



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

VARIACIONES EN LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA  
HIF-1 $\alpha$  EN EL GANGLIO CEREBROIDE DEL ACOCIL  
*Procambarus clarkii* (DECAPODA: CAMBARIDAE).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:

CÉSAR IVÁN LÓPEZ BECERRIL

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.



2021



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.

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE  
Directora General  
Dirección General de Administración Escolar  
Presente

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

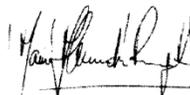
**Variaciones en la concentración de la proteína HIF-1 $\alpha$  en el ganglio cerebroide del acocil *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae)**

realizado por **César Iván López Becerril** con número de cuenta **310138022** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietaria Dra. Marlen Valdés Fuentes



Propietaria Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre



Propietaria Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal  
Tutora



Suplente Dra. Bianca Julieta Vizcarra Chacón



Suplente M. en C. Gabina Arenas López



Atentamente

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 17 DE MAYO DE 2021

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología y Ritmos Biológicos de la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal.

#### Agradecimientos:

La realización de esta tesis fue posible gracias al apoyo técnico de:

1. M. en C. Gabina Arenas López, Biól. Bismark Vázquez Almazán y Dr. Salvador Leonardo Hernández López, del Laboratorio de Electrofisiología de la Facultad de Medicina, UNAM.
2. Dr. Mauricio Castañón Arreola de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, plantel Del Valle.
3. Físico César Oliver Lara Figueroa del Laboratorio Nacional de Canalopatías, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

## Agradecimientos

Quiero agradecer a la Dra. Elsa por la comprensión y todo el apoyo que me brindó durante mi estancia en el laboratorio. A la Dra. Mary Carmen por mostrarme el mundo de la cronobiología. A mis profesores del taller: Dr. Manuel, Dra. Pilar, Dra. Cinthia, Maestro Enrique, Biólogo Martín.

A las sinodales Dra. Marlen Váldez Fuentes, Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre, Dra. Bianca Julieta Vizcarra Chacón, M. en C. Gabina Arenas López y Dra. Elsa G. Escamilla Chimal, por la dedicación al sugerir, corregir y revisar los tópicos plasmados en este escrito.

A mis compañeros y amigos que estuvieron conmigo durante toda la carrera: Aido, Iselol, Marina, E Levin, Auda; con mención especial para estos dos: Warianita y Juan, gracias por todas las salidas extracurriculares; y por supuesto a Griz, gracias por los productos de matcha para aliviar las penas.

A los amigos primera gen (cuando ingrese al lab): Erick, Fercho, Gaby, Fermín, Nancy, Rosy, Rosaura y en especial a Mary Paz, gracias por escucharme y apoyarme en mi estancia en el lab y fuera de él. También a Doña Paty, gracias por cuidar tanto de mí como de los acociles.

A mis compas del BAE: Roberto, Jesús, Mariana, Dulce y Pitha, por su retroalimentación en las expos del taller y por las clases.

Agradezco las enseñanzas y buenos momentos en el Laboratorio de Electrofisiología, gracias Gaby.

A los amigos segunda gen del lab: Silvia, Susana, Alan. Me la pasé increíble con ustedes montando sus protocolos en clave de sol. También a los circamikos: Garbanzo, Luis, Sofi, Naye y Nat, gracias por las tardeadas. Y obviamente a Chavita, gracias por llevarme a Monterrey.

Por último, agradezco a la vida por darme una excelente familia: gracias a mis tías, tíos, abuelitos, primos y a mi mamá (gracias por todo), ya que sin su apoyo no hubiera podido conocer todo esto que se llama vida universitaria. Y claro, agradecer a la UNAM por convertirse en mi hogar.

*Así que te vas y hay un impulso de mirar atrás, de mirar atrás sólo una vez mientras se extingue el crepúsculo para ver ese severo horizonte por última vez (...) pero tal vez no sea buena idea mirar atrás; así lo dicen todas las leyendas (...). Es mejor creer que habrá finales felices en todas partes. Y bien puede ser así. ¿Quién puede decir que no existen los finales felices? (...). El círculo se cierra y la rueda gira, y a eso se reduce todo. Aléjate pronto mientras la última luz se escurre, pon distancia entre tú y Derry, entre tú y los recuerdos, pero no entre tú y el deseo (...) pon distancia y trata de mantener la sonrisa (...) sé leal, sé valiente, aguanta. El resto es oscuridad.*

*IT*  
**Stephen King.**

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>1. Introducción.</b> .....	3
<b>1.1 Ritmos biológicos.</b> .....	3
<b>1.1.1 Sistema circadiano.</b> .....	7
<b>1.1.2 Control genético de ritmos biológicos en invertebrados</b> .....	8
<b>1.2 <i>Procambarus clarkii</i></b> .....	10
<b>1.2.1 Generalidades</b> .....	10
<b>1.2.2 Sistema nervioso.</b> .....	12
<b>1.2.4 Posibles vías de fotosincronización en <i>P. clarkii</i>.</b> .....	14
<b>1.3 Factor Inducido por Hipoxia 1</b> .....	16
<b>1.3.1 Síntesis y funcionamiento</b> .....	16
<b>2. Planteamiento y justificación.</b> .....	19
<b>3. Hipótesis.</b> .....	20
<b>4. Objetivo.</b> .....	20
<b>5. Método.</b> .....	20
<b>5.1 Diseño experimental</b> .....	20
<b>5.3 Determinación de proteínas</b> .....	22
<b>5.4 Inmunoblot.</b> .....	24
<b>5.5 Análisis de datos.</b> .....	25
<b>6. Resultados</b> .....	26
<b>7. Discusión</b> .....	29
<b>8. Conclusiones</b> .....	34
<b>9. Perspectivas</b> .....	34
<b>10. Referencias.</b> .....	35

## Resumen

El factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) es un factor de transcripción encargado de regular las funciones de las células cuando detecta concentraciones bajas de oxígeno en el medio, así como condiciones de estrés. Este factor consta de dos subunidades proteicas: HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ , cuya unión promueve la transcripción de genes, como los de la eritropoyetina, los transportadores de glucosa, los de enzimas glucolíticas y de los genes controlados por reloj. En estudios previos, la subunidad HIF-1 $\alpha$  en el acocil *Procambarus clarkii* presentó diferencias entre las 08:00h y las 20:00h en condiciones de oscuridad contante sugiriendo un posible ritmo circadiano. El objetivo de este estudio fue caracterizar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  a lo largo de 24h, en un marcapasos putativo de esta especie, para determinar si presentaba un ritmo. Se aclimataron acociles *P. clarkii* a un ciclo de Luz-Oscuridad (12:12), a una mitad se les sacrificó en 6 puntos temporales, a la otra mitad se le dejó 72 horas más en oscuridad constante (OO), también se sacrificaron en 6 puntos temporales, para posteriormente obtener el ganglio cerebroide. Las muestras se procesaron mediante la técnica de Western Blot, usando un anticuerpo primario anti-HIF-1 $\alpha$ . Los resultados de las concentraciones relativas de HIF-1 $\alpha$  en LO no presentaron variaciones diarias significativas (Kruskal Wallis,  $P > 0.05$ ) pero, el análisis de COSINOR validó un ritmo bimodal ( $P < 0.05$ ) con acrofases a las 04:00h y 16:00h. Para la condición OO se validó un ritmo circadiano ( $P < 0.05$ ) con acrofase a las 07:57 h y con diferencias significativas a lo largo del día entre los tiempos circadianos (ANOVA,  $P > 0.05$ ). En conclusión, la concentración relativa de HIF-1 $\alpha$  presentó un ritmo circadiano en el ganglio cerebroide y sugiere que HIF-1 $\alpha$  es un regulador maestro en el ganglio cerebroide del acocil *P. clarkii*, ya que se detectó a lo largo del día en ambas condiciones experimentales LO y OO.

## Abstract

Hypoxia-induced factor 1 (HIF-1) is a transcription factor responsible for regulating the functions of cells when it detects low oxygen concentrations in the environment, as well as stress conditions. This factor consists of two protein subunits: HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ , whose union promotes the transcription of genes, such as erythropoietin, glucose transporters, glycolytic enzymes, and clock-controlled genes. In previous studies, the HIF-1 $\alpha$  subunit of *Procambarus clarkii* crayfish showed differences between 08:00h and 20:00h in conditions of constant darkness, suggesting a potential circadian rhythm. The aim of this study was to characterize the expression of the HIF-1 $\alpha$  protein throughout 24h in a putative pacemaker of this species to determine whether HIF-1 $\alpha$  presented a rhythm. *P. clarkii* were acclimatized to Light-Dark cycle (12:12), one half were sacrificed in 6 time points, the other half subsequently exposed to 72 hours in constant darkness (DD), they were also sacrificed in 6 time points to obtain the cerebroid ganglion (brain). The samples were processed by Western Blot using a primary anti-HIF-1 $\alpha$ . The results of the relative concentrations of HIF-1 $\alpha$  in LD did not present significant daily variations (Kruskal Wallis,  $P > 0.05$ ), but the COSINOR analysis validated a bimodal rhythm ( $P < 0.05$ ) with acrophases at 04:00h and 16:00h. For the DD condition, a circadian rhythm was validated ( $P < 0.05$ ) with acrophase at 07:57 h and showed a significant differences throughout the day between the circadian times (ANOVA,  $P > 0.05$ ). In conclusion, the relative concentration of HIF-1 $\alpha$  presented a circadian rhythm in the cerebroid ganglion and suggests that HIF-1 $\alpha$  is a master regulator in the cerebroid ganglion of *P. clarkii* due to it was detected throughout the day in both LD and DD experimental conditions.

## **1. Introducción.**

Los seres vivos, desde el punto de vista termodinámico, son considerados un sistema abierto, en donde el medio interno y el medio externo intercambian energía. En específico, el medio interno es capaz de mantener diferentes variables estables para el correcto funcionamiento del organismo. Uno de los elementos reguladores son los ritmos biológicos donde la interacción del medio interno con el externo determina que algunas de las variables se expresen de manera predecible.

