oscilación del grupo control. b) Ritmo diario del grupo experimental. Los datos mostrados son el promedio  $\pm$  e.e (n=12 por cada ZT para los dos grupos).

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos con análisis de ANOVA de una vía con el ajuste de Tukey de las diferencias entre las fases de la concentración de 5HT de los gusanos cogolleros alimentados con la DMC y los alimentados con la DME sometidos a la condición LO.

Tabla 6. ANOVA de una vía de la concentración de 5HT en el GCE de la larva de *S. frugiperda*. El asterisco indica resultados significativos ( $p < 0.05$ ).

5HT	F	Sig.	Prueba <i>Post hoc</i> Tukey
LO 12:12 Control	0.752	<b>0.601</b>	-----
LO 12:12 Experimental	5.556	<b>0.007*</b>	ZT0 vs. ZT8 ( <b>P=0.006</b> )*; ZT0 vs. ZT12 ( <b>P=0.014</b> )* ZT0 vs. ZT16 ( <b>P=0.021</b> )*; ZT0 vs. ZT20 ( <b>P=0.024</b> )* ZT0 vs. ZT04 ( <b>P=0.036</b> )*

En la Tabla 7 se detallan los resultados obtenidos con el análisis de Cosinor de las oscilaciones de la concentración de 5HT en el GCE de los gusanos cogolleros de los grupos control y experimental bajo la condición de LO.

Tabla 7. Ajuste de Cosinor para la concentración de 5HT en el GCE de la larva de *S. frugiperda*. El asterisco indica resultados significativos ( $p < 0.05$ ).

5HT	Periodo (h)	Mesor [ $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ]	Amplitud [ $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ]	Acrofase (h)	PR (%)	P
LO 12:12 Control	24	6.20	4.78	8.35	14.17	>0.318
LO 12:12 Experimental	24	86.15	87.39	23.39	37.04	<b>0.031*</b>

PR porcentaje del ritmo

### 8.2.2. Condición de OO

En la figura 17 se muestran las oscilaciones de la concentración de 5HT en el GCE de los gusanos cogolleros de los grupos control y experimental bajo la condición de oscuridad constante durante 72 horas. El cronograma de la figura 17a representa la oscilación correspondiente al grupo control, que se ajustó significativamente ( $p < 0.004$ ) al periodo circadiano de 24 h y presentó el porcentaje del ritmo de 51.85 %, según el análisis de Cosinor. En tanto que la acrofase de 5HT [ $71.13 \pm 19.37 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] se ubicó en CT0 (al inicio de la fotofase subjetiva) y la batifase [ $4.83 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] se presentó en CT8 (4 horas antes del inicio de la escotofase subjetiva); mientras que los valores de los demás parámetros del ritmo son: el mesor de  $24.37 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$  y la amplitud de  $28.65$

$\mu\text{mol}/\mu\text{L}$  de 5HT. Por otro lado, el análisis de ANOVA mostró diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) y la prueba de Tukey indicó que estas fueron entre las fases CT0 contra CT8, CT16 y CT20 ( $P = 0.002$ ), y CT0 contra CT12 ( $P = 0.005$ ); por lo que se considera que el patrón mostrado en la figura 17a corresponde a un ritmo circadiano en libre corrimiento de la concentración de 5HT en el GCE de la larva de *S. frugiperda*.

Bajo condiciones de OO, la concentración de 5HT en el GCE de los gusanos cogolleros del grupo experimental continúa oscilando libremente (figura 17b); ya que el análisis de Cosinor demostró que dicha variación se ajustó significativamente ( $p < 0.024$ ) al periodo circadiano de 24 h, siendo los valores del porcentaje del ritmo del 39.32%, el mesor de  $4.83 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$  y la amplitud de  $28.31 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$  de 5HT. Mientras que el análisis de ANOVA arrojó diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre las fases y la prueba de Tukey demostró que la acrofase [ $85.56 \pm 11.96 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] ubicada en CT16, 4 horas después del inicio de la noche subjetiva, la batifase se encuentra en CT4 [ $0.45 \pm 0.57 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ], 4 horas después del inicio del día subjetivo, estas dos fueron significativamente diferentes ( $P = 0.0001$ ); también, las fases CT0, CT4, CT8, CT12 y CT20 presentaron estas diferencias significativas contra la acrofase ( $P = 0.0001$ ).

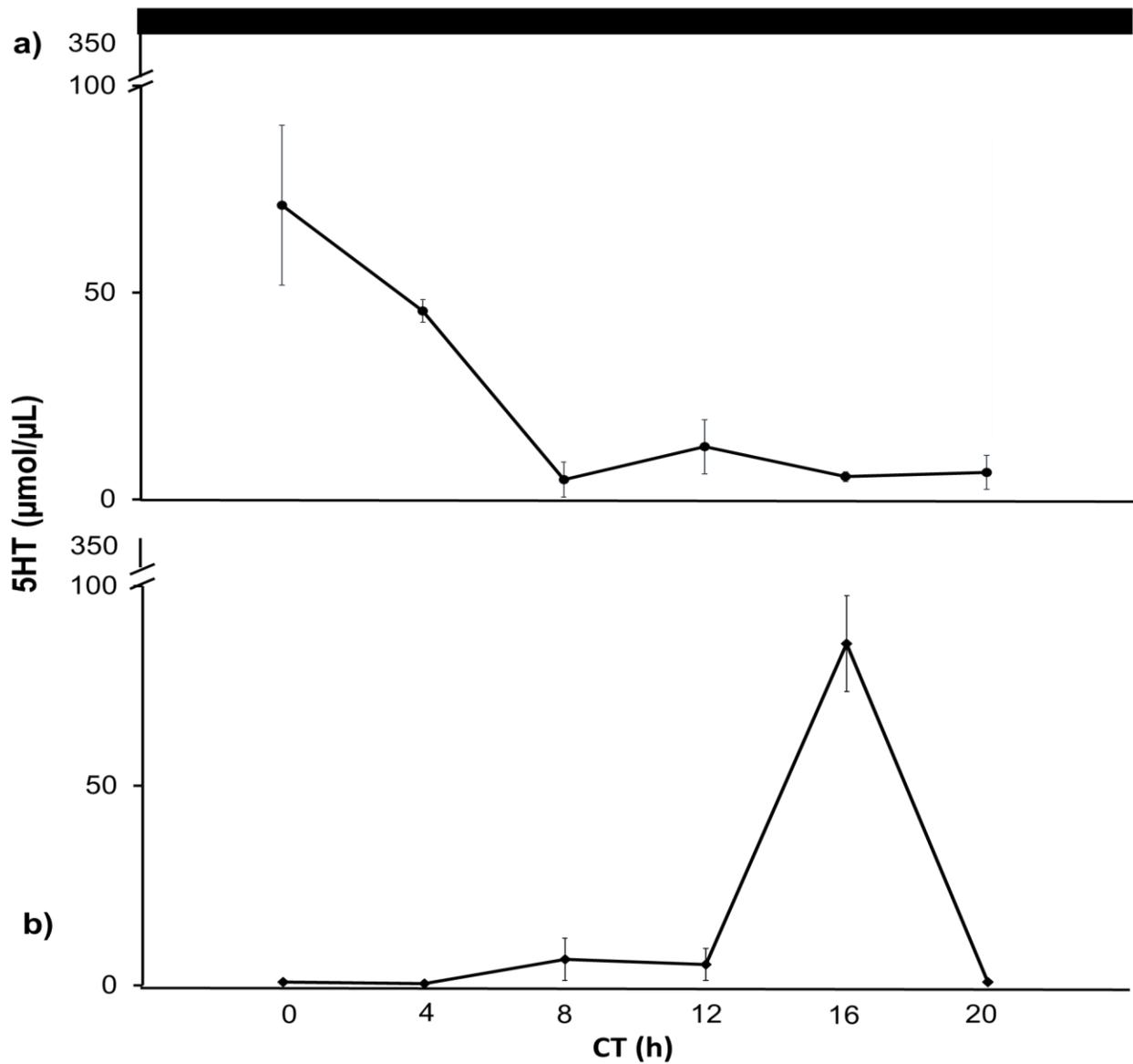


Figura 17. Cronogramas de la concentración de 5HT en el GCE de los grupos control y experimental bajo OO (la barra negra superior indica la condición de OO). a) Ritmo circadiano de la concentración de 5HT del grupo control. b) Ritmo circadiano de la concentración de 5HT del grupo experimental. Los datos mostrados son el promedio  $\pm$  e.e (n=12 por cada CT para los dos grupos).

En la Tabla 8 se detallan los resultados obtenidos con el análisis de ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* de Tukey, que muestran las diferencias significativas entre las fases del ritmo de 5HT en el GCE de los gusanos cogolleros de los grupos control y experimental bajo OO.

Tabla 8. ANOVA de una vía de la concentración de 5HT en el GCE de la larva de *S. frugiperda*. El asterisco indica resultados significativos ( $p < 0.05$ ).

5HT	F	Sig.	Prueba <i>Post hoc</i> Tukey
<b>72 horas en OO Control</b>	9.944	<b>0.001*</b>	CT0 vs. CT8, CT16 y CT20 ( $P=0.002$ )* CT0 vs. CT12 ( $P=0.005$ )*
<b>72 horas en OO Experimental</b>	36.87	<b>0.0001*</b>	CT16 vs. CT0, CT4, CT8, CT12 y CT20 ( $P=0.0001$ )*

En la tabla 9 se desglosan los resultados obtenidos con el análisis de Cosinor de los parámetros de los ritmos circadianos de la concentración de 5HT en el GCE de los gusanos cogolleros alimentados con la DMC y la DME, bajo OO.

Tabla 9. Cosinor de los cronogramas de la concentración de 5HT en el GCE de la larva de *S. frugiperda*. El asterisco indica resultados significativos ( $p < 0.05$ ).

5HT	Periodo (h)	Mesor [ $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ]	Amplitud [ $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ]	Acrofase (h)	PR (%)	p
<b>72 horas en OO Control</b>	24	24.37	28.65	1.31	51.85	<b>&lt;0.038*</b>
<b>72 horas en OO Experimental</b>	24	16.58	28.31	17.37	39.31	<b>&lt;0.024*</b>

PR porcentaje del ritmo

### 8.3. Cambios rítmicos de la concentración de 5HT en el tubo digestivo de la larva de *S. frugiperda*

#### 8.3.1. Condición de LO

Como se muestra en el cronograma de la figura 18a, se encontró la variación diaria de la concentración de 5HT en el TD de los gusanos cogolleros alimentados con la DMC bajo la condición de LO. Cuya acrofase [ $223.24 \pm 3.48 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] se presentó en ZT20, durante la escotofase (4 horas antes del encendido de las luces); mientras que la batifase [ $2.74 \pm 1.96 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] se encontró en ZT8, durante la fotofase, 4 horas antes del apagado de las luces. Con el análisis de ANOVA de una vía se encontraron diferencias significativas entre las fases ( $P < 0.0001$ ), con la prueba *post hoc* de Tukey se observó que dichas diferencias se presentaron entre ZT20 y ZT0, ZT8 frente a ZT12 ( $P = 0.0001$ ), ZT20 contra ZT4 ( $P = 0.0002$ ) y ZT20 con respecto a ZT16 ( $P = 0.009$ ). Además de la acrofase ZT20, ZT16 presenta diferencias significativas contra las demás fases: ZT16 contra ZT8 ( $P = 0.001$ ), ZT16 respecto a ZT12 ( $P = 0.003$ ) y ZT16 frente a ZT0 ( $P = 0.011$ ); no obstante, debido que se encuentra antes de la acrofase se considera como una tendencia de la elevación de la concentración de 5HT. También, en el caso del análisis de Cosinor demostró que dicha oscilación se ajustó significativamente al periodo circadiano de 24 h ( $p < 0.002$ ) y se obtuvieron los siguientes parámetros del ritmo: el porcentaje del ritmo de 57.70%, el mesor de  $78.85 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$  y la amplitud de  $85.55 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$  de 5HT.

Por otra parte, en el TD de las larvas alimentadas con la DME se encontró una oscilación que, según el análisis de ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* de Tukey presentó diferencias significativas ( $p < 0.033$ ) entre ZT0 contra ZT8 ( $P = 0.031$ ). En tanto que, el análisis de Cosinor denotó que dicha oscilación se ajustó significativamente al periodo circadiano de 24 horas ( $p < 0.046$ ) y reveló un porcentaje del ritmo de 33.60%. En el cronograma (Fig. 18b) se observa que la acrofase [ $87.37 \pm 21.68 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] se presenta en ZT0, al inicio de la fotofase; también, durante la fase lumínica, se encontró la batifase en ZT8 [ $13.18 \pm 8.50 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] (cuatro horas antes del apagado de las luces). Por lo que se puede concluir que el patrón detectado para el grupo experimental se trata de un ritmo

diario. Por otra parte, los ritmos diarios detectados en el GCE y el TD de los gusanos alimentados con la DME son muy similares, ya que los dos presentan la acrofase en ZT0 y la batifase en ZT8; no obstante, la concentración de 5HT es mayor en la acrofase del GCE que la del TD.