### **1.1 Ritmos biológicos.**

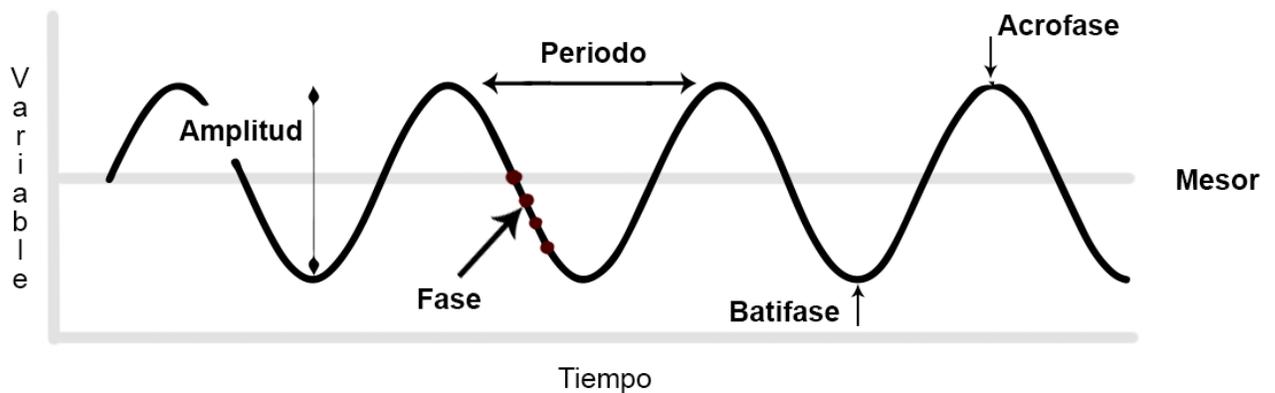
El planeta es gobernado primordialmente por dos movimientos geofísicos (rotación y traslación) cuyas consecuencias se manifiestan en actividades como la hora de levantarse, de alimentarse, hasta el nivel celular donde se sintetizan proteínas y hormonas. Estos mecanismos son controlados por la interacción de los organismos con su ambiente generando patrones rítmicos. Un ritmo es un cambio que se repite con un patrón similar.

Los ritmos biológicos son propiedades fundamentales de todos los seres vivos (Dunlap *et al.*, 1999), refieren a la recurrencia de cualquier evento dentro de un organismo a intervalos regulares de tiempo (Kalmus, 1935), presentando valores máximos y mínimos (Aréchiga, 2004). Estos ritmos les permiten a los organismos anticiparse a cambios en el ambiente, y así adaptar su comportamiento y fisiología a cualquier hora del día en que se encuentre (Panda, *et al.* 2002). Se han descrito ritmos que no dependen de estímulos geofísicos, por ejemplo, la disponibilidad de alimento, interacciones sociales y las variaciones de temperatura.

Las respuestas que se obtienen de los individuos después de captar las señales externas y procesarlas, pueden ser medidas y analizadas por su frecuencia o por su periodo. La

frecuencia se define como la cantidad de veces que se repite un evento en un intervalo de tiempo y el periodo es en cuánto tiempo se repite un evento. Cada dato registrado a lo largo de un periodo es ajustado a una función sinusoidal y graficada por una oscilación (que representa a un ritmo). La oscilación está compuesta por una fase. La fase indica cualquier punto ubicado en la oscilación; aunque también se puede interpretar como los estados de un proceso o ciclo ambiental (luz y oscuridad, temperatura); la amplitud es la diferencia entre el valor más alto (acrofase) o el más bajo (batifase) (Moore *et al.*, 1982) (Figura 1).

Los ritmos biológicos se clasifican por su frecuencia en: ritmos ultradianos: se repiten en un tiempo menor a 19 horas; ritmos circadianos: solo se repiten una vez en aproximadamente 24 horas; ritmos infradianos: se repiten en un tiempo mayor a 28 horas. Y se clasifican por su periodo en: ritmos circamareales: su periodo es cercano a 12 horas; ritmos circadianos: su periodo es cercano a 24 horas; ritmos circalunares: su periodo es cercano a 28 días; ritmos circaanuales: su periodo es cercano a 365 días.



**Figura 1.** Parámetros de los ritmos ajustados a una curva sinusoidal.

La palabra circadiano está compuesta de dos términos en latín: *circa* y *dies*, cuyo significado es: cercano a un día. El científico francés De Marian realizó un experimento con la *Mimosa pudica*, una planta cuya característica es que sus hojas se contraen cada noche, y al amanecer al recibir los rayos del sol se abren. De Mairan colocó a esta planta en una caja pequeña, consiguiendo así un ambiente libre de luz, y observó que la estructura foliar presentaban apertura y contracción sin necesidad del estímulo (Zordan *et al.*, 2000). Este experimento marcó el rumbo del estudio de los ritmos circadianos, hasta poder identificar sus propiedades que a continuación son definidas:

### **Presentar libre curso.**

El libre curso fue una de las primeras propiedades descritas para un ritmo circadiano. Se refiere a la persistencia del ritmo, es decir que en condiciones constantes, ya sea de luz u oscuridad, un ritmo va a seguir presentando su actividad sin la necesidad de un sincronizador (señal externa que actúa como punto de referencia temporal para el ser vivo), lo que demuestra el carácter endógeno de los ritmos biológicos. En esta condición el valor del periodo (representado por la letra tau =  $\tau$ ) va a permanecer cercano a 24 horas.

### **Capacidad de sincronización.**

Esta característica guarda una estrecha relación con la anterior, ya que el ritmo interno puede acoplarse a las señales externas, llamadas Zeitgebers (del alemán dador de tiempo) o sincronizadores, lo que le proporciona al ritmo interno una relación de fase con respecto a la señal ambiental. La sincronización es responsable de la localización temporal de un organismo, brindándoles características de una especie diurna, nocturna o crepuscular (Moreno *et al.*, 1997). Para estudiar la sincronización Aschoff propuso el modelo continuo, y Pittendrigh el modelo discreto. El primero indica que la luz debe presentarse de manera

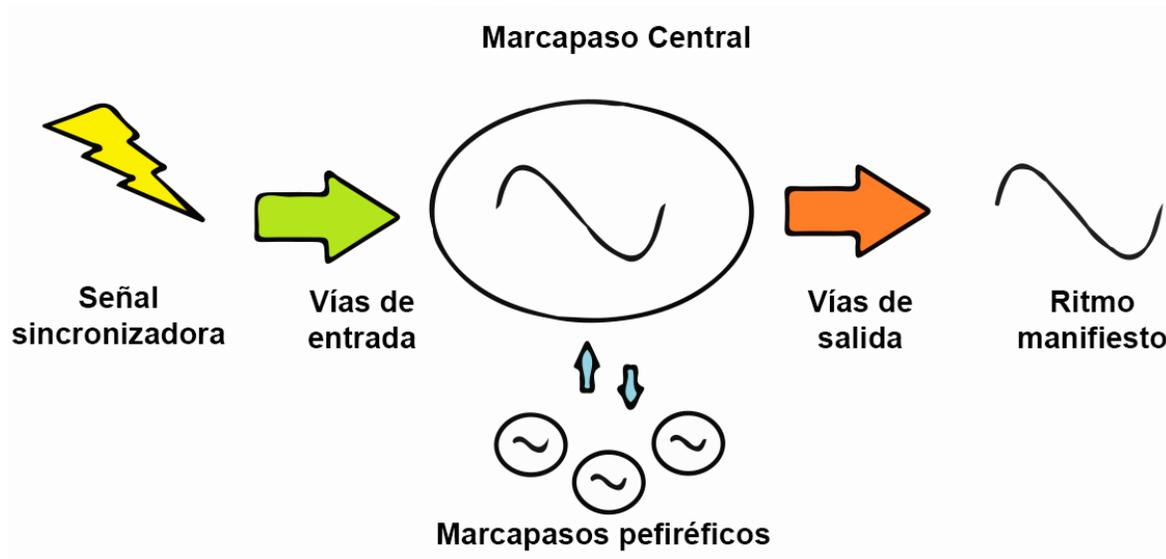
continua y ser lo suficientemente potente para poder sincronizar el reloj biológico. El segundo modelo consiste en aplicar pulsos breves y repetitivos de luz en una fase determinada para generar la respuesta del reloj biológico y así sincronizarlo. Basado en el modelo discreto podemos asegurar que dependiendo de la fase del ritmo en libre curso en la que se aplica un único pulso de luz va a provocar retraso, adelanto e incluso puede no tener efecto sobre un ritmo.

### **Compensación de la temperatura.**

La temperatura es considerada un estímulo que puede acelerar o retrasar reacciones químicas. Dado que en los organismos se llevan a cabo reacciones químicas, se podría pensar que los ritmos biológicos al estar basados en dichas reacciones tendrían la capacidad modificar su periodo, sin embargo, el valor del Q10 (cociente de temperatura: tasa de variación de un fenómeno cuando la temperatura varía 10°C) ha demostrado que el periodo del ritmo no se ve afectado, aunque hay cambios en la amplitud de la oscilación. Zimmerman y colegas (1968) caracterizaron los fundamentos de esta propiedad para el ritmo de eclosión pupal de *Drosophila pseudoobscura*. El valor del periodo ( $\tau$ ) en libre curso varía muy poco a diferentes temperaturas constantes pero el Q10 no varía, aunque puede haber cambios en la fase y sincronización de los organismos. En mamíferos se ha visto que el núcleo supraquiasmático es resistente a los cambios de temperatura y cuando se bloquea la comunicación celular el Q10 se mantiene en valores aproximados a 1 (Buhr *et al.*, 2010).

### 1.1.1 Sistema circadiano.

La mayoría de los seres vivos tienen fotorreceptores que perciben las variaciones de luz que hay a lo largo del día, estas señales que son capaces de sincronizar los ritmos endógenos son guiadas por vías de aferencia hacia el reloj o relojes circadianos que generan oscilaciones cercanas a 24h. Como consecuencia, el sistema de salida va a transmitir la información del reloj a varios tejidos para regular su ritmicidad (Tomiooka y Matsumoto, 2010). A todo este mecanismo se llama Sistema Circadiano (Figura 2).



**Figura 2.** Sistema Circadiano. A partir de un estímulo ambiental capaz de sincronizar al marcapaso, los seres vivos procesan la información y generan un ritmo manifiesto en diferentes parámetros fisiológicos o conductuales.

### 1.1.2 Control genético de ritmos biológicos en invertebrados

Uno de los primeros experimentos que se realizaron para estudiar el control genético de los ritmos biológicos en invertebrados fue realizado por Konopka y Benzer (1971). Ellos analizaron tres mutantes del cromosoma X de un gen desconocido hasta el momento que se creía que controlaban el reloj biológico en *Drosophila melanogaster*. Los mutantes presentaron un periodo de 18h, de 28h y el último fue arrítmico. Análisis genéticos a las moscas indicaron que las tres mutaciones fueron en alelos de un solo gen. Al gen se le nombró *per*, debido a la alteración que ocasiona en el periodo en que las moscas adultas emergen de la pupa y además de afectar el surgimiento de la pupa, se alteró el ritmo de actividad locomotriz. Posteriormente Hardin y colaboradores (1990), caracterizaron con más detalle el control genético de los ritmos biológicos en *Drosophila*. Se dieron cuenta que el ARNm de *per* se sintetizaba de manera rítmica y su traducción a proteína (PER) se necesitaba para seguir sintetizándose así mismo, llegando a la conclusión de que existía una asa de retroalimentación negativa.

Hasta el momento, el mecanismo molecular del reloj circadiano consta de 9 proteínas: Period (PER), Timeless (TIM), Clock (CLK), Cycle (CYC), Vriille (VRI), la proteína de dominio PAR1ε codifica el gen *pdp1ε*, Clockworkorange (CWO), Unfulfilled (UNF) y Ecdysone-induced protein 75 (E75).

Podemos distinguir dos asas de retroalimentación primarias, la más importante es la que forman las proteínas PER y TIM. La transcripción de estos dos se activan por la mañana tardía por el dímero de CLK-CYC que se une a las cajas E en la región 5' río arriba de los dos genes. El ARNm de ambos genes sale del núcleo con destino al citoplasma para que se traduzcan. PER puede ser inmediatamente fosforilado por la proteína fosfatasa 2 (PP2A),

desestabilizando y posteriormente degradándolo, esto sucede hasta que haya una acumulación significativa en el citoplasma. Mientras tanto, TIM se acumula lentamente durante el día y es degradada constantemente por la interacción con criptocromo (CRY) que es activada por la luz. Cuando empieza a anochecer TIM se acumula y se dimeriza con PER, cuando logran estabilizarse ambas proteínas se acumulan en el citoplasma, se fosforilan por la proteína cinasa shaggy (SGG), además PER puede ser fosforilada por cinasas ricas en prolina como lo son las proteínas cinasas activadas por mitógenos: NMO, p38, ERK2, CK2 y Doble time (DBT). La unión de DBT al dímero PER-TIM hace que las proteínas se transloquen al núcleo de la célula a la mitad de la noche. PER-TIM-DBT se une a CLK-CYC e inhibe la transcripción de *per/tim*. Al amanecer, CRY es activado y degrada a TIM, por su parte PER permanece y reprime su transcripción. Esto promueve la fosforilación de DBT por medio de SLIMB pocas horas después del encendido de las luces, sucesivamente CLK y CYC activan la transcripción de *per* y *tim*. La segunda asa más importante se da por la interacción CLK-CYC, el dímero se une a las cajas E y activan la transcripción de *vri* y *Pdp1e*. Tras la traducción, VRI se acumula de una forma inmediata, transloca al núcleo para interactuar con VRI-/PDP1-boxes (V-/P-boxes), dada la interacción se unen al promotor de *clk*, reprimiendo su transcripción. Aproximadamente 4 horas después PDP1e entra al núcleo y activa la transcripción de *clk* (ver Figura 3).



de cangrejo de río nativos (Dana *et al.*, 2011). Los acociles poseen desarrollo directo y se pueden distinguir dos etapas postembrionaria I, II y juvenil (Sandeman y Sandeman, 1990).

Este organismo se ha tomado como modelo de estudio en la neurofisiología por su sistema nervioso relativamente grande y bien organizado, además por ser un organismo que se reproduce con facilidad y es resistente a diferentes condiciones ambientales (Kagaya, 2015).

**Reino:** Animalia

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Crustacea (Brünnich, 1772)

**Orden:** Decapoda (Latreille, 1802)

**Familia:** Cambaridae (Hobbbs, 1942)

**Género:** *Procambarus* (Ortmann, 1905)

**Especie.** *P. clarkii* (Gidard, 1852)



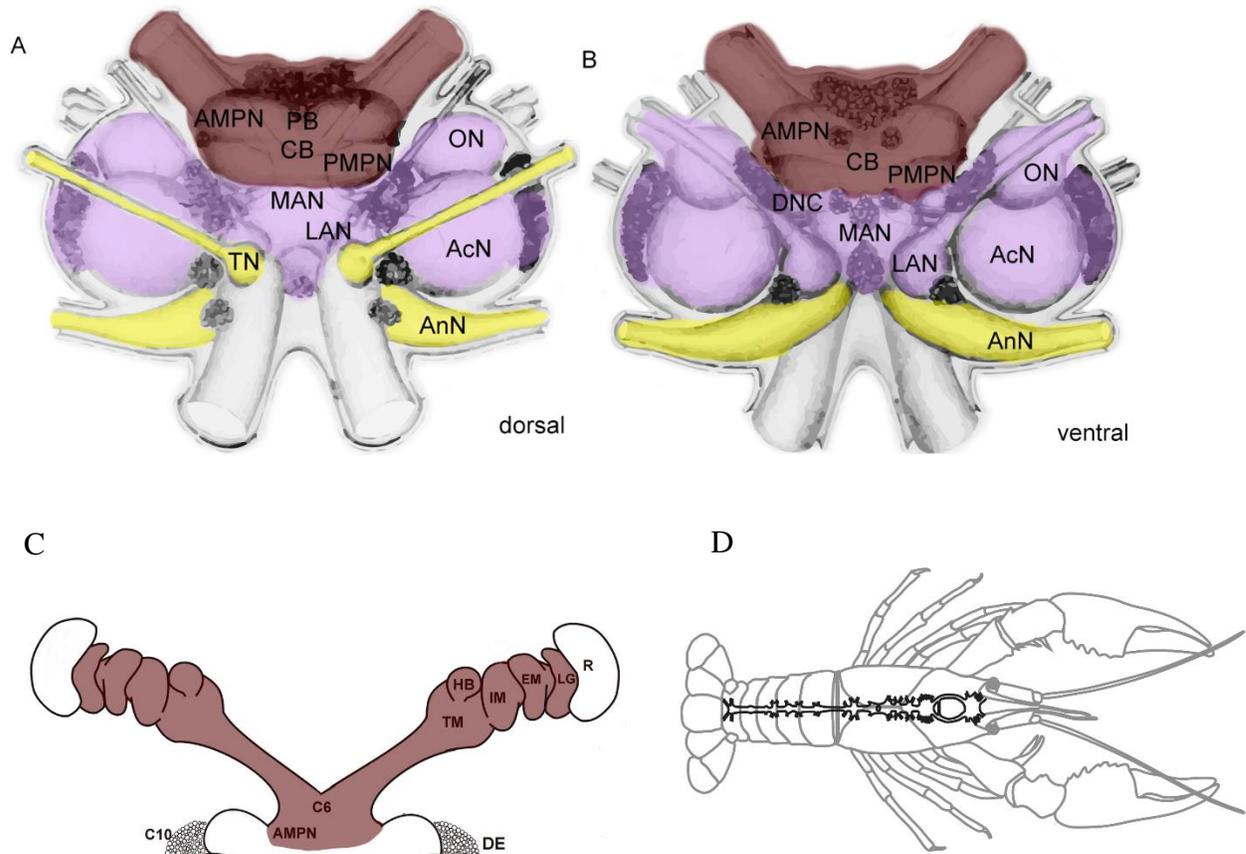
**Figura 4.** Clasificación taxonómica del acocil (Modificado de Holdich, 2002) y ejemplar de *Procambarus clarkii*.

### **1.2.2 Sistema nervioso.**

El sistema nervioso de los artrópodos donde se incluye a los decápodos, se caracteriza por no estar en una sola región anatómica, sino que se extienden por la parte ventral del organismo. Esta extensión se compone de ganglios bilaterales fusionados por una línea media (Smarandache-Wellmann, 2016) , que están unidos entre sí por axones intersegmentales y es conocida como cadena ganglionar. Con base en la disposición anatómica externa del organismo podemos identificar 3 regiones importantes: ganglios abdominales, ganglios del tórax, y el ganglio subesofágico o cerebro (Muyoney, *et al.* 2003). Los ganglios torácicos (T1, T2, T3, T4, T5) son los encargados de controlar los pereiópodos, la quela y el corazón. Existen 6 ganglios abdominales con aproximadamente 630 neuronas, los cuales inervan a los músculos de los pleópodos (A1, A2, A3, A4 y A5). El sexto ganglio (A6) inerva los urópodos, el telson y el epigastrio.

El ganglio subesofágico también es conocido como ganglio cerebroide, está compuesto de tres estructuras: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro. A su vez, el protocerebro (inerva estructuras como los ojos, controlando la visión) está compuesto de la lámina(LG), médula externa (EM), médula interna (IM), médula terminalis (TM), cuerpos hemielipsoidales (HB), puente protocerebral (PB), cuerpo central (CB), neuropilo protocerebral anteromedial (AMPN) y neuropilo protocerebral posteromedial (PMPN). El deutocerebro consta del lóbulo olfatorio (ON), neuropilo comisura deutocerebral (DCN), neuropilo medio antenal I (MAN), neuropilo lateral antenal I (LAN) y lóbulo accesorio (ACN).Entre sus funciones destacan el procesamiento y la integración de vías olfatorias, quimiosensación y la sensación táctil (Derby y Blaustein, 1988).

Por último, el tritocerebro (integra información sensorial de protocerebro y deutocerebro (Smarandache-Wellmann, 2016) está formado por el neuropilo tegumentado (TN), neuropilo antenal II (AnN) (Figura 5).



**Figura 5.** **A.** Vista dorsal del deutocerebro (morado) y tritocerebro (amarillo) y parte del protocerebro (rojo). **B.** Vista ventral del protocerebro, deutocerebro y tritocerebro (modificado de Sandeman *et al.*, 1992) **C.** Vista dorsal de protocerebro (modificado de Katsushi Kagaya, 2015) **D.** Distribución de la cadena ganglionar de un acocil (modificado de Escamilla Chimal *et al.*, 2010). Retina (R), Lámina ganlionaris (LG), médula externa (EM), médula interna (IM), médula terminalis (TM), cuerpo hemielipsoidal (HB), puente protocerebral (PB), cuerpo central (CB), neuropilo protocerebral anteromedial (AMPN), Grupo celular 6 (C6), Grupo celular 10 (C10), neuropilo protocerebral posteromedial (PMPN), lóbulo olfatorio (ON), neuropilo comisura deutocerebral (DCN), neuropilo medio antenal I (MAN), neuropilo lateral antenal I (LAN) y lóbulo accesorio (ACN), neuropilo tegumentado (TN), neuropilo antenal II (AnN).

### **1.2.3 Ritmos biológicos reportados en *P. clarkii***

Uno de los primeros ritmos que se describieron en el acocil fue el ritmo cardiaco, este presentó dos picos de actividad bajo un fotoperiodo LO 12:12, uno localizado en el encendido de las luces y uno más prolongado después del apagado de las luces. En condiciones constantes de oscuridad solo el pico de apagado de las luces fue el que presentó un periodo aproximado de 24 horas, presentando avances de fases que indican un acorte en el periodo.

Se ha descrito también el ritmo de actividad locomotriz (Page y Larimer, 1972; De Miguel y Aréchiga, 1994; Fanjul *et al.*, 1996), el ritmo en el electroretinograma (Fanjul *et al.*, 1987). La retina, el tallo ocular y el ganglio cerebroide del acocil son estructuras propuestas como posibles marcapasos (marcapasos putativos). En ellas se han reportado la presencia de proteínas de reloj: CRY en el ganglio cerebroide (Fanjul *et al.*, 2004) y PER, TIM y CLK, en el tallo ocular y el ganglio cerebroide (Escamilla-Chimal *et al.*, 2010). También se ha observado ritmicidad circadiana para la concentración de: glutatión (GSH) y glutatión disulfuro (GSSG) en la hemolinfa, el intestino medio y en el complejo lóbulo óptico ganglio cerebroide, así como la actividad de glutatión reductasa (GR) del intestino medio (Durán-Lizarraga *et al.*, 2001; Velázquez-Amado *et al.*, 2012).