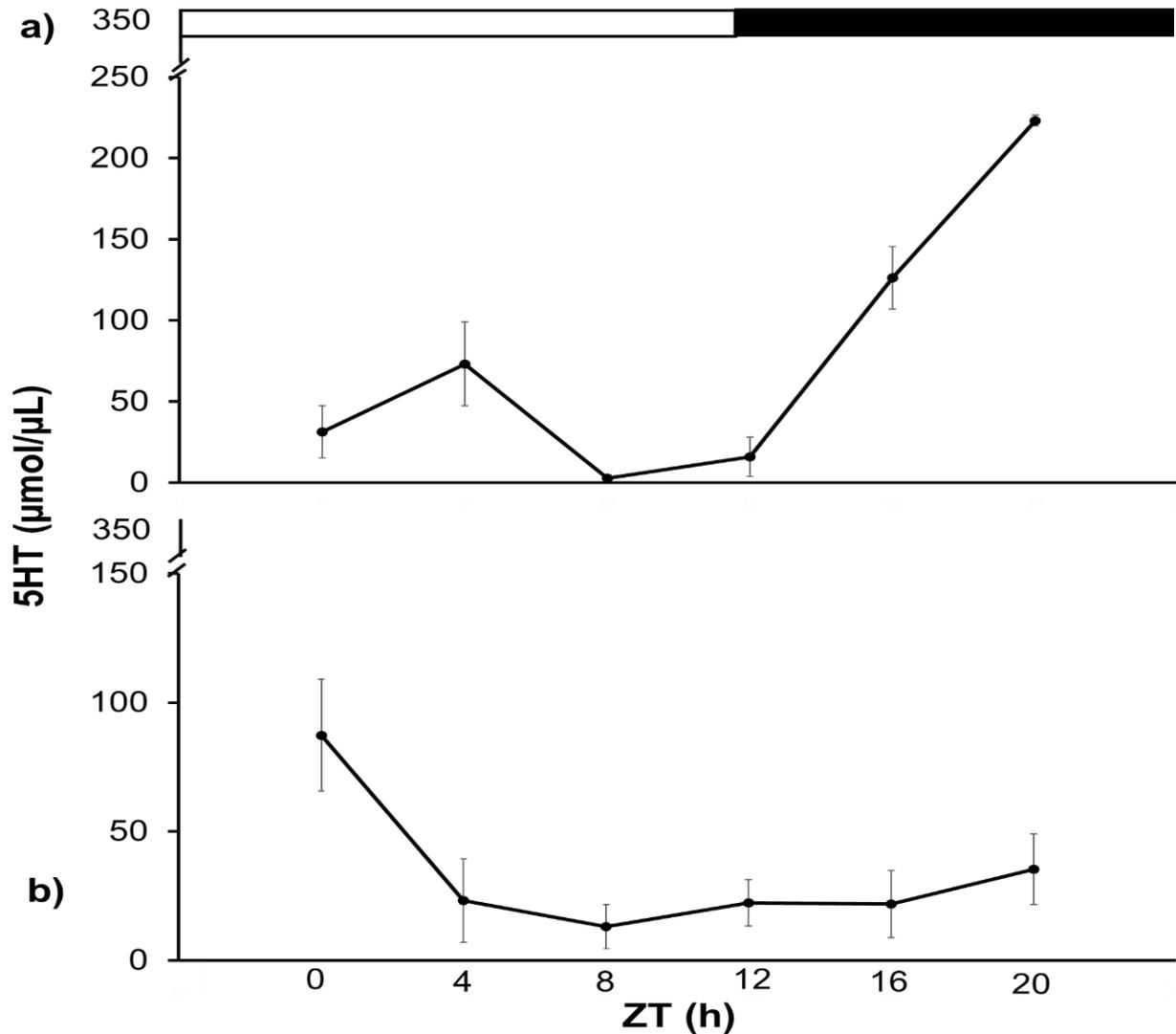


Figura 18. Cronogramas de la concentración de 5HT en TD de los grupos control y experimental bajo LO 12:12 (la barra superior expresa la condición de iluminación, la sección blanca indica la fotofase y la negra la escotofase). a) Ritmo diario de la concentración de 5HT del grupo control. b) Ritmo diario de la concentración de 5HT del grupo experimental. Los datos mostrados son el promedio  $\pm$  e.e (n=12 por cada ZT para los dos grupos).

En la tabla 10 se desglosan los resultados obtenidos con el análisis de ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* de Tukey de las diferencias entre las concentraciones de 5HT en el TD de los gusanos cogolleros del grupo control y experimental bajo la condición de LO.

Tabla 10. ANOVA de una vía de la concentración de 5HT en el TD de la larva de *S. frugiperda*. El asterisco indica resultados significativos ( $p < 0.05$ ).

5HT	F	Sig.	Prueba <i>Post hoc</i> Tukey
LO 12:12 Control	28.652	0.0001*	ZT20 vs. ZT0, ZT8, ZT12 ( $P=0.0001$ )* ZT20 vs. ZT4 ( $P=0.0002$ )*; ZT20 vs. ZT16 ( $P=0.009$ )* ZT16 vs. ZT8 ( $P=0.001$ )*; ZT16 vs. ZT12 ( $P=0.003$ )* ZT16 vs. ZT0 ( $P=0.011$ )*
LO 12:12 Experimental	3.554	0.033*	ZT0 vs. ZT8 ( $P=0.031$ )*

En la tabla 11 se muestran los resultados del análisis de Cosinor de los ritmos diarios de la concentración de 5HT en el TD de los gusanos cogolleros de los grupos control y experimental bajo la condición de LO.

Tabla 11. Cosinor de los cronogramas de la concentración de 5HT en el TD de la larva de *S. frugiperda*. El asterisco indica resultados significativos ( $P < 0.05$ ).

5HT	Periodo (h)	Mesor [ $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ]	Amplitud [ $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ]	Acrofase (h)	PR (%)	P
LO 12:12 Control	24	78.85	85.55	19.31	57.70	<0.002*
LO 12:12 Experimental	24	33.91	26.28	23.07	33.60	<0.046*

PR porcentaje del ritmo

### 8.3.2. Condición de OO

En la figura 19 se muestran los cronogramas de la concentración de 5HT en el TD de los gusanos cogolleros de los grupos control y experimental bajo la condición de oscuridad constante. Con el análisis de ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.004$ ) entre CT0 y CT4 ( $P = 0.005$ ), CT16 ( $P = 0.008$ ), CT12 ( $P = 0.013$ ), CT8 ( $P = 0.017$ ) con respecto a CT20 ( $P = 0.024$ ). A pesar de que se detectaron diferencias significativas con el ANOVA, con el análisis de Cosinor se observó que la oscilación del grupo control (Fig. 19a) no se ajustó significativamente ( $p > 0.206$ ) ni a un periodo circadiano ni ultradiano, por lo que no se puede decir que se trate de un ritmo bimodal, aun cuando presenté la acrofase [ $71.07 \pm 18.07 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] en CT0 (inicio de la fotofase subjetiva) y otra elevación de 5HT [ $33.57 \pm 16.45 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ] en CT8; mientras, que la batifase se encontró en el CT4 [ $0.94 \pm 0.82 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ], 4 horas después del encendido de las luces.

También, el análisis de ANOVA con la prueba *post hoc* de Tukey mostró diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) entre la acrofase en CT12 [ $59.94 \pm 13.53 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ], el inicio de la escotofase subjetiva, contra la batifase en CT20 [ $0.89 \pm 0.42 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ], 4 horas antes del inicio de la fase subjetiva, de la oscilación de la concentración de 5HT en el TD del grupo experimental bajo OO; además, la acrofase presentó diferencias significativas contra CT0 ( $P = 0.00018$ ), CT4 ( $P = 0.00022$ ), CT8 ( $P = 0.00024$ ) y CT16 ( $P = 0.00044$ ). Adicionalmente, el análisis de Cosinor mostró un ajuste significativo ( $P = 0.05$ ) al periodo de 24 horas. Asimismo, se puede observar que el cronograma de la figura 19b que corresponde al TD del grupo experimental es muy similar al cronograma de la figura 17b que corresponde al GCE del grupo experimental bajo OO, pero la acrofase del segundo se presenta en CT16, durante la escotofase subjetiva; también, la batifase se encuentra en otro punto temporal, en CT4.

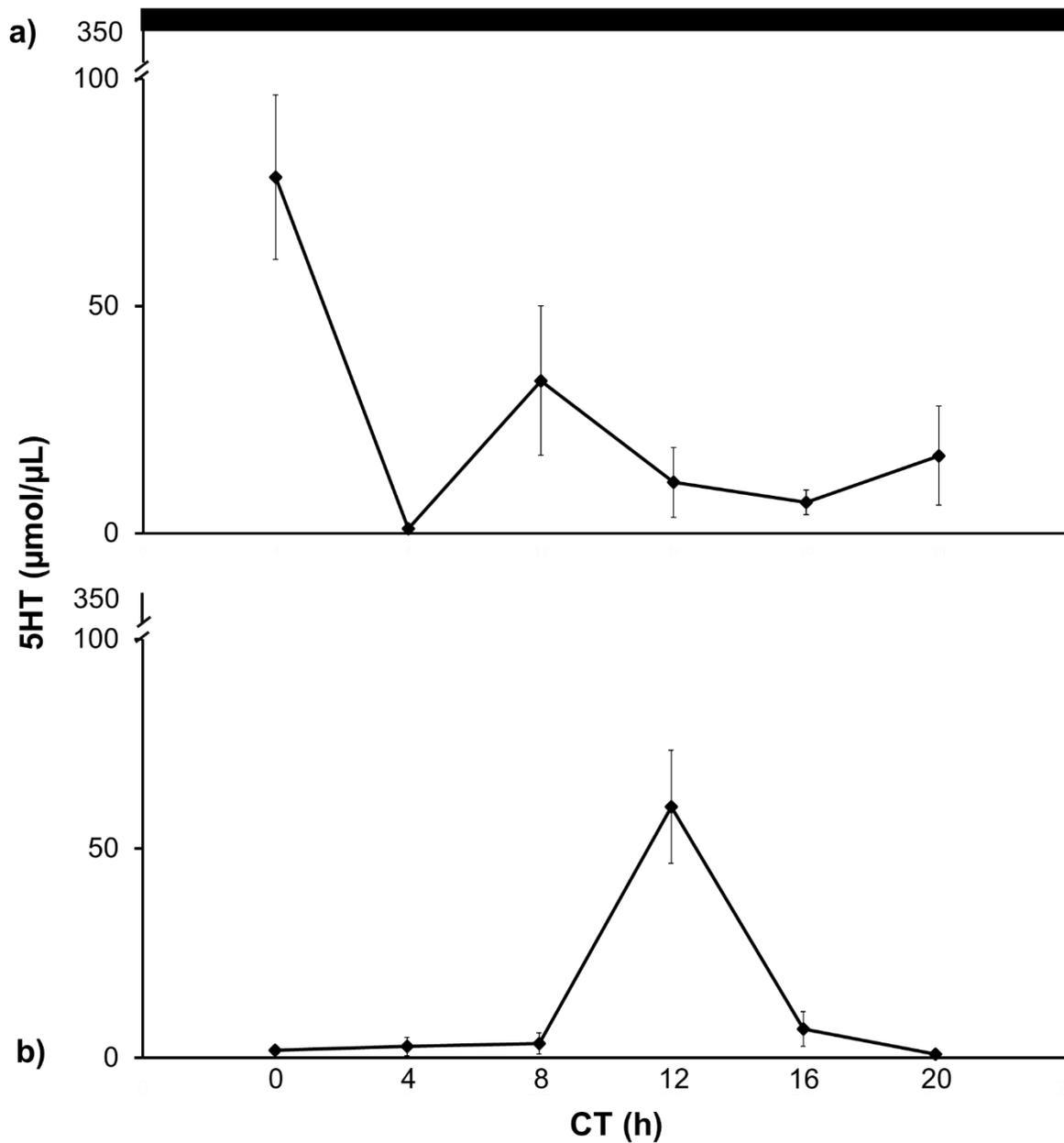


Figura 19. Cronogramas de la concentración de 5HT de los grupos control y experimental bajo OO, (la barra negra superior indica la condición de OO). a) Oscilación de la concentración de 5HT del grupo control. b) Oscilación de la concentración de 5HT del grupo experimental. Los datos mostrados son el promedio  $\pm$  e.e (n=12 por cada CT para los dos grupos).

En la Tabla 12 se pueden observar los resultados obtenidos del análisis de ANOVA con la prueba *post hoc* de Tukey, de las diferencias entre las concentraciones de 5HT en el TD de los gusanos cogolleros de los grupos control y experimental bajo la condición de OO.

Tabla 12. ANOVA de una vía de la concentración de 5HT en el TD de la larva de *S. frugiperda*. El asterisco indica resultados significativos ( $p < 0.05$ ).

5HT	F	Sig.	Prueba <i>Post hoc</i> Tukey
OO 12:12 Control	6.247	0.004*	CT0 vs. CT4 ( $P=0.005$ )* CT0 vs. CT16 ( $P=0.008$ )* CT0 vs. CT12 ( $P=0.013$ )* CT0 vs. CT8 ( $P=0.017$ )* CT0 vs. CT20 ( $P=0.024$ )*
OO 12:12 Experimental	15.237	0.0001*	CT12 vs. CT20 ( $P=0.00016$ )* CT12 vs. CT0 ( $P=0.00018$ )* CT12 vs. CT4 ( $P=0.00022$ )* CT12 vs. CT8 ( $P=0.00024$ )* CT12 vs. CT16 ( $P=0.00044$ )*

En la Tabla 13 se detallan los resultados obtenidos con análisis de Cosinor aplicado a las oscilaciones de la concentración de 5HT en el TD de los gusanos cogolleros de los grupos control y experimental bajo la condición de OO. Solamente la oscilación del grupo experimental se ajustó al período circadiano de 24 horas.

Tabla 13. Cosinor de los cronogramas de la concentración de 5HT en el TD de la larva de *S. frugiperda*. El asterisco indica resultados significativos ( $p < 0.05$ ).

5HT	Periodo (h)	Mesor [ $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ]	Amplitud [ $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ]	Acrofase (h)	PR (%)	P
OO 12:12 Control	24	24.64	18.91	0.38	18.97	>0.206
OO 12:12 Experimental	24	20.42	24.83	9.53	32.73	<0.05

PR porcentaje del ritmo

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. Identificación de la 5HT en el ganglio cerebroide y el tubo digestivo de la larva de *S. frugiperda*.

La 5HT es una amina biogénica ampliamente distribuida en el reino animal. Diversos estudios han reportado su presencia en celenterados, platelmintos, anélidos, protocordados, moluscos, crustáceos, quilópodos, diplópodos, quelicerados, hexápodos, amblicipítidos, monotremas, metaterios, euterios, testudíneos y en las aves (Fujii y Takeda 1988; Spielman, *et al.* 2015; Harzsch 2004); incluso, la serotonina está presente en diversos grupos de plantas (Pelagio-flores *et al.* 2011). Con base en los resultados obtenidos mediante la técnica de HPLC se puede considerar que la 5HT está presente en el GCE y el TD del gusano cogollero. El Tr-5HT proveniente de las muestras de los grupos control y experimental coincidieron con el Tr-5HT estándar; no obstante, como se puede ver en la tabla 5, el Tr no fue el mismo para cada grupo. El Tr de cualquier sustancia separada por HPLC depende de muchos factores: el pH de la fase móvil; el ancho, largo y las características fisicoquímicas de la fase estacionaria; la temperatura ambiental del lugar dónde se realizó el análisis; la velocidad flujo; el número de muestras analizadas por sesión de trabajo, y si éstas fueron analizadas en un sola o varias sesiones de trabajo; el cromatógrafo (tipo de detector); las propiedades de la muestra (origen, pH); etc. En la presente tesis, el pH fue la variable más susceptible a modificarse y con más efecto sobre el Tr-5HT; durante la experimentación se comprobó que este se modificaba de acuerdo a la relación TFA: ACN: H<sub>2</sub>O. Por ejemplo, Lesniak y colaboradores (2013), la fase móvil es la misma que se empleó en este estudio, encontraron que el Tr-5HT fue 7.91 minutos después de la inyección de la muestra proveniente del cerebro del conejo albino de Nueva Zelanda, pero no mencionan nada sobre la variabilidad del pH, cabe mencionar que estos autores utilizaron otro cromatógrafo y tipo de columna.