### **1.2.4 Posibles vías de fotosincronización en *P. clarkii*.**

La proteína descrita que pone en fase al reloj biológico es el criptocromo (CRY). En las plantas, la proteína tiene un papel protector en contra de estímulos luminosos de longitud corta. En los animales desempeña un papel fundamental en las vías de señalización del reloj molecular circadiano. CRY se encuentra en el protocerebro medio, en la médula terminalis y en el cuerpo hemilipsoidal del tallo. CRY se compone de dos dominios, una región relacionada con la fotoliasa amino-terminal (PHR) y un dominio carboxi-terminal. La región

PHR se puede unir a dos cromóforos: dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y la 5,10-meteniltetrahidrofolata (MTHF). La fotorreducción de la FAD causa estrés oxidativo debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), estas pueden funcionar como segundos mensajeros intracelulares estimulando la activación transcripcional de genes (Finkel, 1998). En el pez cebra los cambios de óxido reducción inducidos por la luz estimulan a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), donde la señal fótica inicia la transcripción del gen *zcry*.

En el acocil *P. clarkii* se ha descrito un par de fotorreceptores extrarretinianos localizados en el ganglio cerebroide, involucrados en la sincronización dependiente de luz y donde se ha descrito la presencia de CRY (Strauss y Dirksen, 2010).

Asimismo, la tasa GSH/GSSG también se considera una posible vía de sincronización, ya que presenta un incremento con luz de alta irradianza independientemente del fotoperiodo largo (20:4), es decir que la potencia incidente de la luz sobre el organismo ocasiona un incremento de ROS. En el ganglio cerebroide se ha registrado la actividad de los mismos indicadores de estrés (Velázquez Amado *et al.*, 2012), confirmando la presencia de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como donadores de electrones para reducir el sistema y quizá regular el reloj en el acocil, como se ha observado en mamíferos (Rutter *et al.* 2001).

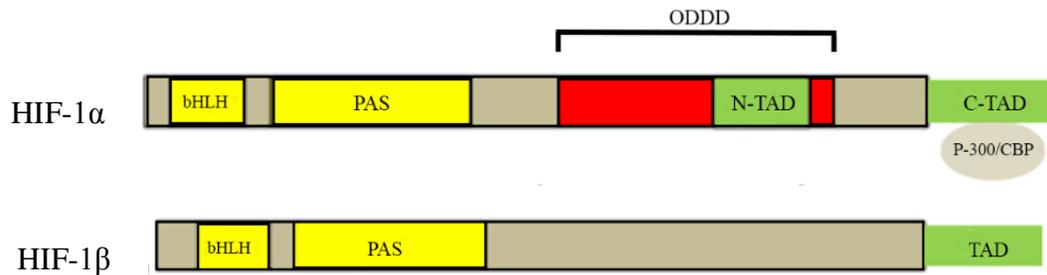
En *P. clarkii*, la producción circadiana de la hormona hiperglucemia de crustáceos (CHH, por sus siglas en inglés) se ha propuesto como un elemento de salida del reloj. Además, la concentración rítmica de glucosa y de lactato, sugiere que la expresión del Factor Inducido por Hipoxia (HIF1, por sus siglas en inglés) al amanecer y al atardecer puede actuar como regulador de los ritmos metabólicos mencionados (Velázquez Amado *et al.*, 2012).

### **1.3 Factor Inducido por Hipoxia 1**

Los factores de transcripción son parte esencial del funcionamiento en las células eucariotas, ya que actúan como moduladores de expresión génica. El Factor Inducido por Hipoxia 1 es un factor de transcripción compuesto por dos subunidades proteicas que se dimerizan:  $\alpha$  y  $\beta$ , altamente conservada desde los humanos hasta los nemátodos; juega un papel integral en la respuesta del organismo a las bajas concentraciones de oxígeno, es decir, en condiciones de hipoxia regula la transcripción de varias docenas de genes, haciéndolo esencial para la respuesta inmunológica y crucial para la fisiología que regula la homeostasis, la vascularización, y el metabolismo anaerobio (Ziello *et al.*, 2007). En humanos, el peso molecular de HIF1- $\alpha$  es de 92 kDa, mientras que en *Drosophila* es de 180 kDa (Tamamouna y Pitsouli, 2018), haciéndola una proteína de alto peso molecular. Velazquez Amado y colaboradores (2012) reportaron a HIF-1 $\alpha$  para *P. clarkii* con un peso molecular de 50 kDa.

#### **1.3.1 Síntesis y funcionamiento.**

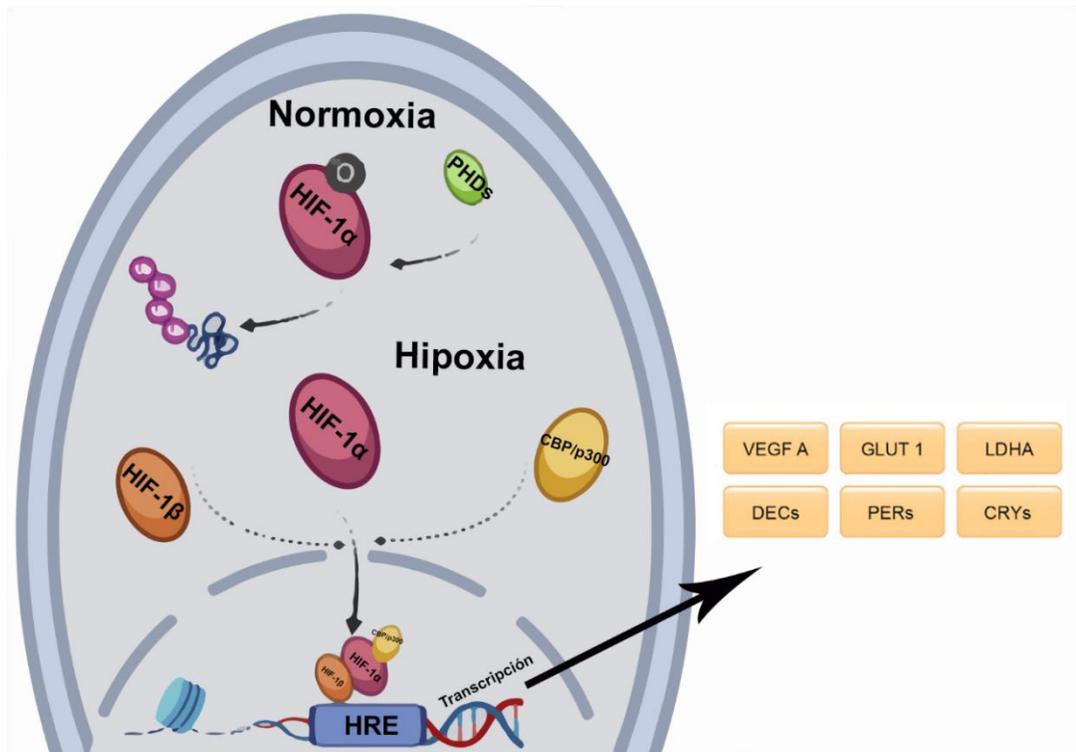
En mamíferos, en condiciones normales de oxígeno (159 pO<sub>2</sub> mmHg) la subunidad  $\alpha$  es inmediatamente degradada por la proteína supresora de tumores VHL, la cual es reconocida por la proteína ligasa de ubiquitina E3 que la guía al proteosoma 26S (Greer *et al.*, 2012). Mientras que en condiciones de hipoxia (<8 pO<sub>2</sub> mmHg) la concentración de la proteína va aumentando mientras el oxígeno disminuye (Semenza, 2002), hasta que es reconocida por la subunidad  $\beta$  para formar un heterodímero. Ambas subunidades se caracteriza por poseer un motivo de unión a DNA hélice-bucle-hélice (bHLH) y un motivo para dimerizar con una región PAS (PER-ARNT-SIM) altamente conservadas (Kallio *et al.*, 1997) (Figura 6).



**Figura 6.** Dominios estructurales de factor de transcripción HIF-1. Además de tener los dominios bHLH y PAS, HIF-1 $\alpha$  presenta un Dominio que censa el oxígeno (ODDD), un Dominio de transactivación N-terminal (N-TAD) y Dominio de transactivación C-terminal (C-TAD) (modificada de Masoud y Li 2015).

El heterodímero se une a una secuencia central de consenso en los promotores de los genes HIF-sensibles, y al unirse a la proteína coactivadora de 300 kDa (p300) / proteína de unión CREB (CBP) y a la isoenzima piruvato cinasa M2 (PKM2) (Figura 7), inicia la transcripción de genes que posteriormente se traducirán a proteínas (Tabla 1) (Greer *et al.*, 2012).

Estos estudios en su mayoría se realizaron en cultivos celulares de carcinomas renales, hepáticos y musculares, cuyas células se encuentran en hipoxia continua. En *P.clarkii* el consumo de oxígeno en luz de baja irradianza (30 lux) es de 6.46  $\mu\text{mol/g/h}$  y cuando se someten a 170 lux, el consumo de  $\text{O}_2$  decae a 2.54  $\mu\text{mol/g/h}$  indicando un estado de hipoxia producto de la irradianza (Fanjul, 1998).



**Figura 7.** Vía de señalización de HIF-1.

Función	Proteínas
Eritropoyesis.	Eritropoyetina
Aporte de hierro.	Transferrina, receptor de la transferrina, ceruloplasmina.
Angiogénesis.	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Receptor de VEGF FLT-1, Factor de crecimiento transformante 3, Inhibidor del activador del plasminógeno 1.
Tono vasomotor.	Receptor adrenérgico 1B, Adrenomedulina, Endotelina 1, Óxido nítrico sintasa 2, Hemo oxigenasa 1.
Metabolismo del ATP.	Transportador de glucosa 1 y 3, Hexoquinasa 1 y 2, Enolasa 1, Gliceraldehído-3fosfato-deshidrogenasa, Fosfoglicerato cinasa 1, Fosfoglucoquinasa L, Piruvato cinasa M, Lactato deshidrogenasa A.
Proliferación y supervivencia.	Factor de crecimiento de tipo insulínico 2, Proteína de unión a IGF 1, 2 y 3, P21, Nip3, ciclina G2, Condrocito de embrión diferenciado 1.
Otro (s).	Anhidrasa carbónica 9, Adenilato cinasa 3, Prolil-4-hidroxilasa 1.