Por otro lado, Castañón-Cervantes y colaboradores (1999) describieron que el Tr-5HT fue de 9.36 minutos para muestras del GCE y los tallos oculares del acocil (*P. clarkii*); ellos emplearon la misma columna que en el presente trabajo (Supelcosil C18, 100x4.6mm 5µm), pero el detector electroquímico y la fase móvil rica en sales. En insectos, particularmente en la chinche de Chagas (*R. prolixus*), Lange y colaboradores (1988) encontraron que la 5HT proveniente de las muestras preparadas con base en la hemolinfa de este invertebrado eluye 13 minutos en una columna RP-18 y 30 minutos en una columna ODS después de la inyección en el detector electroquímico. Como se ha visto el Tr de cualquier analito depende de muchas variables; no obstante, cuando se han descartado las posibles fuentes de ruido y se toman en cuenta los factores que influyen en el proceso experimental se puede llegar a una determinación eficaz del analito de interés.

## **9.2. Cambios rítmicos de la concentración de 5HT en el ganglio cerebroide de la larva de *S. frugiperda* bajo condiciones de LO y OO.**

Los resultados de la presente tesis indican que la concentración de 5HT presentó oscilaciones a lo largo del día en el GCE de los gusanos cogolleros del grupo control bajo las condiciones de LO y OO durante 72 horas. No obstante, en la condición de LO 12:12 no se encontraron diferencias significativas entre las 6 fases y los niveles de concentración fueron bajos con respecto a los niveles encontrados en la condición de OO (comparando las acrofases, ver figuras 16a y 17a), ya que las fases de este grupo control si presentaron diferencias significativas entre ellas (ver tabla 7 y 9). Además, la oscilación de la concentración de 5HT del fotoperiodo LO 12:12 no se ajustó significativamente a ningún periodo circadiano, ultradiano e infradiano (ver tabla 7), por lo que no se puede aseverar que se trate un ritmo diario. Por el contrario, en la condición de OO persistió el ritmo circadiano de la concentración de 5HT en libre corrimiento (ver tabla 9). Asimismo, el análisis de Cosinor muestra que la amplitud, el mesor y el PR% del ritmo fueron menores en la condición de LO con respecto a los valores obtenidos de la amplitud, el mesor y el PR% del ritmo en la condición de OO.

Rietveld y colaboradores (1993) mencionan que el ambiente tiene efectos directos sobre el sistema y los ritmos circadianos; por lo que, ciertas condiciones experimentales pueden afectar el modo de acción del *Zeitgeber* sobre los relojes biológicos, enmascaran la expresión de los ritmos biológicos. Previamente, Miranda-Anaya y colaboradores (2002) caracterizaron el ritmo circadiano de actividad locomotora de las larvas y las palomillas de *S. frugiperda*, ellos mencionan que los adultos presentan un mayor porcentaje de sincronización que los gusanos cogolleros y atribuyen este efecto al enmascaramiento por la luz. Además, de que los gusanos cogolleros presentaron patrón de actividad diurno difuso en comparación con los adultos, ya que sólo 5 de 22 gusanos cogolleros empleados en el diseño experimental lograron sincronizarse al fotoperiodo 12:12 LO; conjuntamente, las 17 larvas restantes presentaron un mayor porcentaje de actividad durante la fotofase, pero no se observó relación de fase estable entre el periodo del sincronizador y la actividad locomotora (Miranda-Anaya, *et al.*, 2002). En otro estudio, en campos de cultivo y un invernadero se observó que las larvas de *S. frugiperda* presentan fototaxis negativa, es decir, que tienden a internalizarse en los cogollos de las plantas hospederas en búsqueda de refugio para protegerse de la luz; que a su vez les brinda protección para la ocurrencia de la pupación, contra depredadores y parásitos y encuentran ciertos nutrientes que no están disponibles en la hojas más maduras y expuestas del cultivo (Pannuti, *et al.*, 2015). También, en campos de cultivos abiertos se ha observado que los gusanos cogolleros tienden a ser más activos al amanecer y al anochecer, salen de sus escondites a buscar otra planta en caso de que haya más larvas en la que se encuentra (Willink, *et al.*, 1993). La información antes descrita podrían sostener y justificar que la oscilación de 5HT bajo el fotoperiodo LO 12:12 sufrió enmascaramiento, como en el caso del ritmo de actividad locomotora, ya que en el presente estudio se utilizaron vasos transparentes para contener a las larvas, que permitían la entrada de la luz desde cualquier ángulo; por lo tanto, pudieron intensificar la fototaxis negativa y la búsqueda de refugio de los gusanos cogolleros; como observación personal, los gusanos cogolleros perforaban y formaban cavidades en la dieta merídica, pero la cantidad de dieta no los cubría por completo.

También, se ha observado que *D. melanogaster* presenta fototaxis negativa, en la naturaleza las larvas de la mosca se entierran en las frutas podridas; no obstante, en el laboratorio muestran otros comportamientos que se han visto relacionados con la prolongada exposición a la luz (Kohsaka, *et al.*, 2017). La luz, el sistema serotoninérgico y los relojes circadianos conforman una red compleja de asas de retroalimentación negativas y positivas que dan lugar a la sincronización del sistema circadiano de los insectos; por ejemplo, en el grillo, *G. bimaculatus*, se ha visto que la concentración de la 5HT oscila dependiendo de la hora del día, en sincronización con los cambios en la sensibilidad de las interneuronas visuales debido al efecto de la luz (Saifullah y Tomioka, 2002; Nishinobuki y Tomioka, 2000; Tomioka *et al.*, 1993; Tomioka, 1999; Cymborowski, 1998). La complejidad menor del sistema nervioso ha permitido observar que la 5HT está implicada en la fototaxis negativa de *D. melanogaster*; específicamente, se encuentra modulando la intensidad de la luz entre los fotorreceptores y el reloj circadiano (Humberg y Sprecher, 2017; Baik, *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha visto que reloj biológico tiene diferentes mecanismos, además de la modulación de la 5HT, para establecer la sincronización con la señal y la intensidad de la luz (Kohsaka, *et al.*, 2017; Baik, *et al.*, 2018). Adicionalmente, no se ha logrado dilucidar a detalle el efecto directo de la luz sobre el sistema serotoninérgico (Huser, *et al.*, 2017); pero sí se ha demostrado que el comportamiento exploratorio del movimiento de la cabeza de las larvas de *D. melanogaster* en respuesta a un pulso de luz está mediado por neuronas serotoninérgicas (Rodríguez-Concalvo y Campos, 2009). Por lo que, los procesos descritos en *D. melanogaster* podrían estar ocurriendo de forma similar en el posible enmascaramiento de la oscilación de la concentración de 5HT en el GCE del gusano cogollero; a su vez, este enmascaramiento podría estar influyendo en el efecto modulador de la 5HT sobre la expresión de diversos ritmos biológicos, por ejemplo, en los patrones conductuales. Es importante mencionar que tanto la sincronización y el enmascaramiento son respuestas estratégicas o de adecuación del sistema circadiano a las complejas relaciones dinámicas entre las señales externas, las entradas sensoriales, la actividad neuronal y las salidas de diversos comportamientos (Salazar-Juárez, *et al.*, 2006; Humberg y Sprecher, 2017).

Por lo que, dilucidar y conectar los patrones conductuales de *S. frugiperda* con la forma en que son expresados por el sistema nervioso podría vislumbrar el camino para elaborar herramientas de control con la contemplación de la cantidad y la intensidad de iluminación; que podrían ser aplicadas en agroecosistemas controlados como los invernaderos. Además, de que permitirían profundizar en el estudio del papel de la 5HT en el sistema de integración de las señales del sistema circadiano del gusano cogollero; debido a que los resultados mostrados en la presente tesis no son concluyentes para aseverar que efectivamente existe enmascaramiento por parte de la luz.

Por otra parte, aunque la oscilación de la concentración de 5HT en el GCE de los gusanos cogolleros no presentó significancia con los análisis de ANOVA y Cosinor (ver tablas 6 y 7) es muy similar al patrón del ritmo diario descrito en las larvas de dos variedades invernal y la veraniega de *D. melanogaster* (Fowler, *et al.*, 1972); ya que dichas oscilaciones tienen dos elevaciones en la concentración de 5HT a lo largo de 24 horas, una durante la fotofase y la otra en la escotofase, como en el caso de la oscilación de 5HT del gusano cogollero (ver figura 16a). No obstante, las acrofases de 5HT ocurren en diferentes ZT; lo que podría ser debido a que los fotoperiodos utilizados en el trabajo de Fowler y colaboradores (1972) son diferentes al manejado en esta tesis LO 12:12, ellos utilizaron los fotoperiodos LO 10:14 (variedad invernal) y LO 14:10 (variedad veraniega). En el caso del gusano cogollero, el primer pico ocurre en ZT8 (14:00 h) y el segundo se encontró en ZT20 (02:00 h). Mientras, que en los ritmos diarios bimodales de las variedades invernal y veraniega de *D. melanogaster* los picos más elevados ocurrieron en 02:00 y 22:00 horas (escotofase) y en 14:00 y 10:00, respectivamente. Además, la acrofase de la concentración de 5HT de la variedad invernal ocurrió durante la escotofase y de la variedad veraniega ocurrió en la fotofase, al igual que en el gusano cogollero. Contrario a lo que se observó en el presente estudio y en el trabajo de Fowler y colaboradores (1972), en insectos hemimetábolos se ha visto que el ritmo diario de 5HT sólo presenta una acrofase a lo largo del día bajo condiciones de fotoperiodo. Muszynska y Cymborowski (1978) observaron que los ritmos diarios de la concentración de 5HT en el GCE y la hemolinfa de grillos, *A. domesticus*, presentan la acrofase durante la fotofase, a las 7:00 horas, una hora después del encendido de las luces; no obstante,

las batifases se presentan en horas distintas, a las 19:00 horas en el GCE y a las 24 horas en la hemolinfa. Los autores mencionan que el aumento en la síntesis de 5HT se debe al estímulo de la luz. También, registraron la actividad locomotora pero no encontraron una correlación significativa entre los porcentajes de la concentración de la 5HT y la actividad locomotora. Contrario a lo que sucede en *A. domesticus*, en otra especie de grillo, *G. bimaculatus*, la concentración de 5 HT es mayor durante la escotofase que en la fotofase; por el contrario, Tomioka y colaboradores (1993) mencionan que esta concentración disminuye durante el día debido al estímulo de la luz, lo que desencadena las asas de retroalimentación que integran el sistema circadiano de este insecto (Tomioka, *et al.*, 1993). También, se ha detectado el ritmo diario de 5HT en el GCE de la cucaracha, *P. americana*; específicamente, en los ganglios CA, CC y frontal. En las tres estructuras, la variación de la concentración de la 5HT presentó la acrofase durante la escotofase, a las 24 horas, 4 horas después del encendido de las luces; y la batifase se encontró a las 12 horas (Jagota y Habibulla, 1992; Pandey y Habibulla, 1982). No cabe duda, que existen muchas semejanzas entre los insectos holometábolos y hemimetábolos; asimismo, entre especies con el mismo tipo de desarrollo, como los dípteros y lepidópteros.

Hay estudios que demuestran la presencia de 5HT en el GCE de diversos insectos (Award, *et al.*, 1997; Cantera y Carlberg, 1988; Gen, *et al.*, 1993; Takeda, *et al.*, 1991). Anteriormente, se mencionaron algunos trabajos que describen el ritmo diario de 5HT en insectos holometábolos y hemimetábolos (Fowler, *et al.*, 1972; Muszynska y Cymborowski, 1978; Tomioka, *et al.*, 1993; Jagota y Habibulla, 1992; Pandey y Habibulla, 1982). Incluso en otros estudios se ha logrado dilucidar diversas funciones de la 5HT en el sistema circadiano (Blenau y Baumann, 2001; Cohen, *et al.*, 1988; Falibene, *et al.*, 2012; Flanagan, 1984; Fuji y Takeda, 1988; Gatellier, *et al.*, 2004; Luffy y Dorn, 1991; Vleugels, *et al.*, 2015; Luo, *et al.*, 2012; Neckameyer y Leal, 2017; Qian, *et al.*, 2017). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos de investigación se utilizó la condición de OO para cuantificar la concentración de 5HT en 6 CT a lo largo de 24 horas. Es imprescindible resaltar que durante los estudios cronobiológicos es indispensable evaluar y analizar la variable de interés en condiciones de fotoperiodo y OO; ya que la

alternancia entre la luz y la oscuridad brinda panorama de la expresión de la oscilación bajo el efecto del sincronizador, y la oscuridad permite discernir si dicha oscilación está regulada de forma endógena, al seguir expresándose en libre corrimiento sin la señal externa. También, se deben tomar en cuenta que los intervalos entre las mediciones sean cortos (4 horas) para evaluar posibles oscilaciones ultradianas o infradianas (Vega, 1993; Salazar-Juárez, *et al.*, 2006; Rodrigo, *et al.*, 2007; Tauber y Kyriacou, 2001; Cardinali, 1994). Por lo que, el diseño experimental del presente estudio es concordante con los datos mencionados anteriormente y es la primera investigación que describe el ritmo circadiano significativo de la concentración de 5HT en el GCE de la larva de *S. frugiperda*; ya que el cambio del fotoperíodo a la OO permitió observar que la oscilación se expresa en libre corrimiento. Con el análisis de Cosinor se obtuvo el ajuste significativo solamente para un periodo de 24 horas (ver tabla 9), cuya acrofase se presentó al inicio del día subjetivo (figura 17a) y fue mayor que la acrofase de la oscilación encontrada en la condición de LO (figura 16a). No obstante, Yuan y colaboradores (2005) también emplearon la condición de OO, pero la oscilación de la concentración de 5HT en las neuronas reloj del GCE (NV, PI y MB) de *D. melanogaster* no se ajustó a un periodo circadiano; pero cuando cuantificaron y observaron la concentración disminuyó significativamente en CT2 a lo largo de 7 ciclos de 24 horas bajo OO; de esta forma comprobaron que una exposición prolongada a la luz influye sobre los niveles de 5HT, principalmente en las NV. A su vez, demostraron que la 5HT modula la sensibilidad del reloj a las señales lumínicas (fotofase), mediante el receptor d5-HT1B; ya que la sobreexpresión de este receptor y la mutación de *cry* en moscas provocó arritmias en el ritmo circadiano de actividad locomotora. Por lo que, proponen que la señalización de la 5HT es una parte de la regulación homeostática que evita fluctuaciones atípicas en la fase del marcapasos y que puede conferir selectividad en la respuesta del reloj a la luz en diferentes condiciones ambientales (Yuan, *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006). Es preciso señalar que el gusano cogollero en condiciones de oscuridad presenta mayor actividad durante la fotofase subjetiva (Miranda-Anaya *et al.*, 2002), que coincide con el ritmo circadiano de la concentración de 5HT descrito en la presente tesis, cuya acrofase se presenta en dicha fase del día. Si bien no se describieron en el mismo protocolo tanto el ritmo circadiano de 5HT como el ritmo circadiano de actividad locomotora, indirectamente