**Tabla 1.** Proteínas que son reguladas por HIF (modificada de Chun *et al.*, 2002)

## **2. Planteamiento y justificación.**

La luz es considerada uno de los principales sincronizadores de los ritmos circadianos (Hirsh *et al.*, 2010). Se ha descrito en diversas líneas celulares y organismos que la luz provoca estrés al liberar radicales libres como el peróxido de hidrógeno (Fanjul-Moles *et al.*, 2003; Lavi *et al.*, 2003). Una de las capacidades adaptativas de los organismos ante este estrés son los ritmos biológicos donde se incluye la regulación metabólica y el sistema antioxidante. El factor inducible por hipoxia como se mencionó, actúa como regulador cuando las concentraciones de oxígeno son bajas ( $2.54 \mu\text{mol/g/h}$ ), sin embargo su actividad puede estar mediada por ROS generadas en el citoplasma inhibiéndolo o regulándolo a la baja, mientras que los productos mitocondriales lo activan o lo regulan a alta. También las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) ERK (proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares) y p38 son activadas por la luz (Hirayama *et al.*, 2009) y a su vez se ha observado que ERK es necesaria para la actividad de transactivación de HIF-1 $\alpha$  (Minet *et al.*, 2000). También se ha visto que HIF interactúa con MOP3 (BMAL1 en mamíferos), el cual es un dímero de CLOCK, teniendo una posible participación a nivel regulatorio en el reloj molecular. En un estudio previo a este trabajo, se determinó que la concentración relativa subunidad HIF-1 $\alpha$  en el acocil *Procambarus clarkii* presentó diferencias entre las 08:00h y las 20:00h en condiciones constantes (OO) (Velázquez-Amado *et al.*, 2012) sugiriendo un posible ritmo circadiano. Dada la relación de HIF-1 con los genes del reloj, con ROS y los productos mitocondriales, es importante conocer si este factor de transcripción se expresa de manera rítmica.

### **3. Hipótesis.**

Si HIF-1 $\alpha$  se encarga de activar la transcripción de diferentes genes que ciclan de manera circadiana; entonces HIF-1 $\alpha$  podría ciclar de manera circadiana en el ganglio cerebroide (uno de los marcapasos putativos) de *Procambarus clarkii*.

### **4. Objetivo.**

Determinar si en el ganglio cerebroide la proteína HIF-1 $\alpha$  se ajusta a los cambios diarios de luz oscuridad y si oscila de manera diaria o circadiana.

### **5. Método.**

#### **5.1 Diseño experimental**

Se utilizaron 36 organismos de la especie *Procambarus clarkii*, en intermuda sin distinguir entre hembras y machos, colectados en Chihuahua, México. Fueron aclimatados durante 15 días con ciclos de luz-oscuridad (LO) 12:12 (encendido de la luz a las 08:00 horas), con una intensidad de 170 lux, a una temperatura de 21°C y alimentación *ad libitum* cada tercer día en horas aleatorias con pellet de camaronina (Purina).

Transcurridos los 15 días de aclimatación, los animales se dividieron en 2 grupos de 18 organismos por cada uno. Todos los organismos se anestesiaron colocándolos en hielo media hora antes de sacrificarlos. El primer grupo se sacrificó pasado los 15 días de la aclimatación en los siguientes puntos temporales (3 individuos por punto): Tiempo del Zeitgeber (ZT) 0, 4, 8, 12, 16 y 20. El segundo grupo se mantuvo en 72 horas en oscuridad constante (OO), y posteriormente, se sacrificaron en los Tiempos Circadianos (CT) 0, 4, 8, 12, 16 y 20 y se les extrajo el ganglio cerebroide.

El método de anestesia para el sacrificio fue el utilizado por Cooper (2011) pero, modificado por el grupo de trabajo, donde cada individuo fue puesto en un recipiente con agua suficiente para cubrir la mitad del organismo (parte dorsal-ventral) y se colocó directamente en el congelador (0°C) por 30 minutos. Se decidió aumentar el tiempo de exposición al frío, ya que los organismos presentaban movimiento de pereiópodos, del abdomen y del telson, este método se usó debido a que la exposición a temperaturas bajas no produce respuesta conductual asociada al dolor.

Se realizó el cálculo de la muestra aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste unilateral, se precisan 3 sujetos en cada grupo para detectar una diferencia mínima de 1 entre dos grupos, asumiendo que existen 6 grupos y una desviación estándar de 0.2791. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 20% (Calculadora de Tamaño muestral GRANMO; Marrugat, 2012).

## **5.2 Tratamiento de muestras.**

Cada muestra se colocó en un tubo Eppendorf con 150 µl de solución de lisis (PBS pH 7.4, 1:2 con Triton X-100 (0,5%), EDTA (1 mM), Tris (0,5 M) y NaCl (1,5 M)) para homogeneizar por medio de un mini taladro con un pistilo de plástico por 35s. Se centrifugó a 13500 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C, se tomó en sobrenadante colocándolo en otro tubo y se le agregó una proporción 1:14 de inhibidor de proteasas (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor) para evitar la degradación de las proteínas. Todo el tiempo las muestras fueron colocadas en hielo y al final se almacenaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

### **5.3 Determinación de proteínas**

Para determinar la concentración de proteínas se usó el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Se utilizó albúmina de suero bovino de la marca Sigma (ASB) con una concentración de 0.5mg/mL con la absorbancia estandarizada de 0.333. Para la construcción de la curva patrón se usaron las siguientes cantidades: 0, 1.5, 3, 4.5, 7.5, 10.5, y 15  $\mu$ L de albúmina, se completó con cloruro de sodio (NaCl 0.5M), para tener un volumen total de 15  $\mu$ L y concentraciones de 0, 50, 100, 150, 250, 333.3, y 500  $\mu$ g/mL. El reactivo de Bradford se preparó con una proporción de 1:4 en dH<sub>2</sub>O y a cada muestra se le agregaron 200  $\mu$ L.

La determinación de proteínas se realizó con ayuda de un lector de placas de la marca BioTek. Se construyó la curva patrón usando 3 pozos por muestra, leyendo en una longitud de onda de 595nm. Para las muestras se usó 0.5  $\mu$ L y se completó a un volumen final de 15  $\mu$ L con NaCl, se le agregó la misma cantidad de reactivo de Bradford que se usó para la curva patrón.

### **Electroforesis**

Para separar las proteínas por peso molecular se prepararon dos geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE): el gel de carga (8%) y el gel separador (12.5%). Para el gel separador se usó 3mL de solución de acrilamida (BioRad), 2.51 mL de agua destilada (dH<sub>2</sub>O), 1.88 mL de TRIS 8.8pH, 76.25 $\mu$ L de SDS 10%, 62.5  $\mu$ L de persulfato de amonio (APS) 10% y 6.25  $\mu$ L de N, N, N, N- Tetrametiletlenodiamina (TEMED, BioRad). Para el gel concentrador se usaron 290  $\mu$ L de solución de acrilamida, 1.55 mL de dH<sub>2</sub>O, 620  $\mu$ L de TRIS 6.8 pH, 25  $\mu$ L SDS 10%, 12.5  $\mu$ L de APS y 3  $\mu$ L de TEMED.

Se colocó en una cámara de electroforesis vertical (ENDURO) y se agregó el amortiguador de corrida (para 500mL: TRIS 1.5g, glicina 7.2g, SDS 0.5g. pH 8.3).

A las muestras se les colocó una quinta parte de amortiguador (3mL SDS 20%, 3.75 mL TRIS 6.8pH, 9 mg azul de bromofenol, 2.4 mL  $\beta$ -mercaptoetanol, 4.5 mL glicerol) y se calentaron por 5 minutos a 92 °C.

El primer pozo del gel se cargó con 3 $\mu$ l de marcador de peso molecular BioRad WesternC, en los siguientes pozos se cargaron las muestras de cada punto temporal, se corrieron con un voltaje inicial de 50V, vigilando que la migración de las proteínas pasara del gel concentrador al gel separador, después de esta transición, se aumentó a un voltaje de 100V por 2 horas.

### **Transferencia.**

El gel se equilibró en amortiguador de transferencia en agitación (2.91g TRIS, 1.465g Glicina, 100 mL metanol; aforar con dH<sub>2</sub>O a 500mL) durante 15 minutos. Las proteínas presentes en el gel se transfirieron con una cámara semi-seca BioRad a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), con un voltaje constante de 30 V por 35 minutos. Posteriormente se dejó deshidratar la membrana con ayuda de una campana de flujo laminar para después volver a hidratar con metanol 100%. Para comprobar que no quedaron proteínas, el gel se tiñó con la solución de Azul de Comassie durante 30 minutos en agitación. Se quitó el exceso con solución destiñidora (125 mL metanol, 50 mL de ácido acético; aforar a 500 mL con dH<sub>2</sub>O). La membrana se tiñó con Rojo de Ponceau para ver que la transferencia fue exitosa. Se destiñó con dH<sub>2</sub>O.

#### **5.4 Inmunoblot.**

Para evitar la unión de proteínas a la membrana, se bloqueó con PBS Tween20 0.05% y albúmina al 3%. Se dejó toda la noche a una temperatura de 4 °C. Se lavó la membrana con PBST 0.05% 3 veces por 10 minutos. Después, se le agregaron los anticuerpos primarios anti-HIF-1 $\alpha$  1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) generado en burro y anti-GAPDH 1:1000 (Gene Tex GTX100118) generado en conejo. A cada membrana se le colocó por separado los anticuerpos. Se dejaron incubando en el refrigerador durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario, se dieron 3 lavados de 10 minutos con PBST 0.05% y se les agregó el anticuerpo secundario burro-anti-cabra 1;10000 para HIF-1  $\alpha$  y burro anti-conejo 1:10000 para GAPDH, se dejó en agitación 1 hora. Transcurrido el tiempo se dieron 3 lavados de 10 minutos con PBST 0.05%. Cada dilución de los anticuerpos fue hecha con PBST 0.05% y albumina al 1%. A la dilución de anticuerpos secundarios se les agregaron 1  $\mu$ L de conjugado StrepTactin-HRP (BioRad) para que se uniera al marcador de peso molecular. Se realizó en control de los anticuerpos para evitar falsos positivos en la detección, para lo cual se incubaron diferentes membranas de la siguiente manera: 1) anticuerpo primario + anticuerpo secundario 2) Anticuerpo primario 3) anticuerpo secundario 4) sin muestra.

#### **Detección de las bandas.**

Se usó el método de quimioluminiscencia para revelar la inmunopositividad. Este método consiste en usar una reacción enzimática, donde la peroxidasa de rábano (HRP), que está conjugada con el anticuerpo secundario, se oxida y los productos finales son pequeños destellos de luz. Se agregó el reactivo Luminata™ Forte Western HRP Substrate, para

capturar los destellos con un fotodocumentador (BioRad Molecular Imager ChemiDoc™ XRS System 170-8070).