refuerzan la postura de Yuan y colaboradores (2005) y las demás investigaciones en insectos hemimetábolos que sostienen que la actividad locomotora está regulada por la 5HT (Cymborowski, 1970; Muzynska y Cymborowski, 1998). Sin embargo, se ha observado que el aumento de la concentración de 5HT exógena en el GCE de insectos hemimetábolos provoca una disminución en la locomoción, mientras, que una concentración menor contribuye a la salida del movimiento (Cymborowski, 1970; Muzynska y Cymborowski, 1998); en estudios recientes en *D. melanogaster*, con la caracterización e inhibición de los receptores de 5HT se ha revelado que la variedad de funciones moduladas por dicha monoamina depende de las estructuras dónde se encuentren y que pueden ser tanto excitatorias como inhibitorias (Blenau y Thamm, 2011; Blenau y Baumann, 2001; Vleugles, *et al.*, 2015; Falibene, *et al.*, 2012; Gatellier y Kansaki, 2004; Hamilton, *et al.*, 2017; Qi *et al.*, 2017; Huser, *et al.*, 2017). Por ejemplo, además del papel inhibitorio de 5HT (mediado por d5-HT1B) sobre la fosforilación de TIM en las NV (Yuan, *et al.* 2005), en *D. melanogaster* se ha visto que el receptor 5-HT2A activa el control inhibitorio de los MB sobre los movimientos que regulan (Yuan, *et al.*, 2006; Qian, *et al.*, 2017; Humberg y Sprecher, 2017). Contrario a esto, este mismo receptor promueve la actividad de la unidad motora que inerva las fibras musculares de la pared corporal, tanto en la mosca *D. melanogaster* como en la langosta *L. migratoria* (Wu y Cooper, 2012; Hill y Usherwood, 1961). También, 5-HT1A es parte de la modulación de actividad locomotora de las larvas y palomilla de *B. mori* (Xiong, *et al.* 2019). Por lo tanto, se puede aseverar que la 5HT efectúa una modulación sobre los sistema nervioso central y periférico de los insectos; también existen otros estudios que mencionan que esta monoamina es solamente un neurotransmisor más en la inmensa variedad existente que regula de una forma u otra al sistema circadiano, como la octopamina, la noradrenalina, GABA, etc. (Neckameyer y Leal, 2017; Neckameyer y Leal, 2009; Helfrich-Forster, *et al.*, 2011; Vleugels, *et al.*, 2015). Por ejemplo, el PDF se ha identificado como el modulador en el acoplamiento entre los osciladores del GCE durante la escotofase, tanto de insectos holometabólos como hemimetábolos (Tataroglu y Emery, 2014; Zhang y Emery, 2012; Bell-Pedersen, *et al.* 2005). De hecho, la teoría del oscilador dual propone que las neuronas del oscilador M sincronizan e imponen la fase del zeitgeber a las neuronas del oscilador E bajo OO, mediante la modulación de la 5HT, el

PDF y otras moléculas señalizadoras (Helfrich-Forster, *et al.*, 2011; Helfrich-Forster, 2009; Zhang y Emery, 2012).

### **9.3. Efecto del extracto químico de *A. indica* sobre la oscilación y concentración de 5HT en el ganglio cerebroide de la larva de *S. frugiperda*.**

Otro objetivo de la presente tesis fue la evaluación del efecto, de la incorporación a la DMC, de un extracto químico proveniente de la semilla de *A. indica* sobre el ritmo de concentración de 5HT en el GCE del gusano cogollero. Al contrario de la oscilación de 5HT del grupo control bajo el fotoperiodo LO 12:12, en el grupo experimental se encontró un ritmo diario significativo (ver tabla 6 y 7). Además, como se puede observar en el comparativo de la figura 16, la acrofase fue mayor en el grupo experimental con respecto a la oscilación del grupo control bajo el fotoperiodo de LO 12:12; también, si se compara el ritmo del grupo experimental bajo el fotoperíodo LO 12:12 (figura 16b) con el ritmo mostrado en el grupo control bajo OO (figura 17a) se puede considerar que son patrones muy similares. Por otra parte, se encontró un ritmo circadiano de la concentración de 5HT en el GCE del gusano cogollero del grupo experimental sometido a OO (17b). Es muy interesante observar que esta oscilación circadiana difiere de la encontrada en el grupo control, en cuanto a la concentración las acrofases son muy similares, pero ocurrieron en distintos CT, en el grupo control se encontró en CT0 y en el grupo experimental aconteció en CT16 (ver figura 17). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el extracto metanólico de la semilla de *A. indica* tiene un efecto significativo sobre la expresión de los ritmos diario y circadiano de la concentración de 5HT en el GCE de las larvas de *S. frugiperda*.

Recientemente, se ha visto que tanto *S. frugiperda* como otras especies polífagas son capaces de generar resistencia a los pesticidas sintéticos e incluso a las sustancias producidas por organismos genéticamente modificados (Yu, 1991; De Polanía, *et al.*, 2009; Huang, *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2016; Santos-Amaya, *et al.*, 2017; Morillo y Notz, 2001). En los sistemas agroecológicos de bajos recursos y débil infraestructura se suelen utilizar pesticidas formulados a partir de diversas plantas. Entre este uso y otros, se ha visto que los metabolitos secundarios de *A. indica*, principalmente los provenientes

de la semilla, tienen efectos disuasorios y antialimentarios sobre diversas especies lepidópteros (Trujillo, *et al.*, 2008; Sosa, 2002; Schmutterer, 1990; Raffa, 1987; Senthil-Nathan, 2013; OMS, 1990; Koul e Isman, 1991; Mann y Kaufman, 2012). El principal metabolito secundario con más efectos insecticidas y el más estudiado es la AZA. Incluso, se ha caracterizado que además de algunas especies de ortópteros y coleopteros, los lepidópteros son los insectos con más efectos negativos cuando entran en contacto directo o indirecto con extractos químicos del Nim (Mordue y Nisbet, 2000; Senthil-Nathan, 2013; Mordue, *et al.*, 1986; Schluter, *et al.*, 1985). De hecho, existen diversos estudios que comprueban los efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de *S. frugiperda*; por ejemplo, se ha visto que AZA tiene efectos negativos sobre la regulación del crecimiento, la alimentación, metabolismo, la reproducción, la diapausa, el comportamiento, los músculos y las células epiteliales (Gutiérrez, *et al.*, 2010; Mikolajczak y Reed, 1987; Mitchell, *et al.*, 1997; Maredia, *et al.*, 1992; Mann y Kaufman, 2012). En diversos estudios reportan que la concentración de 1 ppm de concentración de aceite, extracto metanólico o etanólico de semillas de *A. indica* es suficiente para producir mortandad entre el 50 y 70% y para observar la disrupción del crecimiento y desarrollo; además, se ha visto que los metabolitos secundarios del Nim tienen una mayor toxicidad por ingestión que por contacto directo, asimismo que los efectos son diferentes cuando se inyecta. De esta manera, el impacto de los metabolitos secundarios varía de acuerdo al tipo de producto (aceite, tipo de extracción y solvente) y la concentración (Raffa, 1987; Senthil-Nathan, 2013; Railda *et al.*, 2010; Maredia, *et al.*, 1992; Schmutterer, 1990; Sieber y Rembold, 1983; Trujillo, *et al.*, 2008). Por lo que, para la presente tesis se corroboró que dicha concentración permitió realizar el bioensayo y cuantificar la 5HT en el GCE y el TD de los gusanos cogolleros que sobrevivieron. Además, se ha demostrado que la concentración de 5HT en el GCE de insectos se modifica de acuerdo al tipo de alimento suministrado; específicamente, cuando se alimenta con dieta con gran concentración de sacarosa. Por ejemplo, la alimentación rica en sacarosa del gusano elotero (*H. zea*) promovió el aumento en la concentración de 5HT en el GCE. Mientras que la incorporación de triptófano a la dieta no denotó ningún aumento (Cohen, *et al.* 1988). En el presente trabajo se utilizó una DMC muy similar a la dieta control del estudio de Cohen y colaboradores (1988), además de que las

condiciones de crianza fueron muy similares. Por lo que, se podría considerar que la concentración de sacarosa en la dieta utilizada en la presente tesis no alteró los niveles de 5HT.

Son muy pocos los estudios que dilucidan y caracterizan los efectos de los extractos del Nim a nivel fisiológico en *S. frugiperda* (Ayil-Gutiérrez, *et al.*, 2018); no obstante, sí existen estudios en otros insectos. Por ejemplo, Banerjee y Rembold (1992) demostraron que la aplicación ventral de AZA provocó el aumento significativo de la concentración de la 5HT en el GCE, la CC y el SOG de las langostas *S. gregaria* y *L. migratoria*. Dicho aumento es por el bloqueo de la liberación de 5HT. Con respecto a los resultados obtenidos por Banerjee y Rembold (1992), en la presente tesis se observó que la acrofase de 5HT del ritmo diario del grupo experimental fue mayor con respecto a la acrofase de la oscilación del grupo control bajo el fotoperíodo LO 12:12 (ver figura 16). También, el extracto de *A. indica* provocó la inversión de la acrofase de los grupos control y experimental bajo OO; ya que se presentó en CT0 (inicio de fotofase subjetiva) en el grupo control, mientras que en el grupo experimental se ubicó en CT16 (escotofase subjetiva), como se puede observar en la figura 17. Además, Banerjee y Rembold (1992) no consideraron la condición de OO y tomaron las muestras en un solo punto temporal. En otro estudio, Jagota y Habibulla (1992) cauterizaron al nervio central que conecta a las *PI* y *PL* con las *CA* y *CC* de la cucaracha *P. americana*; y los nervios frontales izquierdo y derecho que inervan al tritocerebro, con lo que comprobaron que el nervio central es el principal conector entre el marcapasos y las *CA* y *CC* (osciladores periféricos), ya que al removerlo el ritmo diario de la concentración de 5HT se abolió en dichas estructuras. Esto no ocurrió al remover los nervios frontales; siendo que el tritocerebro también tiene conexiones con las *CA* y *CC*. La cauterización del ganglio frontal produjo la acumulación del material neurosecretor en la *CC*, por lo que podría estar involucrado en la liberación de la 5HT sobre las estructuras posteriores en la cadena ganglionar y hemolinfa. Aunque en este estudio no utilizaron AZA, la cauterización provocó efectos similares a la presente tesis y al estudio de Banerjee y Rembold (1992) con respecto a la acumulación de la 5HT. En otros estudios se demostró que la inyección de AZA abolió el ritmo de actividad locomotora en un porcentaje considerable de los organismos tratados de la mosca *M.*

*domestica* y la cucaracha *L. maderae*. Además, en los insectos que no presentaron arritmia provocó una reducción del período del ritmo de la actividad locomotora (Smietanko y Englemann, 1989; Han y Englemann, 1987). Por lo que, los dichos efectos de AZA y los demás metabolitos de *A. indica* podrían impactar de forma sinérgica y sistémica sobre la modulación y la regulación de la 5HT tanto en las estructuras como en las variables biológicas de los organismos mencionados, así como los ritmos diario y circadiano de la concentración de 5HT en el GCE del gusano cogollero y también sobre diversas funciones biológicas: la deglución, el movimiento del intestino durante la digestión, equilibrio osmótico, control de la ingesta, la ecdisis y la metamorfosis. Por ejemplo, en *D. melanogaster*, la 5HT regula la biosíntesis de la ecdisona, la 20E y otros esteroides en la GP en función de los nutrientes. Las neuronas serotoninérgicas que inervan la GP comparten vías con el sistema nervioso estomatogástrico que responden a los niveles de nutrientes; por lo que, la 5HT regula la plasticidad del desarrollo dependiente de nutrientes a través de la modulación de la biosíntesis de hormonas esteroides en la transición de la larva al adulto (Shimada-Niwa y Niwa, 2014). En otro estudio, se comprobó que el receptor d5HT1b inhibe la actividad de las células productoras de insulina en el GCE de la larva y el adulto de *D. melanogaster*, mientras, que el neuropéptido F y la octopamina las activan (Luo, *et al.*, 2012). La 5HT también está implicada en la modulación de la neurosecreción de PTTH en los CC y CA in vitro de la larva de *B. mori*. Por otro lado, la 5HT bloquea la liberación de PTTH en la pupa de *A. pernyi* mediante la unión con el receptor d5HT1b, manteniendo la diapausa. Cuando aumentan los niveles de melatonina provocan la neurosecreción de PTTH, que se traduce en la emergencia del adulto. Este mecanismo dual de la regulación de la diapausa está regulado por el fotoperiodo (Wang, *et al.*, 2013). Por lo cual, la modificación en los ritmos diario y circadiano podría tener un efecto negativo sobre las referidas vías de señalización de la 5HT.

Sin embargo, en la modulación de la biosíntesis de ecdiesteroides también participan otros neuropéptidos y neurohormonas que tiene mayor sinergia que la señalización de la 5HT; que también, son afectados cuando se aplica la AZA a las estructuras que los contienen o sintetizan. Diversos estudios han dilucidado a los mecanismos y moléculas

específicas afectados por AZA y que están íntimamente relacionados con el crecimiento y desarrollo de los insectos estudiados (Sieber y Rembold, 1983; Mordue (Luntz), *et al.*, 1986; Schlüter, *et al.* 1985; Koul e Isman, 1991; Barnby y Klocke, 1990; Bidmon, 1986; Koul, *et al.*, 1987; Mitchell, *et al.* 1997; Malczewska, *et al.*, 1988; Meurant, *et al.*, 1994). La aplicación de AZA repercute directamente sobre la CC, la CA, la GP y el ganglio frontal; en dichas estructuras provoca degeneración de los núcleos, lo que sugiere efectos directos sobre la replicación, transcripción y traducción, que se refleja a nivel sistémico en las funciones neuroendocrinas (Meurant, *et al.*, 1994). Además, el bloqueo de la AZA sobre los neurotransmisores y hormonas que provienen de las PI y PL repercute sobre el sistema endocrino (Mordue (Luntz), *et al.*, 1986), por ejemplo, repercute sobre la liberación de PTTH en la CC y la GP; dicho efecto se ve posteriormente reflejado en la producción de la enzima 20-ecdisona monooxigenasa, enzima que sintetiza la 20-E que su vez se encarga de formar la nueva cutícula y la ecdisis. Posteriormente, AZA bloquea la liberación de la 20-E en la hemolinfa, en las membranas del mesenteron y el cuerpo graso, la AZA funciona como antagonista de las ecdisonas (Bidmon, 1986; Barnby y Klocke, 1990; Koul, *et al.*, 1987; Koul e Isman, 1991; Mitchell, *et al.*, 1997). También, AZA inhibe la liberación de las alatoestatinas y alatotropinas, que se refleja en la reducción de la síntesis y la baja concentración de la HJ en la CA; dicha hormona es la encargada de promover el crecimiento de los juveniles de los insectos (Malczewska, *et al.*, 1988; Schlüter, *et al.* 1985; Schmutterer, 1991).