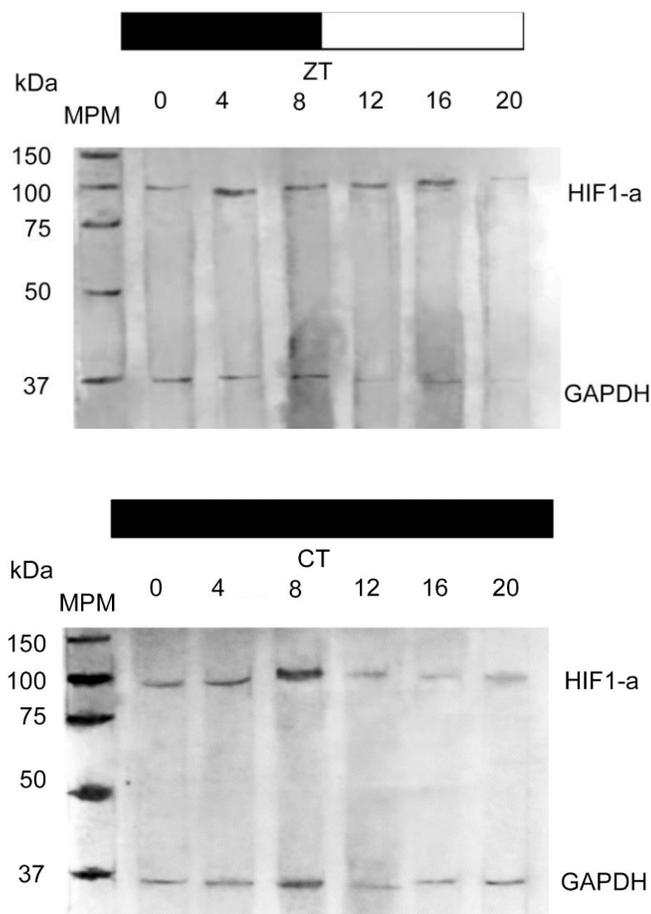
### **5.5 Análisis de datos.**

Para cuantificar la cantidad de proteína obtenida se usó el programa ImageJ y para localizar el peso molecular de las bandas se usó el programa IMAGE LAB. Se usó el software Statistica para el tratamiento de los datos obtenidos por ImageJ, para realizar un análisis de varianza. Por último, los datos fueron analizados por COSANA a diferentes periodos (h): 24 y 12.

Para el análisis estadístico para determinar si hay diferencias significativas en los puntos temporales establecidos, para el tratamiento LO 12:12 se usó la prueba no paramétrica de Kurskal Wallis debido a que las varianzas de los datos no fueron homogéneas. Para el tratamiento OO 24:00 se usó el análisis de varianza ANOVA.

## 6. Resultados

Se observó la presencia de la proteína HIF-1 $\alpha$  en el ganglio cerebroide, uno de los marcapasos putativos del acocil *P. clarkii*, mediante el uso del anticuerpo policlonal antiburro HIF-1 $\alpha$ . En la figura 8, se muestra las membranas con las bandas representativas para HIF-1 $\alpha$  y el control de carga GAPDH, con 83kDa y 36kDa respectivamente (figura 8).



**Figura 8.** Imágenes de membranas representativas de la proteína HIF1- $\alpha$  y GAPDH. A la izquierda de cada imagen se muestra el peso molecular en kilodaltones (kDa). El primer carril corresponde al marcador de peso molecular (MPM) los siguientes carriles representan el tiempo del día. Las barras blanco y negro corresponde a la condición 12:12 (LO); la barra negra representa la condición oscuridad contante (OO).

En la condición LO 12:12 los datos se distribuyeron de manera normal ( $W=.61316$ ,  $p=.0000$ ) y sus varianzas no fueron homogéneas. Indicando que uno de los supuestos estadísticos para realizar una prueba paramétrica de ANOVA no se cumplió. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Esta prueba indicó que no hay diferencias significativas en la concentración de la proteína a lo largo del día ( $P>0.05$ ). Sin embargo, el análisis de COSINOR validó un ajuste a un periodo de 12 horas ( $P<0.05$ ), con dos acrofases, una a las 4.01 horas y la otra a las 16.0 horas. Indicando que la presencia de HIF-1 $\alpha$  pueda estar relacionada al encendido y apagado de las luces (figura 9).

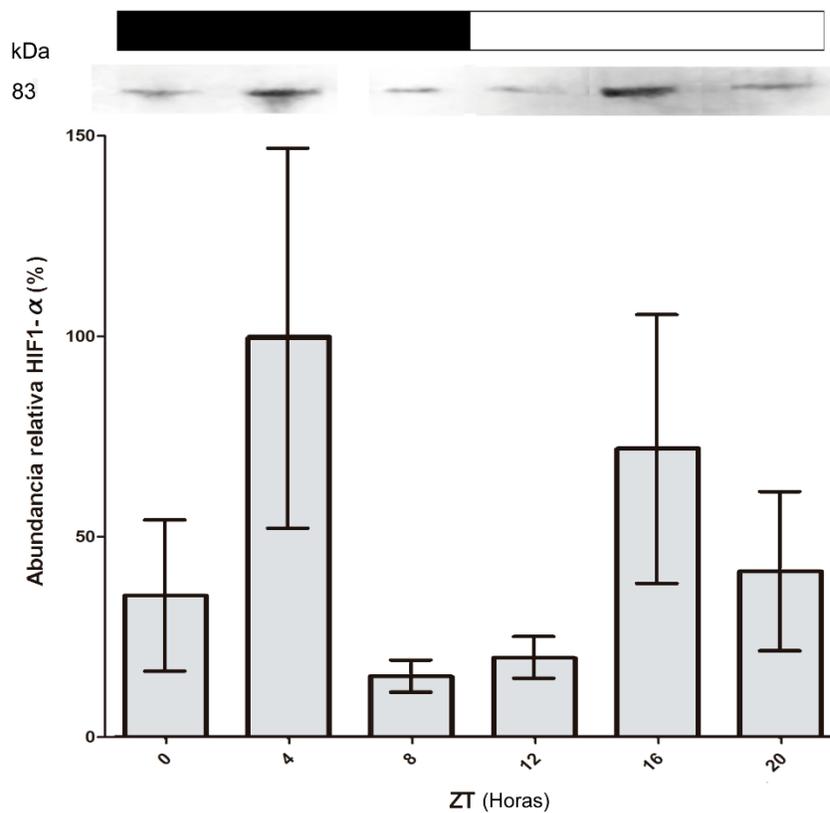


Figura 9. Gráfica de HIF-1 $\alpha$  en condición LO 12:12. La barra superior muestra la condición experimental (blanco: fotofase; negro: escotofase). Las bandas representan a HIF-1 $\alpha$ . Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar. N=3. Kruskal Wallis ( $P>0.05$ ).

En el tratamiento donde se sometió a los acociles por 72 horas de oscuridad constante OO 24:00, se cumplió el supuesto de normalidad ( $W=0.8325$ ,  $p=0.0008$ ) y el de varianzas homogéneas ( $p=0.6369$ ). La prueba de ANOVA para la concentración de HIF-1 $\alpha$  indicó diferencias significativas en los grupos ( $P<0.05$ ). Se aplicó la prueba *post hoc* de Tukey para comparar cada grupo con los demás, se usó porque los grupos son equilibrados y tienen las varianzas similares.

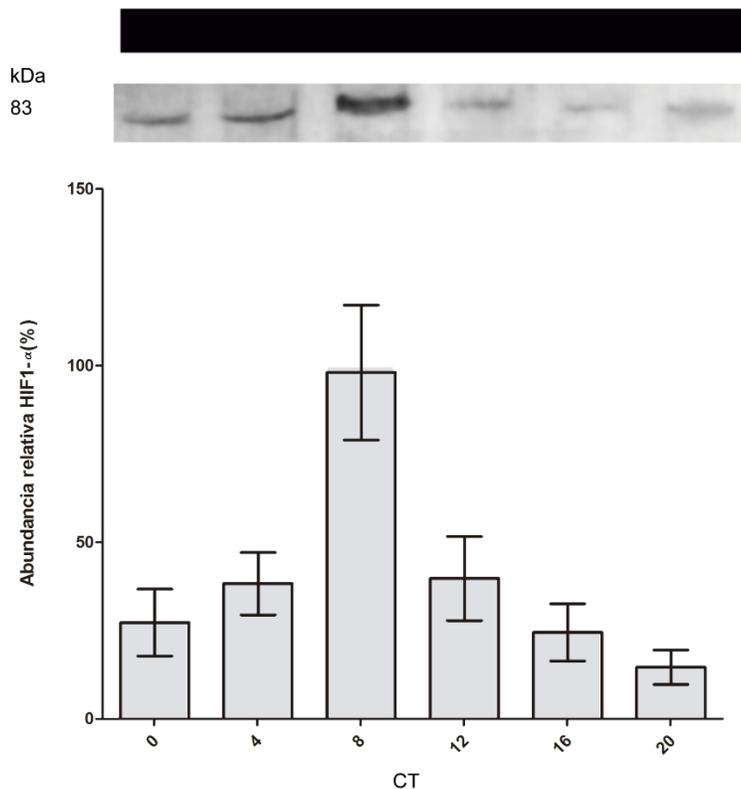


Figura 10. Grafica de HIF-1 $\alpha$  en condición OO 24:00. La barra superior muestra la condición experimental (negro: oscuridad constante). Las bandas representan a HIF-1 $\alpha$ . Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar. N=3. ANOVA ( $P>0.05$ ).

El CT 8 es diferente a todos los demás grupos. Indicado en CT8 una concentración alta de HIF-1 $\alpha$ , que en el relación con el tratamiento LO 12:12 podría indicar un atraso en la fase y el ritmo endógeno (figura 10). La prueba de COSINOR validó un ritmo circadiano con periodo de 24 horas ( $P < 0.05$ ), un porcentaje de ritmo de 37.75 % y con acrofase a las 7.57 h (Tabla 2).

Condición	Periodo(h)	PR (%)	Acrofase(h)	Mesor	Amplitud	p-value
LO 12:12	12	17.1	4.01	1.79	1.47	0.046
OO 24:00	24	37.75	7.57	1.34	1.07	0.0001

**Tabla 2.** Análisis de COSINOR de la abundancia de HIF1-a. Datos significativos con  $P < 0.05$ . PR: porcentaje de ritmo.

## 7. Discusión

En un estudio previo, se describió por primera vez la presencia HIF-1 $\alpha$  en *P. clarkii* en la retina como en el complejo tallo ocular-ganglio cerebroide (TO-GC), sugiriendo que estos tejidos presentan hipoxia (Velázquez *et al.*, 2012) similar a lo reportado por Fanjul (1998) donde el consumo de oxígeno en luz de baja irradianza (30 lux) del acocil fue de 6.46  $\mu\text{mol/g/h}$  y cuando se le ajusto la irradianza a 170 lux, el consumo de  $\text{O}_2$  decae a 2.54  $\mu\text{mol/g/h}$  indicando un estado de hipoxia. Además de que en el fotoperiodo OO se presentaron diferencias significativas en puntos opuestos, lo que sugería un posible ritmo circadiano. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la proteína HIF-1 $\alpha$  está presente a lo largo del día y la concentración relativa de la proteína no presentó diferencias significativas en LO. Los datos de COSINOR para el tratamiento LO 12:12

indican un ajuste de los datos a un periodo 12h, considerando un ritmo bimodal con picos a las 4:00h y 16:00h.