Adicionalmente, en algunas especies se ha caracterizado el modo de acción de AZA sobre la quimiorrecepción y la alimentación; la AZA estimula los quimiorreceptores de células disuasorias específicas en las partes bucales y bloquea la activación de células receptoras de carbohidratos (sacarosa) que suelen estimular la alimentación (Barnby y Klocke, 1990; Bidmon, 1986; Senthil-Nathan, 2013; Liner, *et al.*, 1995). El bloqueo inducido por AZA y los demás metabolitos del extracto metanólico empleado podrían estar afectando los receptores de las neuronas postsinápticas y la liberación de la 5HT al espacio sináptico por parte de las neuronas presinápticas en el GCE del gusano cogollero. Por ejemplo, la aplicación de antagonistas de 5HT exógena en el GCE evitó que las abejas distinguieran eficientemente a las toxinas y redujo significativamente a los

músculos de la probóscide (Wright, 2011; French, *et al.*, 2014). En otro estudio, el aumento en la concentración de 5HT provocó una disminución de la fuerza motriz en los músculos motores de la pata de *S. gregaria*; debido al bloqueo de la transmisión sináptica (Hill y Usherwood, 1961). La cantidad de 5HT liberada saturó los receptores y la constante excitación redujo la sensibilidad de la neurona postsináptica (Wu y Cooper, 2012). No obstante, existe otra vía por la cual la AZA puede promover el aumento de la concentración de 5HT, mediante la inactivación de la enzima MAO responsable de la degradación de la noradrenalina y la 5HT. Con base en lo descrito anteriormente es claro que la 5HT participa en algunas vías de señalización del crecimiento y desarrollo de los insectos. Los trabajos existentes han dilucidado que la AZA tiene un efecto negativo sobre las CC, CA, GP y el ganglio frontal, pero este recae principalmente sobre otros neurotransmisores, hormonas y enzimas. La modificación de la concentración de 5HT a lo largo del día, tanto en condiciones de fotoperiodo como en OO, podría verse reflejada en otros procesos, como la alimentación y digestión.

#### **9.4. Oscilaciones de la concentración de 5HT en el tubo digestivo de la larva de *S. frugiperda***

Adicionalmente, se identificaron los ritmos diario y circadiano de la concentración de 5HT en el TD del gusano cogollero. En la condición de LO, se encontró la oscilación que se ajustó significativamente solamente al periodo de 24 horas (ver tabla 10). La acrofase se ubicó durante la escotofase en ZT20 (ver figura 18a) y fue mayor que la acrofase de la oscilación del GCE bajo las mismas condiciones de iluminación (ver figura 16a); asimismo, presentó diferencias significativas con las demás fases a lo largo del día (ver tabla 11). También, la oscilación de la concentración de 5HT del TD bajo OO presentó un ajuste significativo solamente al periodo de 24 horas (ver tabla 12); y mostró diferencias significativas entre la acrofase y las demás fases (ver tabla 13). Tanto en el ritmo diario como en el circadiano se presentaron otras elevaciones de la concentración de 5HT, como se puede ver en las figuras 18a y 19a; pero dichos picos no presentaron diferencias significativas contra las demás fases de cada ritmo (ver tablas 11 y 13), en el ritmo diario se presentó en ZT4 (fotofase) y en el ritmo circadiano se mostró en CT8

(fotofase subjetiva). Por lo tanto, se puede sostener ritmos diario y circadiano unimodales de la concentración de 5HT en el TD de la larva de *S. frugiperda*.

La detección del ritmo diario de la concentración de 5HT en el TD bajo el fotoperíodo LO 12:12 podría coadyuvar la teoría del oscilador dual y el enmascaramiento de la oscilación de 5HT del GCE bajo LO 12:12. Según esta teoría, en condiciones adversas o inusuales para los insectos, se ha visto que las neuronas del oscilador E asumen el papel del marcapasos central e imponen fase a los demás osciladores periféricos cuando las neuronas M se encuentran bajo una presión negativa, que en el caso del presente estudio fue la exposición permanente a la luz debido a los vasos transparentes (Lamba, *et al.* 2014; Lazzari e Insausti, 2008; Kohsaka, *et al.* 2017; Humberg y Sprecher, 2017; Helfrich-Forster, *et al.*, 2011; Tomioka y Matsumoto, 2019). Por lo que se propone que existen otros mecanismos homeostáticos que le permiten seguir funcionando (Hirota y Fukada, 2004; Lamba, *et al.*, 2014; Tomioka y Matsumoto, 2019). De esta forma, las neuronas E del posible oscilador dual del gusano cogollero podrían estar regulando y mediando el efecto de enmascaramiento sobre las neuronas M y por ello es posible observar el ritmo diario significativo de 5HT en el TD bajo el fotoperíodo LO 12:12 (ver tabla 10) y el aumento en la acrofase de 5HT del TD (ver figura 18a) con respecto a la acrofase del GCE (ver figura 17a). También, se ha comprobado que los ritmos unimodales de animales diurnos, como *D. melanogaster*, tienden a presentar otra elevación del porcentaje de actividad locomotora cuando se exponen a más horas de iluminación; cabe aclarar que esto también se ha observado en otras variables biológicas, que incluyen parámetros fisiológicos y neuroendocrinos (Kohsaka, *et al.* 2017; Humberg y Sprecher, 2017). En este estudio, aunque se consideró un fotoperíodo LO 12:12, que es el mismo que se empleó en los estudios de *D. melanogaster*, los vasos transparentes permitieron la exposición continua a la luz. Así se respondería a las elevaciones encontradas en ZT16 en el GCE y ZT4 en el TD (ver figuras 16a y 18a), a parte de las acrofases descritas por Cosinor, como lo observado en el ritmo de actividad locomotora de *D. melanogaster*; sin embargo, dichas elevaciones no fueron diferentes significativamente contra las acrofases y contra las demás fases, por lo que los ritmos diarios del GCE y TD del gusano cogollero no pueden describirse como bimodales. Adicionalmente, cuando los

organismos de *D. melanogaster* son expuestos a OO se suele presentar un ritmo unimodal, que denota que la sincronización entre los osciladores M y E está regida efectivamente por las asas de retroalimentación de la 5HT y el PDF, y los demás mecanismos moleculares de la neuronas reloj (Kohsaka, *et al.* 2017; Humberg y Sprecher, 2017; Baik, *et al.* 2018; Zhang y Emery, 2012; Tomioka y Matsumoto, 2019), lo que puede estar pasando con los resultados obtenidos ya que se encontraron ritmos circadianos unimodales de la concentración de 5HT tanto en el GCE como en el tubo digestivo de *S. frugiperda* (ver figuras 17a y 19a). Igualmente, los estudios en *D. melanogaster* sugieren que las neuronas reloj M y E no están restringidas a ciertas estructuras marcapasos, sino que se encuentran en la toda red neuronal del GCE (Helfrich-Förster, 2009; Tomioka y Matsumoto, 2015; Zhang y Emery, 2012; Tomioka y Matsumoto, 2019; Tataroglu y Emery, 2014). También se sugiere que las NV cumplen con la función del oscilador M, mientras que las neuronas laterales serían el oscilador E (Helfrich-Förster, 2009; Tomioka y Matsumoto, 2015; Zhang y Emery, 2012; Tomioka y Matsumoto, 2019; Tataroglu y Emery, 2014). Para comprobar si esta teoría aplica para el sistema circadiano de *S. frugiperda* se tendrían que realizar otros estudios que incluyan registros de actividad locomotora, ablación de osciladores, aplicación de agonistas y antagonistas de 5HT y otros neurotransmisores importantes en el sistema circadiano de otros insectos; así como la modificación del fotoperíodo. Consecuentemente, realizar este tipo de estudios permitiría observar si en el TD digestivo o en otras estructuras fuera del sistema nervioso central del gusano cogollero existen otros osciladores circadianos y periféricos, o bien, neuronas M y E del oscilador dual.

Asimismo, se observó el aumento en la acrofase de 5HT del TD (ver figura 18a) con respecto a la acrofase del GCE (ver figura 17a) bajo el fotoperíodo LO 12:12, que denota la participación de la 5HT en diversos procesos del sistema nervioso periférico del gusano cogollero, por ejemplo, los movimientos musculares y la alimentación. Tanto la actividad locomotora como la alimentación son dos procesos íntimamente relacionados durante la fase larval y la ninfa que dan lugar al crecimiento y la metamorfosis de los

insectos holometábolos y hemimetábolos (Bernays, 1986; Cohen, *et al.*, 1988; Rachinsky, 1994; Cook y Orchard, 1990). Diversos estudios demuestran que las neuronas serotoninérgicas que inervan el TD provienen del sistema nervioso estomatogástrico o periférico, mientras que las que tienen contacto con las motoneuronas provienen del sistema nervioso central; además, se ha comprobado el papel de la 5-HT como neurohormona a través de la hemolinfa (Awad, *et al.*, 1997; Blenau y Thamm, 2011; Vleugels, *et al.*, 2015; Cantera y Carlberg, 1988; Flanagan, 1984; Gen, *et al.*, 1993; Granger, *et al.*, 1989; Huser, *et al.*, 2017; Luffy y Dorn, 1991; Trumm y Dorn, 2000; Sivasubramanian, 1992; Takeda, *et al.*, 1991; Rachinsky, 1994; Lange, *et al.*, 1988; Cook y Orchard, 1990). Ahora bien, el TD de los insectos se diferencia en tres regiones: el estomodeo, el mesenteron y el proctodeo; en el intestino, la 5HT participa en la regulación de la respuesta inmune, la homeostasis de los electrolitos, la presión osmótica, la circulación (Falibene, *et al.*, 2012; French, *et al.* 2014; Schoofs, *et al.*, 2018; Shimada y Niwa, 2014; Lange, *et al.*, 1988; Coast, 2011). El estomodeo inicia desde la región posterior de la cabeza, desde los órganos mandibulares y maxilares, se extiende a través de la faringe, el esófago y el buche; externamente está rodeado por músculos y se encarga de la masticación, el almacenamiento y la digestión parcial del bolo. También lo integran el proventrículo, encargado de la maceración y la filtración del alimento alimenticio (French, *et al.*, 2014; Falibene, *et al.*, 2012; Cook y Orchard, 1990; Luo, *et al.*, 2012). El mesenteron se diferencia en el ventrículo anterior y posterior, está encargado de la digestión, la actividad enzimática y la absorción nutricional durante el crecimiento y el desarrollo de los insectos (French, *et al.* 2014; Schoofs, *et al.*, 2018; Luo, *et al.*, 2012; Trumm y Dorn, 2000; Granger, *et al.*, 1989; Luffy y Dorn, 1991) El proctodeo está compuesto por el íleo, los túbulos de Malpighi, el colón, el recto y el ano; dichas estructuras excretan el ácido úrico, almacenan vitaminas, regulan la absorción de agua, compresión, excreción y defecación de los residuos alimentarios (Coast, 2011; Staniscuaski, *et al.*, 2010). Tanto en el mesenteron como en el proctodeo la 5HT modula a las neuronas motoras para que se lleve a cabo la peristalsis; pero las neuronas serotoninérgicas provienen de la cadena ganglionar ventral; además la 5HT funciona como neurohormona en algunos procesos que se llevan a cabo en estas regiones del

intestino (Schoofs, *et al.*, 2018; Shimada y Niwa, 2014; Falibene, *et al.*, 2012; Huser, *et al.*, 2017).

### **9.5. Efecto del extracto químico de *A. indica* sobre la oscilación y concentración de 5HT en el tubo digestivo de la larva de *S. frugiperda*.**

Los resultados obtenidos en la presente tesis denotan que la incorporación del extracto metanólico de la semilla del Nim tuvo efectos similares sobre el TD a los que se presentaron en la oscilación y el ritmo circadiano de la concentración de 5HT en el GCE del grupo experimental del fotoperiodo LO 12:12. También, en el ritmo diario del TD del grupo experimental se invirtió la acrofase al inicio de la fotofase en ZT0 con respecto a la acrofase del grupo control que ocurrió en CT20 durante la escotofase (ver figura 18), lo mismo que ocurrió en el ritmo diario del GCE del grupo experimental; sin embargo, la acrofase del GCE (ver figura 16b) fue mayor que la acrofase del TD (ver figura 18b). En la condición de OO, la oscilación del TD del grupo experimental se ajustó significativamente al periodo circadiano de 24 horas (ver tabla 12) y con la prueba estadística aplicada a los datos se obtuvieron diferencias significativas entre las fases (ver tabla 13). Al igual que el ritmo circadiano de 5HT del GCE del grupo experimental (ver figura 17b), la acrofase de 5HT del TD del grupo experimental de ocurrió durante la escotofase subjetiva en CT12 (ver figura 19b), contrario a la acrofase de 5HT del grupo control que ocurrió al inicio de la fotofase subjetiva (ver figura 19a). Además, el patrón mostrado en el TD es muy similar al ritmo circadiano del GCE del grupo experimental, solamente se observan diferencias en el tiempo circadiano de las acrofases, ya que en el TD ocurrió en CT12 y en el GCE fue en CT16; también, la acrofase del TD disminuyó con respecto al GCE del grupo experimental bajo OO.