Para el tratamiento OO 24:00, el CT8 presentó diferencias significativas con respecto a los demás CTs. COSINOR validó un ritmo circadiano de 24 horas. Esto demuestra el carácter endógeno de la concentración de HIF-1 $\alpha$ . La actividad de HIF-1 $\alpha$  en el ZT4 y el CT8 puede indicar un retraso en la fase. Existen reportes en *P. clarkii* del comportamiento en actividad locomotriz, indicando que el ritmo manifiesta el efecto de enmascaramiento (Page y Larimer, 1972); también a nivel molecular, el enmascaramiento está presente en concentraciones de glutatión reducido (GSH) (Fanjul, 2003). En los casos anteriores la luz es el estímulo para que los ritmos sean enmascarados. La respuesta de enmascaramiento a la luz sirve como un medio para confinar a los animales a nichos nocturnos o diurnos (Redlin *et al.*, 2005), y los cambios en las respuestas de enmascaramiento a la luz pueden ser un componente esencial e integral del cambio entre la actividad nocturna y diurna (Redlin y Mrosovsky, 2004). Por lo anterior, en la condición LO 12:12, puede haber un enmascaramiento del ritmo.

La presencia de esta proteína en el GC puede estar ligada a diferentes genes que regulan tanto a los genes controlados por reloj (GCR) como a los genes involucrados en la respuesta a estrés. Los estudios del GC se han diversificado y su importancia radica en que posee varios componentes que son importantes para los ritmos biológicos. El primer factor que se notó fue que la ablación de la retina y del ganglio caudal no influía en la sincronización del ritmo circadiano y se propuso al GC como la estructura responsable de la generación de los ritmos (Pagey y Larimer, 1972; Sullivan, *et al.*, 2009). HIF-1 $\alpha$  es parte de una familia de proteínas con una región PAS, al igual que las proteínas de reloj PER y CLOCK (Choudhry y Harris, 2018) y se ha reportado en experimentos *in vivo* que la hipoxia regula los niveles de proteínas

circadianas PER1 y CLOCK, posiblemente a través de la interacción de proteínas entre PER1 y HIF-1 $\alpha$  (Chilov *et al.*, 2001). Yu y colaboradores (2015) detectaron que los niveles de expresión del ARNm de *Clock*, *Bmal1* y *Cry2* incrementaron por la acción de HIF-1 $\alpha$ . En el acocil se han detectado las proteínas de reloj CRY, PER, TIM y CLK, en el tallo ocular y GC (Fanjul *et al.*, 2004; Escamilla Chimal *et al.*, 2010). PER con una acrofase a las 3:00h, TIM con una acrofase a las 23:00h y CLK con una acrofase a las 7:00h, oscilan mostrando ritmos circadianos estadísticamente significativos y CRY mostró un ritmo en OO bimodal con picos máximos a las 11:00h y a las 23:00h. Con estos datos podemos sugerir que HIF-1 $\alpha$  está interactuando con CLOCK y CRY en el GC.

Otra posibilidad para que esta proteína se encuentre en el acocil a lo largo del día puede ser la inducción de hipoxia por la luz, lo que desencadena un efecto fotodinámico (TFD, por sus siglas en inglés) y a su vez un pre-acondicionamiento hipóxico que protege a los fotorreceptores contra la degeneración inducida por la luz. Para proteger del daño celular, uno de los genes blanco de HIF-1 es el gen de la eritropoyetina que se ha demostrado que protege a los fotorreceptores de la retina. En el estudio de Uzdensky (2015) se determinó que HIF-1 $\alpha$ , p53 y los procesos epigenéticos de metilación del ADN y desacetilación de histonas están involucrados, esto es de gran relevancia porque HIF-1 $\alpha$  se estabiliza por una familia de desmetilazas de lisinas (KDM, por sus siglas en inglés). Las KDM son marcadores epigenéticos que controlan los segmentos de heterocromatina y el plegamiento tridimensional de los cromosomas, como consecuencia puede programar la senescencia celular (Salminen *et al.*, 2016). En el trabajo de Uzdensky (2015), el efecto fotodinámico inducido al acocil *Astacus leptodactylus* condujo a un cese irreversible de la actividad neuronal en 20-30 min y en 8 h después de un estímulo de luz (640nm) y se observó el

desarrollo de necrosis de neuronas y células gliales y apoptosis de células gliales, por otro lado el activador de HIF1, DMOG, protegió a las células gliales de la apoptosis y necrosis inducidas por la TFD. Esto sugiere el papel protector de HIF1.

Por otra parte, no se puede descartar la estabilización de HIF-1 $\alpha$  por las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPk por sus siglas en inglés). Entre las múltiples funciones de estas proteínas se encuentra censar las señales que provienen del exterior, en las que se incluyen las señales de estrés. HIF-1 $\alpha$  puede fosforilarse y así estabilizarse en normoxia por la acción de proteínas cinasas y fosfatasa, en el cultivo celular tratado por inhibidores de proteínas cinasas bloquearon la inducción de HIF, la cinasa bloqueada fue la proteína activada por mitógeno p42/p44 (también llamada ERK2 o ERK1) la cual no es activada por hipoxia (Richard *et al.*, 1999; Jalouli *et al.*, 2017). Velázquez (2018) detectó la presencia de ERK en el GC del acocil *P. clarkii*, por lo que podría estar ligada a la estabilización de HIF-1 $\alpha$ . En este estudio también se propuso a que la máxima actividad de ERK está relacionada con el incremento de la abundancia de CRY, por lo que HIF-1 $\alpha$  puede estar formando asas de retroalimentación con todas las proteínas mencionadas (Figura 11).

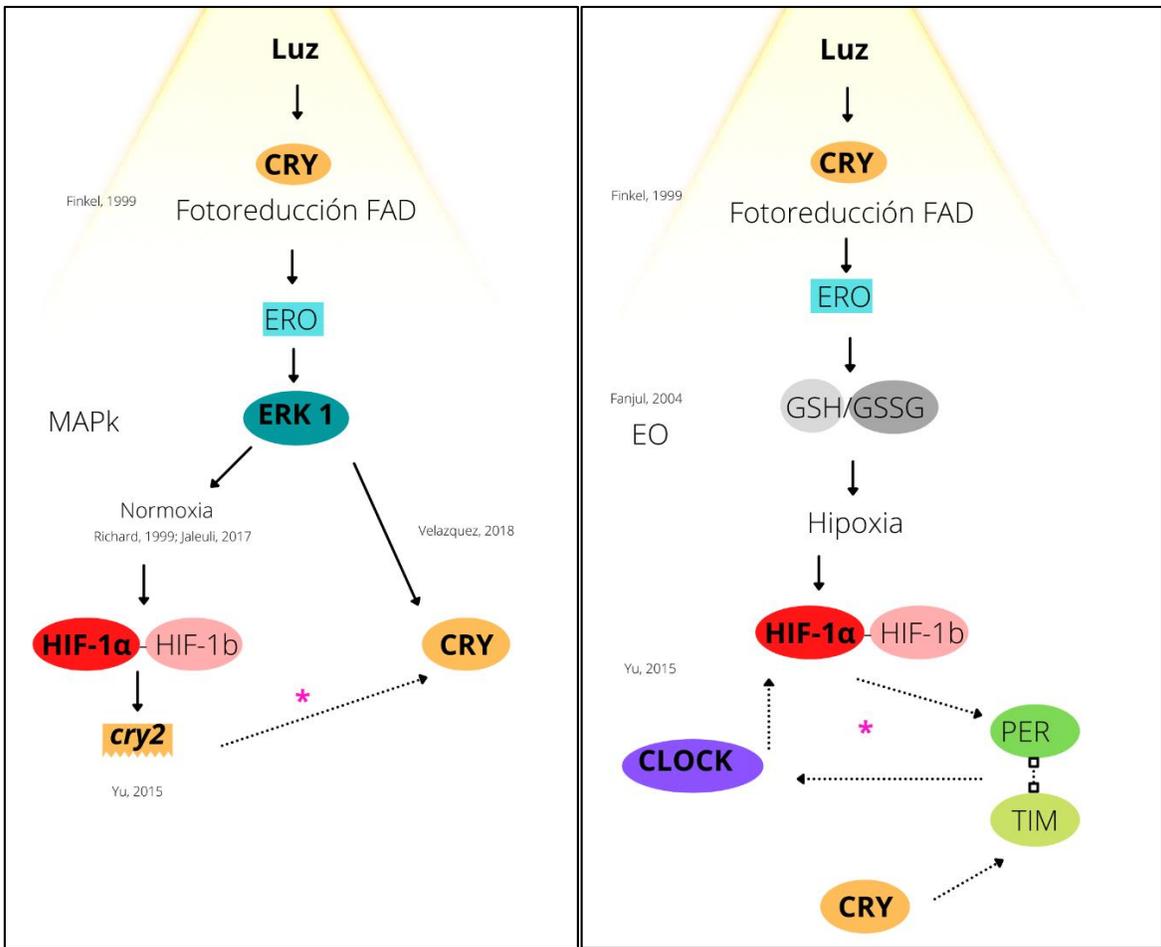


Figura.11. Se representa la posible interacción de HIF-1 $\alpha$  con las proteínas del reloj molecular. Las líneas representan vías de señalización y efectos descritos en la literatura; las líneas punteadas y el asterisco representan vías de señalización propuestas para estudios futuros.

## 8. Conclusiones

1. Hay un ritmo bimodal en la concentración relativa de HIF-1 $\alpha$  en el ganglio cerebroide, en la condición LO.
2. En condiciones LO el ritmo puede estar enmascarado por la luz.
3. En condiciones OO, la concentración relativa de HIF-1 $\alpha$  muestra un ritmo significativo con un periodo de 24 horas.
4. En el ganglio cerebroide HIF-1 $\alpha$  tiene un ritmo circadiano.
5. Encontrar a HIF-1 $\alpha$  en el ganglio cerebroide del acocil *P.clarkii* a lo largo del día en ambas condiciones, indica su papel en la regulación de las funciones tanto de las señales lumínicas y de oxígeno. Esto aporta evidencia para considerar que este factor está involucrado en la regulación de los ritmos del ganglio cerebroide.

## 9. Perspectivas

1. Localizar en el ganglio cerebroide a los neuropilos que expresan HIF-1 $\alpha$  mediante inmunohistoquímica.
2. Aislar y caracterizar la secuencia de HIF-1 $\alpha$  para establecer comparaciones estructurales y evolutivas.
3. Generar cultivos celulares de los neuropilos que expresan HIF-1 $\alpha$  para establecer protocolos de estrés y reducir el uso de ejemplares.
4. Bloquear a la proteína ERK para observar el comportamiento de HIF-1 $\alpha$  y CRY.
5. Verificar el papel protector de HIF-1 $\alpha$  en condición extrema de irradiación.

## 10. Referencias.

- Aréchiga, H. (2004). Sustrato neural de los ritmos biológicos. Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII. Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México. 225-249.
- Buhr, E. D., Yoo, S. H. y Takahashi, J. S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330(6002), 379-385.
- Chilov, D. M. I. T. R. I., Hofer, T., Bauer, C., Wenger, R. H. y Gassmann, M. A. X. (2001). Hypoxia affects expression of circadian genes PER1 and CLOCK in mouse brain. *The FASEB Journal*, 15(14), 2613-2622.
- Choudhry, H. y Harris, A. L. (2018). Advances in hypoxia-inducible factor biology. *Cell Metabolism*, 27(2), 281-298.
- Chun, Y. S., Kim, M. S. y Park, J. W. (2002). Oxygen-dependent and-independent regulation of HIF-1alpha. *Journal of Korean Medical Science*, 17(5), 581.
- Cooper, A. S., Leksrisawat, B., Gilberts, A. B., Mercier, A. J. y Cooper, R. L. (2011). Physiological experimentation with the crayfish hindgut: a student laboratory exercise. *Journal of Visualized Experiments*, (47), e2324.
- Dana, E. D., García-de-Lomas, J., González, R., y Ortega, F. (2011). Effectiveness of dam construction to contain the invasive crayfish *Procambarus clarkii* in a Mediterranean mountain stream. *Ecological Engineering*, 37(11), 1607-1613.
- De Miguel, F. F., y Aréchiga, H. (1994). Circadian locomotor activity and its entrainment by food in the crayfish *Procambarus clarki*. *Journal of Experimental Biology*, 190(1), 9-21.
- Derby, C. D. y Blaustein, D. N. (1988). Morphological and physiological characterization of individual olfactory interneurons connecting the brain and eyestalk ganglia of the crayfish. *Journal of Comparative Physiology A*, 163(6), 777-794.
- Dunlap, J. C., Loros, J. J., Liu, Y. y Crosthwaite, S. K. (1999). Eukaryotic circadian systems: cycles in common. *Genes to Cells*, 4(1), 01-10.

- Durán-Lizarraga, M. E., Prieto-Sagredo, J., Gonsebatt, M. E. y Fanjul-Moles, M. L. (2001). Crayfish *Procambarus clarkii* shows circadian variations in different parameters of the GSH cycle. *Photochemistry and Photobiology*, 74(2), 350–355.
- Escamilla-Chimal, E. G., Velázquez-Amado, R. M., Fiordelisio, T. y Fanjul-Moles, M. L. (2010). Putative pacemakers of crayfish show clock proteins interlocked with circadian oscillations. *Journal of Experimental Biology*, 213(21), 3723-3733.
- Fanjul-Moles, M. L., Durán-Lizarraga, M. E., Gonsebatt, M. E. y Prieto-Sagredo, J. (2003). The effect of photoperiod and light irradiance on the antioxidant circadian system of two species of crayfish from different latitudes: *Procambarus clarkii* and *P. digueti*. *Photochemistry and Photobiology*, 77(2), 210–218.
- Fanjul-Moles, M. L., Escamilla-Chimal, E. G., Gloria-Soria, A. y Hernández-Herrera, G. (2004). The crayfish *Procambarus clarkii* CRY shows daily and circadian variation. *Journal of Experimental Biology*, 207(9), 1453-1460.
- Fanjul-Moles, M. L., Miranda-Anaya, M. y Prieto, J. (1996). Circadian locomotor activity rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Chronobiology International*, 13(1), 15-26.
- Fanjul-Moles, M. L., Moreno-Sáenz, E., Villalobos-Hiriart, N. y Fuentes-Pardo, B. (1987). ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*, 88(2), 213-219.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2), 248-253.
- Greer, S. N., Metcalf, J. L., Wang, Y. y Ohh, M. (2012). The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO Journal*, 31(11), 2448–2460.
- Groves Roy. (1985). *The Crayfish: Its Nature And Nurture*. Fishing New Books Ltd. Inglaterra. pp 79.
- Hardin, P. E., Hall, J. C., y Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 343(6258), 536-540.

- Hirayama, J., Miyamura, N., Uchida, Y., Asaoka, Y., Honda, R., Sawanobori, K. y Nishina, H. (2009). Cell Cycle Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish) Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish. *Cell Cycle*, 8, 2794–2801.
- Hirsh, J., Riemensperger, T., Coulom, H., Iché, M., Coupar, J. y Birman, S. (2010). Roles of Dopamine in Circadian Rhythmicity and Extreme Light Sensitivity of Circadian Entrainment. *Current Biology*, 20(3), 209–214.
- Holdich, D.M. (2002). *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science. E.U.A. pp 680
- Jalouli, M., Mokas, S., Turgeon, C. A., Lamalice, L. y Richard, D. E. (2017). Selective HIF-1 regulation under nonhypoxic conditions by the p42/p44 MAP kinase inhibitor PD184161. *Molecular Pharmacology*, 92(5), 510-518.
- Kallio, P. J., Pongratz, I., Gradin, K., McGuire, J. y Poellinger, L. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), 5667–5672.
- Kalmus, H. (1981). A survey on biological rhythms. En: Aschoff J, ed. *Handbook of behavioral neurobiology: Biological Rhythms*, vol. 4. New York: Plenum Press, pp. 3–10.
- Katsushi Kagaya. (2015). *Invertebrate Brain Platform - Brain of Crayfish*. Recuperado en enero 7 (2019), de [https://invbrain.neuroinf.jp/modules/htmldocs/IVBPF/Crayfish/Crayfish\\_brain.html](https://invbrain.neuroinf.jp/modules/htmldocs/IVBPF/Crayfish/Crayfish_brain.html)
- Konopka, R. J. y Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(9), 2112-2116.
- Lavi, R., Shainberg, A., Friedmann, H., Shneyvays, V., Rickover, O., Eichler, M. y Lubart, R. (2003). Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40917-40922.

- Marrugat, J. (2012). Calculadora de Tamaño muestral GRANMO. Recuperado el 7 abril de 2019 de: <https://www.imim.es/ofertadeserveis/software-public/granmo/>
- Masoud, G. N. y Li, W. (2015). HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378-389.
- Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M. y Michiels, C. (2000). ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Letters*, 468(1), 53-58.
- Moore-Ede, M.C., Sulzman, F.M. y Fuller C.A. (1982). The clocks that time us. *Physiology of the circadian system*. Harvard University Press. London, England. pp 448
- Moreno C, Golombek D, Marques, N. y Menna-Barreto, L. (1997). Cronobiología: principios y aplicaciones. D. A. Golombek (Ed.). Eudeba. pp 383.
- Mulluney B., Tschuluun N. y Hall W. (2003). Architectonics of crayfish ganglia. *Microscopy research and technique*. 60, 253-265.
- Page, T. L. y Larimer, J. L. (1972). Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 78(2), 107-120.
- Panda Satchidananda, Hogenesch B. J. y Key A. Steve. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417, 329-335.
- Pollard, T. G. y Larimer, J. L. (1977). Circadian rhythmicity of heart rate in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 57(2), 221-226.
- Redlin, U. y Mrosovsky, N. (2004). Nocturnal activity in a diurnal rodent (*Arvicanthis niloticus*): the importance of masking. *Journal of Biological Rhythms*, 19(1), 58-67.
- Redlin, U., Hattar, S. y Mrosovsky, N. (2005). The circadian Clock mutant mouse: impaired masking response to light. *Journal of Comparative Physiology A*, 191(1), 51-59.

- Richard, D. E., Berra, E., Gothié, E., Roux, D. y Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 32631-32637.
- Rutter, J., Reick, M., Wu, L. C. y McKnight, S. L. (2001). Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science*, 293(5529), 510-514.
- Salminen, A., Kaarniranta, K. y Kauppinen, A. (2016). Hypoxia-inducible histone lysine demethylases: impact on the aging process and age-related diseases. *Aging and disease*, 7(2), 180.
- Sandeman R. y Sandeman D.C. (1990). Development and identified neural system in the crayfish brain. *Frontiers in Crustacean Neurobiology. Advances in Life Science*. 498-516.
- Sandeman, D., Sandeman, R., Derby, C. y Schmidt, M. (1992). Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobsters: a common nomenclature for homologous structures. *The Biological Bulletin*, 183(2), 304-326.
- Semenza, G. L. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 993-998.
- Smarandache-Wellmann, C. R. (2016). Current Biology Arthropod neurons and nervous system. *Current Biology*, 26(20), R960-R965.
- Strauss, J. y Dirksen, H. (2010). Circadian clocks in crustaceans: identified neuronal and cellular systems. *Frontiers in Bioscience*, 15(1), 1040-1074.
- Sullivan, J. M., Genco, M. C., Marlow, E. D., Benton, J. L., Beltz, B. S. y Sandeman, D. C. (2009). Brain photoreceptor pathways contributing to circadian rhythmicity in crayfish. *Chronobiology International*, 26(6), 1136-1168.
- Tamamouna, V. y Pitsouli, C. (2018). The Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in Angiogenesis and Cancer: Insights from the *Drosophila* Model. In *Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells-Transcription Toward the Establishment of Novel Therapeutics*, 209.

- Tomioka, K. y Matsumoto, A. (2010). A comparative view of insect circadian clock systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(9), 1397-1406.
- Uzdensky, A. B., Berezhnaya, E. V., Kovaleva, V. D., Neginskaya, M. A., Rudkovskii, M. V. y Sharifulina, S. A. (2015). The response of neurons and glial cells of crayfish to photodynamic treatment: Transcription factors and epigenetic regulation. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 9(4), 329-336.
- Velázquez Amado R. M. (2009). Variaciones diarias de las proteínas PER y TIM en el sistema nervioso del acocil *Procambarus clarkii*. pp 63.
- Velázquez Amado, R.M. (2018). MAPK como una vía de señalización en la sincronización a la luz en el acocil *Procambarus clarkii*. pp 74.
- Velázquez-Amado, R. M., Escamilla-Chimal, E. G. y Fanjul-Moles, M. L. (2012). Daily light-dark cycles influence hypoxia-inducible factor 1 and heat shock protein levels in the pacemakers of crayfish. *Photochemistry and Photobiology*, 88(1), 81–89.
- Yu, C., Yang, S. L., Fang, X., Jiang, J. X., Sun, C. Y. y Huang, T. (2015). Hypoxia disrupts the expression levels of circadian rhythm genes in hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 11(5), 4002-4008.
- Ziello, J. E., Jovin, I. S. y Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 80(2), 51–60.
- Zimmerman, W. F., Pittendrigh, C. S. y Pavlidis, T. (1968). Temperature compensation of the circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* and its entrainment by temperature cycles. *Journal of Insect Physiology*, 14(5), 669-684.
- Zordan, M., Costa, R., Macino, G., Fukuhara, C. y Tosini, G. (2000). Circadian clocks: What makes them tick? *Chronobiology International*, 17(4), 433–451.