La disminución en las acrofases de 5HT tanto del ritmo diario como del ritmo circadiano del TD (ver figuras 18b y 19b) con respecto al aumento de las acrofases de 5HT de los ritmo diario y circadiano del GCE (ver figuras 16b y 17b) de los gusanos cogolleros alimentados con DME, podría sustentar la hipótesis del bloqueo producido por AZA en el sistema endocrino del gusano cogollero y otros insectos. Además de lo ya descrito del posible mecanismo del bloqueo, la reducción de la actividad sináptica entre la *PI* y las

CC y CA, y la reducción en la biosíntesis y la degradación de los neurotransmisores (Banerjee y Rembold, 1992; Barnby y Klocke, 1990; Bidmon, 1986; Han y Engleman, 1987; Koul, *et al.*, 1987), Subrahamanyam y Rembold (1989) sostienen que la acumulación de neurotransmisores, neuropéptidos y neurohormonas en el GCE y el sistema neuroendocrino de *L. migratoria* es debido a que la AZA bloquea la neurolema, encargada de restringir la entrada al sistema nervioso de iones y moléculas provenientes de la hemolinfa. También, la AZA puede ingresar al sistema nervioso central a través de los receptores de las ecdisonas, teniendo efectos adversos sobre las vías de señalización de dichas hormonas y los procesos moleculares y celulares (Bidmon, 1986; Barnby y Klocke, 1990; Koul, *et al.*, 1987; Koul e Isman, 1991; Mitchell, *et al.*, 1997). Adicionalmente, Trumm y Dorn (2000) inyectaron AZA en el vientre de *L. migratoria*, al igual que Banerjee y Rembold (1992) y Subrahamanyam y Rembold (1989), obteniendo una reducción de la concentración de 5HT en el mesenteron de la langosta, y consecuentemente, de la tasa de digestión y la ingesta de alimentos. Además, cuando colocaron un mesenteron *in vitro* sin las inervaciones de las neuronas serotoninérgicas y gabaérgicas se detuvo la peristalsis; después, removieron las inervaciones serotoninérgicas y dejaron solamente las conexiones gabaérgicas y se detuvo igualmente el movimiento de los músculos, pero esto no ocurrió cuando quitaron las inervaciones gabaérgicas. Por lo tanto, comprobaron que la 5HT es el neurotransmisor excitatorio de los músculos intestinales, mientras que GABA los inhibe. De igual manera con inmunohistoquímica, notaron que la 5HT se concentró en las terminales sinápticas de las neuronas aferentes del sistema nervioso central. Sin embargo, cuando observaron a las inervaciones serotoninérgicas de la cadena ganglionar no mostraron una concentración masiva de 5HT. Por lo que, el GCE regula la peristalsis mediante la señalización mediada por la 5HT, como los sostienen otras investigaciones (Kohsaka, *et al.*, 2017; Blenau y Thamm, 2011; Vleugels, *et al.*, 2015; Schoofs, *et al.*, 2018). El bloqueo derivado de la incorporación de la AZA a la dieta del gusano cogollero podría repercutir sobre dicha modulación y sobre las vías de señalización reguladas por la 5HT; debido a la alteración de la acrofase, la hora de ocurrencia, el aumento de 5HT en el GCE y la disminución en el TD de los grupos experimentales; igualmente, se podría aseverar que el marcapasos, posible oscilador dual, tiene influencia sobre la biosíntesis de la 5HT, ya

que los patrones observados tanto en los grupos controles como experimentales son muy similares (ver figuras 16, 17, 18 y 19). Y precisamente, la disminución de la acrofase en el TD nos permite inferir que el bloqueo de AZA sobre los sistemas nervioso central y endócrino está afectando la liberación de la 5HT proveniente del GCE y la biosíntesis de la 5HT en el sistema nervioso periférico.

Es preciso agregar que se han encontrado diferencias en diversas especies en la distribución del sistema serotoninérgico sobre el TD (Blenau y Thamm, 2011; Vleugels, *et al.*, 2015; Schoofs, *et al.*, 2018; Granger, *et al.*, 1989; Huser, *et al.*, 2017, Trumm y Dorn, 2000; Wu y Cooper, 2012; Xiong, *et al.*, 2019), por lo que sería primordial realizar trabajos de inmunohistoquímica y caracterizar la función específica de los receptores serotoninérgicos de cada región del sistema digestivo del gusano cogollero. Adicionalmente, existen estudios que demuestran que la 5HT participa en la regulación de las contracciones musculares del buche y la faringe de la abeja *A. mellifera*, la langosta *L. migratoria*, la chinche *R. prolixus*, y la hormiga *Campon mus*, y que la aplicación de serotonina exógena relaja los músculos del estomodeo; no obstante, la excesiva acumulación de la 5HT durante la sinapsis disminuye la excitabilidad de las neuronas motoras (Wu y Cooper, 2012; Fabilene, *et al.*, 2012; Wright, 2011; French, *et al.*, 2014; Cook y Orchard, 1990; Molaei y Lange 2003). Por ejemplo, la aplicación de antagonistas de 5HT al TD completo de la abeja provocó una disminución de la peristalsis y la aplicación de 5HT exógena reactivó los movimientos musculares (French, *et al.*, 2014; Wright, 2011). Por lo que, estos efectos debido al aumento de 5HT podrían estar sucediendo en el gusano cogollero cuando es alimentado con la DME.

Por otra parte, existen registros sobre los efectos necróticos y muerte celular debido a la AZA sobre los tejidos del intestino del gusano cogollero. Railda y colaboradores (2010) suministraron una dieta muy similar a la del estudio de Maredia y colaboradores (1992) y a la que empleó en la presente tesis e incorporaron 0.006, 0.05 y 0.4 ppm de aceite de Nim; consecuentemente, observaron que los efectos fueron dosis-dependientes, la concentración más alta provocó la muerte las larvas. Para las concentraciones de 0.006 y 0.05 ppm se presentaron alargamiento del ciclo de vida y una reducción del peso de las pupas y las larvas, además de una disminución en el tamaño de los adultos.

Histológicamente, demostraron que la concentración de 0.006 ppm modificó el epitelio del mesenteron, observaron la necrosis de células regenerativas y la reducción del revestimiento de la membrana peritrófica, además de la modificación estructural de células calciformes y columnares. En el caso de la concentración de 0.05 ppm, la matriz peritrófica se degradó y se plegó; asimismo, se aplanaron y ondularon las células calciformes y columnares. Mientras que el tubo digestivo de las larvas alimentadas con la dieta con 0.4 ppm de aceite de Nim se adelgazó y redujo su tamaño.

Está claro que el gusano cogollero es una de las plagas más importantes en diversas especies de cultivos, principalmente del maíz (*Z. mays*), en el continente americano; dependiendo del grado de infestación y de la etapa del desarrollo vegetativo de la planta puede llegar a afectar el rendimiento del cultivo hasta un 60, incluso arrasarlo con el 100% (Willink, *et al.*, 1993; Venegas-García, 2016; Murillo, 1991; Fernández, 2002). En muchos países en vías de desarrollo, como México, el control de este organismo es primordial; ya que existen varias particularidades en la agroeconomía de estas naciones: bajos recursos para la adquisición de plaguicidas o semillas, poco conocimiento e innovación para el mejoramiento de los agroecosistemas, una débil infraestructura, etc. (Schmutterer, 1990; OMS, 1990). Además, la FAO (2013) menciona que una de las principales limitantes son los costos elevados de los pesticidas y la toxicidad que ejercen sobre la fauna, la flora, los agroecosistemas y la salud humana. Es primordial diseñar herramientas de control menos costosas y menos dañinas con el ambiente y la salud. Los pesticidas elaborados a partir de extractos químicos de plantas son una alternativa viable a los insecticidas sintéticos en el control de plagas; entre los beneficios que proveen son considerablemente una reducción de la contaminación ambiental debido a su rápida degradación en el ambiente, la disminución de la toxicidad en la salud humana, la conservación de otras especies de insectos no plagas o entomopatógenas de los fitófagos y un bajo costo de producción (Mann y Kaufman, 2012; Hashmat, *et al.*, 2012; Ayil-Gutiérrez, *et al.*, 2018). Diversos estudios demuestran que la aplicación de productos hechos a partir del Nim es una práctica más responsable, eficaz y eficiente que los insecticidas tradicionales (Alonso, 1991; Mikolajczak y Reed, 1987; Gutiérrez, *et al.*, 2010; Ayil-Gutiérrez, *et al.*, 2018; Senthil-Nathan, 2013). En la presente tesis se demostró

que el extracto metanólico hecho con base en la semilla de *A. indica* afectó a los ritmos diario y circadiano de la concentración de 5HT del GCE de la larva de *S. frugiperda*. Sin duda, la alteración de la concentración de 5HT tiene efectos sistémicos y sinérgicos, como se ha visto en otras especies de insectos; por lo que resultaría apremiante la profundización y dilucidación de los sistemas serotoninérgico y circadiano a un nivel celular y molecular.

Considerablemente, este tipo de estudios han permitido el perfeccionamiento en el diseño de otro tipo de herramientas de control (organismos genéticamente modificados, toxinas Cry a partir de *B. thuringiensis*, entre otros) (De Polanía, *et al.*, 2009; Aguirre, *et al.*, 2016; Santos-Amaya, *et al.*, 2017). Además, de que el seguimiento de los estudios a nivel neurofisiológico en el gusano cogollero permitiría identificar el tipo de extracción más oportuna de los metabolitos secundarios de *A. indica*; ya que se ha visto que los efectos de la aplicación de los productos elaborados a partir del Nim difieren mucho entre sí y dependen de la especie de insecto, el tiempo de aplicación, el método de aplicación y la concentración (que depende del tipo de extracción química). También, la efectividad y la eficacia de los extractos están relacionadas con el origen del árbol de Nim, la temperatura y la humedad (Alonso, 1991; Mikolajczak y Reed, 1987; Gutiérrez, *et al.*, 2010; Ayil-Gutiérrez, *et al.*, 2018; Senthil-Nathan, 2013; Mordue y Nisbet, 2000; Maredia, *et al.*, 1992; Mann y Kaufman, 2012).

## 10. CONCLUSIONES

- a) Se demostró que la 5HT está presente en el GCE y el TD de la larva de *S. frugiperda*.
- b) Tanto en el GCE como en el TD se mostró la existencia del ritmo circadiano de la concentración de 5HT.
- c) Mientras que en el TD se encontró un ritmo significativo de la concentración de 5HT bajo el fotoperiodo LO 12:12, contrario a la oscilación no significativa del GCE bajo la misma condición de iluminación. Posiblemente, debido a un enmascaramiento producido por la luz.
- d) La incorporación del extracto metanólico de *A. indica* a la dieta merídica provocó un aumento en la acrofase de la 5HT del GCE bajo OO con respecto a la acrofase de la concentración de 5HT del GCE del grupo control bajo OO.
- e) El extracto metanólico de la semilla de *A. indica* disminuyó las acrofases de la 5HT del TD bajo el fotoperiodo LO 12:12 y OO.
- f) Tanto el objetivo general como los objetivos particulares de la presente tesis se cumplieron satisfactoriamente; corroborando la hipótesis planteada, si bien, la adición del extracto metanólico de *A. indica* no suprimió la expresión del ritmo circadiano de 5HT en el GCE y el TD del gusano cogollero, sí movió las acrofases y la concentración de dicha monomina en estas estructuras. Dicho desfase puede tener repercusiones sistémicas y sinérgicas en diversas funciones biológicas reguladas por la 5HT. Por lo que, la consideración de la inclusión y dilucidación del sistema circadiano y diversas vías de señalización de la 5HT, de esta especie y otras especies plagas, podría apoyar y sustentar al diseño, la innovación, el perfeccionamiento y la generación de nuevas formas de control biológico, considerando las ínfimas y estrechas relaciones que existen dentro de un agroecosistema.

## 11. REFERENCIAS

Aguirre, L. A., Hernández-Juárez, A., Flores, M., Cerna, E., Landeros, J., Frías, G. A. y Harris, M. K. 2016. Evaluation of foliar damage by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically modified corn (Poales: Poaceae) in Mexico. *Entomol.*, 99: 276-280.

Alonso, A. 1991. Reseña histórica y aspectos bioecológicos del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). En: *Memorias Seminario Spodoptera frugiperda (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos*. Zuluaga, J. L. Muñoz, G. (comp., ed.) Calí, Colombia: 12-14.

Arbab, A. I. 2009. On the tidal evolution of the Earth-Moon system: A Cosmological Model. *Prog. Fis.*, 1: 54-58.

Ashley, T. R. 1986. Geographical distributions and parasitization levels for parasitoids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Fla. Entomol.*, 69(3): 516-524.

Awad, E. W., Amiri, M. H. y Stephen R. S. 1997. Developmental changes in biogenic amine levels the central nervous system and the haemolymph of the Eastern death's head hawk moth, *Acherontia styx* (Lepidoptera: Sphingidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 116C (3): 219–225.

Ayil-Gutiérrez, B., Sánchez-Teyer, F. L., Vazquez-Flota, F., Monforte-González, M., Tamayo-Ordóñez, Y., Tamayo-Ordóñez, C. M. y Rivera G. 2018. Biological effects of natural products against *Spodoptera spp.* *Crop Prot.*, 114:195-207.

Baik, L. S., Recinos, Y., Chevez, J. A. y Holmes, T. C. 2018. Circadian modulation of light-evoked avoidance/attraction behavior in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 13(8): e0201927. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201927>

Banerjee, S. y H. Rembold. 1992. Azadirachtin A interfere with control of serotonin pools in the neuroendocrine system of locusts. *Sci. Nat.*, 79: 81-84.

Barnby, M. A. y Klocke, J. A. 1990. Effects of azadirachtin on levels of ecdysteroids and prothoracicotropic hormone-like activity in *Heliothis virescens* (Fabr.) larvae. *J. Insect Physiol.*, 36(2): 125–131.

Bell-Pedersen, D., Cassone, M. V., Earnest, J. D., Golden, S. S., Hardin, E. P., Thomas, T. L. y Zoran J. M. 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Drug Discov.*, doi:10.1038/nrd1633

Bernays, E. A. 1986. Evolutionary contrasts in insects: nutritional advantages of holometabolous development. *Physiol. Entomol.*, 11: 377–382.

Bidmon, H. J. 1986. Ultrastructural changes of the prothorax glands of intreated and with azadirachtin treated *Manduca sexta* larvae (Lepidoptera, Spingidae). *Entomol. Gen.*, 12: 1-17.

Blenau, W. Baumann, A. 2001. Molecular and Pharmacological Properties of Insect Biogenic Amine Receptors: lessons From *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 48: 13-38.

Blenau, W. y Thamm, M. 2011. Distribution of serotonin (5-HT) and its receptors in the insect brain with focus on the mushroom bodies. Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arthropod. Struct. Dev.*, 40(5): 381–394.

Bloch, G., Hazan, E. y Rafaeli, A. 2013. Circadian rhythms and endocrine functions in adult insects. *J. Insect Physiol.*, 59(1): 56–69.

Brahmachari, G. 2004. Neem-An Omnipotent Plant: A Retrospection. *Chem. Bio. Chem.*, 5:408-421.

Cantera, R. y Carlberg, M. 1988. Serotonin levels in the central nervous system of the blowfly *Calliphora erythrocephala* during post-embryonic development. *Insect Biochem.*, 18: 507-509.

Capinera, J. L. 1999. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida*, EENY-98: 9.

Cardinali, D. P. y Bernasconi, S. A. P. 2009. Ritmos biológicos en neuroendocrinología. *SAEGRE*, 16(3): 5-25.

Cardinali, D. P., Jordá, M. P. y Sánchez-Barceló, E. J. 1994. Introducción a la cronobiología: fisiología de los ritmos biológicos. Universidad de Cantabria.

Carpenter, J. E., Young, J. R. y Sparks, A. N. 1986. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): Comparison of inherited deleterious effects in progeny from irradiated males and females. *J. Econ. Entomol.*, 79: 46-49.

Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E. 2010. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.*, 69 (3-4): 209-231, 2010

Castañon, O., Batelle, B. y Fanjul-Moles. 1999. Rhythmic changes in the serotonin content of the brain and eyestalk of crayfish during development. *J. Exp. Biol.*, 202: 2823-2830.

Cermakian, N. y Sassone-Corsi, P. 2000. Multilevel regulation of the circadian clock. *En Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1: 59-67.

Chacón, C. Y., Garita-Rojas, C., Vlagio-Cedeño, C. y Villalba-Velásquez, V. 2009. Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del *maíz* *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como posible hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola. *Tecnol. Marcha*, 22(4): 28-37.

Coast, G. 2011. Serotonin has kinin-like activity in stimulating secretion by Malpighian tubules of the house cricket *Acheta domesticus*. *Peptides*, 32: 500-508.

Cohen, R. W., Friedman, S. y Waldbauer, G. P. 1988. Physiological control of nutrient self-selection in *Heliothis zea* larvae: The role of serotonin. *J. Insect Physiol.*, 34(10), 935–940.

CONABIO. 2019. En: <http://conabio.inaturalist.org/taxa/319135-Azadirachta-indica>

Cook, H. y Orchard, I. 1990. Effects of 5, 7DHT upon feeding and serotonin content of various tissues in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, 36(5): 361-367.

Cornelissen, G. 2014. Cosinor-based rhythmometry. *Theor. Biol. Med. Model.*, 11(16): 2-24.

Cymborowski, B. 1970. The assumed participation of 5-hydroxytryptamine in regulation of the circadian rhythm of locomotor activity in *Acheta Domesticus* L. *Comp. Gen. Pharmacol.*, 1(3): 316–322.

Cymborowski, B. 1998. Serotonin modulates a photic response in circadian locomotor rhythmicity of adults of the blow fly, *Calliphora vicina*. *Physiol. Entomol.*, 23: 25-32.

De Polanía, I. Z., Arévalo-Maldonado, H. A., Mejía-Cruz, R. y Díaz-Sánchez, J. L. 2009. *Spodoptera frugiperda*: respuesta de distintas poblaciones a la toxina Cry1Ab. *Rev. Colomb. Entomol.*, 35(1), 34-41

Escandón, J. 1994. Ritmos biológicos. *Ciencias*, (35): 69-74.

Estrada, J. 2004. *Pastos y forrajes para el trópico colombiano*. Universidad de Caldas, Manizales – Colombia, 506pp.

Falibene, A., Rössler, W. y Josens, R. 2012. Serotonin depresses feeding behaviour in ants. *J. Insect Physiol.*, 58: 7-17.

Fernández, J. L. 2002. Nota corta: Estimación de umbrales económicos para *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo del maíz. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.*, 17(3): 468-474.

Flanagan, T. 1984. Cytological Evidence for Serotonin-Containing Fibers in an Abdominal Neurohemal Organ in a Hemipteran. *Brain Res.*, 306: 235-242.

Fowler, J. D., Goodnight, J. C. y Labrie M. M. 1972. Circadian rhythms of 5-hydroxytryptamine (serotonin) production in larvae, pupae and adults of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 65(1): 138-141.

French, S. A., Simcock, L. K., Rolke, D., Gartside, E. S., Blenau, W. y Wright, A. G. 2014. The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee. *J. Insect Physiol.*, 61: 8-15.

Fuji, K y Takeda, N. 1988. Phylogenetic detection of serotonin immunoreactive cells in the central nervous system of invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89C(2): 233-239.

Gatellier, L., Nagao, T. y Kanzaki, R. 2004. Serotonin modifies the sensitivity of the male silkworm to pheromone. *J. Exp. Biol.*, 207: 2487-2496.

Gen, C., Sparks, T. C., Skomp, J. R., Gajewski, R. P. 1993. Biogenic amines in the brain of *Manduca sexta* during larval-pupal metamorphosis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106C: 275-284.

Goto, S. 2013. Roles of circadian clock genes in insect photoperiodism. *Entomol. Sci.*, 16: 1–16.

Granger, A. N., Homberg, U., Henderson, P., Towle, A. y Lauder, M. J. 1989. Serotonin-immunoreactive neurons in the brain of *Manduca sexta* during larval development and larval-pupal metamorphosis. *J. Devl. Neuroscience*, 7(1): 55-72.

Groot, A. T. 2014. Circadian rhythms of sexual activities in moths: a review. *Front. Ecol. Evol.*, 2: 1-21.

Gutiérrez-García, S. C. Sánchez-Escudero, J., Pérez-Domínguez, J. F., Carballo-Carballo, J., Bergvinson, D. y Aguilera-Peña, M. M. 2010. Efecto del Nim en el daño ocasionado por el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en tres variables agronómicas de maíz resistente y susceptible. *Acta Zool. Mex.*, 26(1): 1-16.

Hamilton, A. R., Shpigler, H., Bloch, G., Wheeler, D. E. y Robinson, G. E. 2017. Endocrine Influences on Insect Societies. *Hormones, Brain and Behavior*, 421–451.

Han, S. y Englemann, W. 1987. Azadirachtin affects the circadian rhythm of locomotion in *Leucophaea maderae*. *J. interdiscipl. Cycle Res.*, 20: 71-79.

Hänniger, S. Dumas, P. Schöfl, G. Gebauer-Jung, S. Vogel, H. Unbehend, M. Heckel, D.G. y Groot, A.T. 2017. Genetic basis of allochronic differentiation in the fall armyworm. *BMC. Evol. Biol.* 17: 68.

Harzach, S. 2004. Phylogenetic comparison of serotonin-immunoreactive neurons in representatives of the chilopoda, diplopoda, and chelicerata: implications for arthropod relationships. *J. Morphol.*, 259: 198-213.

Hashmat, I., Azad, H. y Ahmed, A. 2012. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) - A Nature's Drugstore: An overview. *Int. J. Biol. Sci.*, 1(6): 76-79.

Helfrich-Forster, C. 2009. Does the morning and evening oscillator model fit better for flies or mice? *J. Biol. Rhythms*, 24(4): 259-270.

Helfrich-Forster, C., Nitabach, N. M. y Holmes, C. T. 2011. Insect circadian clock outputs. *Essays Biochem.*, 49: 87-101.

Hill, RB. y Usherwood, PN. 1961. The action of 5-hydroxytryptamine and related compounds on neuromuscular transmission in the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Physiol.* 157: 393-401.

Hirota, T. y Fukada, Y. 2004. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog Sci.*, 21:359–368.

Homberg, U. y Hildebrand, J. G. 1989. Serotonin immunoreactivity in the optic lobes of the sphinx moth *Manduca sexta* and colocalization with FMRFamide and SCPB immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.*, 288(2): 243–253.

Huang, F., Qureshi, J. A., Meagher Jr., R. L., Reisig, D. D., Head, G. P., Andow, D. A., Kerns, X. D., Buntin, G. D., Niu, Y., Yang, F. y Danga, V. 2014. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. *PLoS One*, 9 (11): e112958.

Humberg, T-H y Sprecher S. G. 2017. Age-and wavelength-dependency of *Drosophila* larval phototaxis and behavioral response to natural lighting conditions. *Front. Behav. Neurosci.*, 11:66, doi: 10.3389/fnbeh.2017.00066.

Huser, A., Eschment, M., Güllü, N., Collins, K. A. N., Böpple, K., Pankevych, L., Rolsing, E. y Thum, A. S. 2017. Anatomy and behavioral function of serotonin receptors in *Drosophila melanogaster* larvae. *PLoS ONE*, 12(8): e0181865. doi.org/10.1371/journal.pone.0181865

Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J. D., Boyan, G., Hartenstein, V. y Vosshall, L. B. 2014. A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, 81: 755–765.

Jagota, A. y Habibulla, M. 1992. The frontal ganglionic system: cauterization effects on serotonin circadian rhythms of the cockroach *corpura allata* and *corpura cardiaca*. *Biochem. Molec. Biol.* 22 (7): 747-755.

Kohsaka, H., Guertin, P. A. y Nose, A. 2017. Neural circuits underlying fly larval locomotion. *Curr. Pharm. Des.*, 23: 1722-1733.

Koul, O. e Isman, M. B. 1991. Effects of azadirachtin on the dietary utilization and development of the variegated cutworm, *Peridroma saucia*. *J. Insect Physiol.*, 37: 591–598.

Koul, O., Amanai, K. y Ohtaki, T. 1987. Effect of azadirachtin on the endocrine events of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 33(2): 103-108.

Kyriacou, P. C. 2009. Clocks, cryptochromes and Monarch migrations. *J. Biol.*, 8(55): doi:10.1186/jbiol153.

Lamba, P., Bilodeau-Wentworth, D., Emery, P. y Zhang, Y. 2014. Morning and evening oscillators cooperate to reset circadian behavior in response to light input. *Cell Rep.*, 7(3): 601-608.

Lange, A. B., Orchard, I. e Lloyd, R. J. 1988. Immunohistochemical and electrochemical detection of serotonin in the nervous tissue of the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *Archs Insect Biochem. Physiol.*, 8: 187-201.

Lazzari, C. y Insausti, T. 2008. Circadian rhythms in insects. En: *Comparative Aspects of Circadian Rhythms*. 37 (1): 1-17.

Lesniak, W. G., Jyoti, A., Mishra, M. K., Louissaint, N., Romero, R., Chugani, D. C. y Kannan, R. M. 2013. Concurrent quantification of tryptophan and its major metabolites. *Anal. Biochem.*, 443(2): 222–231.

Liner, L., Vanloon, J. J. A. y Schoonhoven L.M. 1995. Behavioural and sensory responses to some neem compounds by *Pieris brassicae* larvae. *Physiol. Entomol.*, 20: 134–140.

Luffy, D. y Dorn A. 1991. Serotonergic elements in the stomatogastric nervous system of the stick insect, *Carausius morosus*, demonstrated by immunohistochemistry. *J. Insect Physiol.*, 37 (4): 269-275, 277-278.

Luginbill, P. 1928. The fall armyworm. En: *U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. 34*. Gov. Print. Office, Wash., D.C. 1-51.

Luo, J., Becnel, J., Nichols, C. D. y Nässel, D. R. 2012. Insulin-producing cells in the brain of adult *Drosophila* are regulated by the serotonin 5-HT1A receptor. *Cell. Mol. Life Sci.*, 69(3): 471-484.

Malczewska, M. y Gelman, D. B. B. 1988. Effect of azadirachtin on development, juvenile hormone and ecdysteroid titres in chilled *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol.*, 34: 725-732.

Mann, R. S. y Kaufman, P. E. 2012. Natural Product Pesticides: Their Development, Delivery and Use Against Insect Vectors. *Mini. Rev. Org. Chem.*, 9: 185:202.

Maredia, K. M, Segura, O. L. y Mihm, J. A. 1992. Effects of neem, *Azadirachta indica* on six species of maize insect pests. *Trop. Pest Manag.*, 38(2): 190-195.

Matsui, T. 2009. The *pars intercerebralis* as a modulator of locomotor rhythms and feeding in the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Physiol. Behav.* 23; 96 (4-5): 548-56.

Meagher, R. L. y Nagoshi, R. N. 2004. Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in southern Florida. *Ecol. Entomol.*, 29:614-620.

Meneses-Carbonell, R., Gutiérrez-Yanis, A., García-Rubial, A., Antigua-Pereiro, G., Gómez-Sousa, J., Correa-Victoria, F. y Lee, C. 2001. Guía para el trabajo de campo en el manejo integrado de plagas del arroz. Instituto de Investigaciones del Arroz de Cuba (IIA), Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego (FLAR), Centro Internacional de Agricultura Tropical (Ciat), Colombia. 71.

Meurant, K., Sernia, C. y Rembold, H. 1994. The effects of azadirachtin A on the morphology of the ring complex of *Lucilia cuprina* (Wied) larvae. *Cell Tissue Res.*, 275: 247-254.

Mihm, J. A. 1983. Techniques for efficient mass rearing and infestation of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, for host plant resistance studies. Technical Bulletin. CIMMYT, México. 1-16.

Mikolajczak, K. L. y Reed, D. K. 1987. Extractives of seeds of the Meliaceae: Effects on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach. *J. Chem. Ecol.*, 13(1): 99-111.

Miranda-Anaya, M., Guevara-Fefer, P. y Garcia-Rivera, B. E. 2002. Circadian locomotor activity in the larva and adult fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae): Effect of feeding with the resistant variety of maize CML67. *Biol. Rhythm Res.*, 33:475–486.

Mitchell, M. J., Smith, S.L., Johnson, S. y Morgan, E. D. 1997. Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on 20-monooxygenase activity. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 35: 199-209.

Molai, G. y Lange, A. B. 2003. The association of serotonin with the alimentary canal of the African migratory locust, *Locusta migratoria*: distribution, physiology and pharmacological profile. *J. Insect Physiol.*, 49: 1073-1082.

Mordue, A. J. (Luntz), Evans, K. A. y Charlet. 1986. Azadirachtin, Ecdysteroids and Ecdysis in *Locusta migratoria*. *Comp. Biochem, Physiol.*, 29: 523-527.

Mordue, A. J. y Nisbet, A. J. 2000. Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 29 (4): 615-632.

Morillo, F. y Notz, A. 2001. Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidade) a lambdacihalotrina y metomil. En *Bol. Entomol. Venez.*, 16(2): 79-87.

Murillo, A. 1991. Distribución, importancia y manejo del complejo *Spodoptera* en Colombia. En: *Memorias Seminario Spodoptera frugiperda (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos*. Zuluaga, J. L. Muñoz, G. (comp., ed.) Cali, Colombia: 15-23.

Muzynska, M. y Cymborowski, B. 1978. The role of serotonin in regulation of the circadian rhythms of locomotor activity in the cricket (*Acheta domesticus* L.) I. Circadian variations

in serotonin concentration in the brain and hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 59 (1): 13-15.

Nagoshi, R. N. y Meagher, R. L. 2008. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. *FL Entomol.*, 91:546-554.

Nascimento, A. R. B. D., Farias, J. R., Bernardi, D., Horiniusshi, R. J. y Omoto, C. 2016. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. *Pest Manag. Sci.*, 72(4): 810–815.

Nässel, D. 1988. Serotonin and serotonin-immunoreactive neurons in the nervous system of insects. *Prog. Neurobiol.*, 30(1): 1–85.

Nässel, D. R. y Elekes, K. 1985. Serotonergic terminals in the neural sheath of the blowfly nervous system: Electron microscopical immunocytochemistry and 5,7-Dihydroxytryptamine labelling. *Neuroscience*, 15(1): 293–307.

Neckameyer, W. S. y Leal, S. M. 2009. Biogenic Amines as Circulating Hormones in Insects. En: *Hormones, Brain and Behavior*, 967–1003.

Neckameyer, W. S. y Leal, S. M. 2017. Diverse Functions of Insect Biogenic Amines as Neurotransmitters, Neuromodulators, and Neurohormones. En: *Hormones, Brain and Behavior*, 367–401.

NEEMFOUNDATION. 2019. <http://www.neemfoundation.org/about-neem/introduction-to-neem-tree/#prettyPhoto>

Nishinokubi, I. y Tomioka, K. 2000. Analysis of the mechanism underlying the rhythm reversal from diurnal to nocturnal in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, with special reference to the role of serotonin. *Zool. Sci.*, 17: 1075-1080.

Nitabach, N. M. y Taghert, H. P. 2008. Organization of the *Drosophila* circadian control circuit. *Curr. Biol.*, 18: R84-R93.

Ogbuewu, I.P., Odoemenam, V.U., Obikaonu, H.O., Opara, M.N., Emenalom, O.O., Uchegbu, M.C., Okoli, I.C., Esonu, B. O. y Iloeje, M.U. 2011. The Growing Importance of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in Agriculture, Industry, Medicine and Environment: A Review. *J. Med. Plant. Res.*, 5(3): 230-245.

OMS. 1990. Plaguicidas. En *Informe Técnico No. 12*. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.

Pandey, A. y Habibulla, M. 1982. Circadian rhythms of serotonin and the electrical activity of the frontal ganglion of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Experientia*, 38: 946-948.

Pannuti, L. E. R., Baldin, E. L. L, Hunt, E. T. y Paula-Moraes, L. S. 2015. On-plant larval movement and feeding behavior of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on reproductive corn stages. *Environ. Entomol.*, 9. doi: 10.1093/ee/nvv159.

Peairs, F.B. y Saunders, J. L. 1979. The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), a review. *CEIBA*, 23: 93-113.

Pelagio-Flores, R., Ortíz-Castro, R., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L. y López-Bucio, J. 2011. Serotonin, a Tryptophan-Derived Signal Conserved in Plants and Animals, Regulates Root System Architecture Probably Acting as a Natural Auxin Inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 52(3): 490-508.

Pennington, T. D. 2004. Meliaceae. En: Smith, N., Mori, S.A., Henderson, A., Stevenson, D.W. & Heald, S.V. (eds.), *Flowering Plants of the Neotropics*, pp. 243-246. Princeton Univ. Press, Princeton.

Piedra, F. 1974. Effect of different forage diets on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lep: Noctuidae). *Cuban. J. Agric. Sci. (English Ed.)*, 8: 99-103.

Qi, Y., Jin, M., Ni, X., Ye, G., Lee, Y. y Huang, J. 2017. Characterization of three serotonin receptors from the small white butterfly, *Pieris rapae*. *En Insect Biochem. Mol. Biol.*, 87: 107–116.

Qian, y., Cao, Y., Deng, B., Yang, G., Li, J., Xu, R., Zhang, D., Huang, J, y Rao Yi. 2017. Sleep homeostasis regulated by 5HT2b receptor in a small subset of neurons in the dorsal fan-shaped body of *Drosophila*. *eLife* 2, 6: e26519.

Rachinsky, A. 1994. Octopamine and serotonin influence *corpora allata* activity in honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *J. Insect Physiol.*, 40(7):549-554.

Raffa, K. 1987. Influence of host plant on deterrence by azadirachtin of feeding by fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *J. econ. Ent.*, 80: 384-387.

Railda, R. A., Dourado, M. D., Matias, R., Porto, A. R. K, Bednaski, V. A. y Da Costa, B. R. 2010. The effect of sub-lethal doses of *Azadirachta indica* (Meliaceae) oil on the midgut of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Rev. Bras. entomol.*, 54(3): 505–510.

Range, S., Oeh, U., Lorenz, W. M., Etzel, W., Nauen, R. y Hoffmann, H. K. 2002. Juvenile hormone biosynthesis in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 132:192-202.

Reppert, M. S., Gegear, J. R. y Merlin, C. 2010. Navigation mechanisms of migrating monarch butterflies. *Trends Neurosci.*, 33: 399-406.

Rietveld, W. J., Minors, D. S. y Waterhouse, J. M. 1993. Circadian Rhythms and Masking: An Overview. *Chronobiol Int.*, 10(4): 306–312.

Rodrigo, G., Carrera, J. y Jaramillo, A. 2007. Evolutionary mechanisms of circadian clocks. *Cent. Eur. J. Biol.*, 2(2): 233-253.

Rodríguez-Moncalvo, G. V. y Campos R. A. 2009. Role of serotonergic neurons in the *Drosophila* larval response to light. *BMC Neuroscience*, 10:66 doi:10.1186/1471-2202-10-66.

Rodríguez-Muñoz, M. P. 2014. Variaciones diarias en las cantidades de glía en el acocil adulto *Procambarus clarkii*. Tesis de Licenciatura, UNAM.

Roenneberg, T. y Merrow M. 2002. Life before the Clock: Modeling Circadian Evolution. *J. Biol. Rhythms.*, 17(6): 495-505.

Saifullah, A. S. M y Tomioka K. 2002. Serotonin sets the day state in the neurons that control coupling between the optic lobe circadian pacemakers in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *The J. Exp. Biol.*, 205: 1305-1314.

Saifullah, A. S. M. y Tomioka, K. 2002. Serotonin sets the day state in the neurons that control coupling between the optic lobe circadian pacemakers in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.*, 205: 1305–1314.

Salazar-Juárez, A., Parra-Gómez, L., Barbosa-Méndez, S., Left, P. y Antón, B. 2006. Enmascaramiento. Un tipo de sincronización. Primera Parte. *Salud Ment. (Mex)*, 29(6): 39-47.

Santos-Amaya, O. F., Tavares, C. S., Rodrigues, J. V. C., Campos, S. O., Guedes, R. N. C., Alves, A. P. y Pereira, E. J. G. 2017. Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. *Pest Manag. Sci.*, 73(1): 35–43.

Saunders, D. S. 2002. *Insect Clock's*. 3a ed. Elsevier, Amsterdam.

Schluter, U., Bidmon, H. J. y Grewe, S. 1985. Azadirachtin affects growth and endocrine events in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.*, 31: 773-777.

Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol.*, 35: 271-297.

Schoofs, A., Hückesfeld, S. y Pankratz, M. J. 2018. Serotonergic network in the subesophageal zone modulates the motor pattern for food intake in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.*, 106:36–46.

Senthil-Nathan, S. 2013. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Front. Physiol.*, 4: 1-17. doi:10.3389/fphys.2013.00359.

Shimada-Niwa, Y. y Niwa, R. 2014. Serotonin neurons respond to nutrients and regulate the timing of steroid hormone biosynthesis in *Drosophila*. *Nat. Commun.*, 5: 5778.

Sieber, K.P. y Rembold, H. 1983. The effects of azadirachtin on the endocrine control of moulting in *Locusta migratoria*. *J. insect Physiol.*, 29: 523-527.

Sifuentes, J. A. 1976. Plagas del maíz en México. En *INIA-SAG. Folleto Divulgativo*, 13: 18-21.

Sitaraman, D., Zars, M., Laferriere, H., Chen, Y. C., Sable-Smith, A., Kitamoto, T., Rottinghaus, G.E., Zars, T. 2008. Serotonin Is Necessary for Place Memory in *Drosophila*. *PNAS*, 105 (14): 5579-5584.

Sivasubramanian, P. 1992. Serotonin-immunoreactive neurons in the ventral nerve cord of the larva of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 101(3): 513–518.

Smietanko, A. y Englemann, W. 1989. Splitting of circadian rhythms of *Musca domestica* with azadirachtin. *J. interdiscipl. Cycle Res.*, 20: 71-79.

Sosa, M. 2002. Daño por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz bajo siembra directa en diferentes épocas en el noreste santafesino. Tomado de la red: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2002/05-Agrarias/A-061.pdf>

Spielman, J. S., Kumar, K. y Wilke, O. C. 2015. Comprehensive, structurally-informed alignment and phylogeny of vertebrate biogenic amine receptors. *PeerJ* 3:e773: DOI 10.7717/peerj.773.

Staniscuaski, F., Brugge, V. T., Carlini, C. R. y Orchard, I. 2010. Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut. *J. insect Physiol.*, 56: 1078-1086.

Subrahmanyam, B. y Rembold, H. 1989. Effect of azadirachtin A on neuroendocrine activity in *Locusta migratoria*. *Cell Tissue Res.*, 256(3).

Takeda, N., Takaoka, H., Shimizu, T., Yazawa, M. y Yagi, S. 1991. Biogenic amine levels in the central nervous system and haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 667-682.

Tataroglu, O. y Emery, P. 2014. Studying circadian rhythms in *Drosophila melanogaster*. *Methods*, 68: 140-150.

Tauber, E. y Kyriacou, B. P. 2001. Insect Photoperiodism and Circadian Clocks: Models and Mechanisms. *J. Biol. Rhythms.*, 16(4), 381–390.

Tauber, E. y Panayiotis B. 2001. Insect Photoperiodism and Circadian Clocks: Models and Mechanisms. *J. Biol. Rhythms.*, 381.

Tomioka, K. 1999. Light and serotonin phase-shift the circadian clock in the cricket optic lobe in vitro. *J. Comp. Physiol. A*, 185: 437–444.

Tomioka, K. y Matsumoto, A. 2015. Circadian molecular clockworks in non-model insects. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 7:58-64.

Tomioka, K. y Matsumoto, A. 2019. The circadian system in insects: cellular, molecular, and functional organization. *Adv. In Insect Phys.*, doi.org/10.1016/bs.aiip.2019.01.001.

Tomioka, K., Ikeda, M., Nagao, T. y Tamotsu, S. 1993. Involvement of serotonin in the circadian rhythm of an insect visual system. *Naturwissenschaften*, 80(3): 137–139.

Trujillo, R. P. A., Zapata, R. L. N, Hoyos, S. R. A., Yepes, R. F. C., Capataz, T. J. y Orozco Sánchez. 2008. Determinación de la DL<sub>50</sub> y TL<sub>50</sub> de extractos etanólicos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín*, 61 (2): 4564-4575.

Trumm, P. y Dorn, A. 2000. Effects of azadirachtin on the regulation of midgut peristalsis by the stomatogastric nervous system in *Locusta migratoria*. *Phytoparasitica*, 28(1), 7–26.

Vafopoulou, X., Hindley-Smith, M. y Steel, C. G. H. 2018. Neuropeptide- and serotonin-cells in the brain of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) associated with the circadian clock. *Gen. Comp. Endocrinol.* doi:10.1016/j.ygcen.2018.07.012

Varela R., Carlos W. 2010. La familia Meliaceae en los herbarios de Venezuela. Clave para los géneros venezolanos. *Acta Bot. Venez.*, 33(1): 137-150.

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

Venegas-García, M. R. S. 2016. En 21° Encuentro Nacional sobre Desarrollo Regional en México. Mérida, Yucatán del 15 al 18 de noviembre de 2016. AMECIDER – ITM.

Villa-Castorena, M. M. y Catalán-Valencia E. A. 2004. Determining the larval instars of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) for a predictive model. *Folia Entomol. Mex.*, 43(3): 307-312.

Vleugels, R., Verlinden, H. y Broeck, V. J. 2015. Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. *Neurotransmitter*, 2: e314. doi: 10.14800/nt.314.

Wang, Q., Mohamed, A. A. M. y Takeda, M. 2013. Serotonin Receptor B May Lock the Gate of PTTH Release/Synthesis in the Chinese Silk Moth, *Antheraea pernyi*; A Diapause Initiation/Maintenance Mechanism? *PLoS ONE*, 8(11): e79381.

Williams, E. G. 2000. Geological constrains on the precambian history of the earth's rotation and the moon's orbit. *Rev. Geophys.*, 38(1):37-59.

Willink, E., Osoreo, V. M. y Costilla, M. A. 1993. Daños, pérdidas y niveles de daño económico por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. *Rev. Ind. y Agric. de T. mucumán*, 70(1-2): 49-52.

Wright, G. A. 2011. The role of dopamine and serotonin in conditioned food aversion learning in the honeybee. *Commun. Integr. Biol.*, 4(3): 318-320.

Wu, W. H. y Cooper, L. R. 2012. Serotonin and Synaptic Transmission at Invertebrate Neuromuscular Junctions. *Exp. Neurobiol.* 21(3):101-112.

Xiong, R., Zhao, W., Chen, X., Li, T., Li, H., Li, Y., Shen, W. y Chen, P. 2019. Pharmacological characterization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor of *Bombyx mori* and its role in locomotion. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 231: 56-65.

Yu, S. J. 1991. Insecticide resistance in the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pest. Biochem. Physiol.*, 39: 84-91.

Yuan, Q., Joiner, W.J. y Sehgal, A. 2006. A sleep-promoting role for the *Drosophila* serotonin receptor 1A. *Curr. Biol.*, 16: 1051-1062.

Yuan, Q., Lin, F., Zheng, X. y Sehgal, A. 2005. Serotonin Modulates Circadian Entrainment in *Drosophila*. *Neuron*, 47(1): 115–127.

Zhang, Y. y Emery, P. 2012. Molecular and Neural Control of Insect Circadian Rhythms. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 513–551.

Zhu, H., Sauman, I., Yuan, Q., Casselman, A., Emery-Le, M., Emery, P. y Reppert, M. S. 2008. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biol.*, 6(1): e4. doi:10.1371/journal.pbio.0060004.

Zordan, A. M. y Sandrelli, F. 2015. Circadian clock dysfunction and psychiatric disease: could fruit flies have a say? *Front. Neurol.*, 6(80): doi: 10.3389/fneur.2015.00080.