



**UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Identificación del RNA mensajero de dos
genes del reloj circadiano en el acocíl
Procambarus clarkii

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Valería Stephanie Towns Alonso



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Maria Luisa Fanjul Peña

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



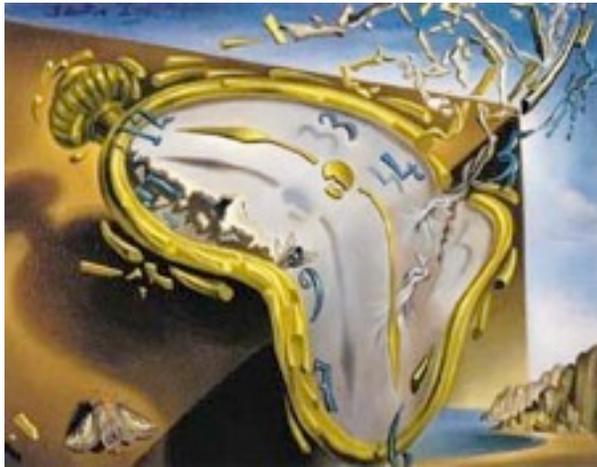
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

Identificación del RNA mensajero de dos
genes del reloj circadiano en el acocíl
Procambarus clarkii



Valeria Towns Alonso

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias

2010

Tutor: Maria Luisa Fanjul Peña

Lab. Neurofisiología Comparada

F. Ciencias

UNAM

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Towns
Alonso
Valeria Stephanie
58 11 60 82
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Facultad de Ciencias
Biología
405100327

2. Datos del tutor

Dra.
Maria Luisa
Fanjul
Peña

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Alejandro
Zentella
Dehesa

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Roman
Vidal Tamayo

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Carlos Arturo II
Becerra
Bracho

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Luisa
Alba
Lois

SIN TITULO (AGRADECIMIENTOS)

Desde el momento en que comencé a redactar esta tesis y hasta el día de hoy, una noche, tan solo unas horas antes de dar el paso final y decidirme a llevar dicho documento a una imprenta. Obviamente tras haber revisado, reconocido, inspeccionado, reexaminado cada una de las letras aquí mecanografiadas y con todos los riesgos nerviosos de tener una larga lista de *Fe de erratas*. Me atrevo a aseverar que, la parte más difícil de esta tesis no fueron las horas en el laboratorio, ni los intentos fallidos o las clonas chicolosas y mucho menos el hecho de haber perdido casi toda la información hace algunos meses, sino definitivamente estos 400 minutos, divididos a lo largo de breves lapsos durante varios días e incluso meses, que llevo sentada frente la hoja en blanco que debo llenar y que se titula “Agradecimientos”.

Comencé con el formato tradicional y fracasé, así que lo primero que decidí fue anotar en el centro la frase “Gracias a Dios”, la cual estuvo escrita durante otra razonable cantidad de tiempo, hasta esta noche, cuando me percate que para poder redactar en ella definitivamente debía cambiarle el título: -Pero... ¿que título ponerle?; era evidente que algo relacionado con aquello que buscaba transmitir; y fue entonces que me pareció mas coherente dejarla sin título, pues no pretende ser absolutamente nada.

¿A quien agradecer? existen tantas personas que me han impulsado, impactado, enseñado y apoyado en cada paso del camino para finalmente estar aquí, terminando de redactar lo que aparenta ser mi primer y no se si último libro. Nombrar a mis padres, hermanos e innumerables familiares, amigos, asesores, maestros, jefas, profesores, compañeros, amantes y contrincantes presentes en el juego, honestamente me parece inútil, la lista sería enorme, no podría perdonarme olvidar algún nombre y entonces si, nunca terminaría esta brevísima tesis.

A quienes les he fallado y lo han perdonado, a quienes nunca me han negado una segunda oportunidad, una prueba más, un diferente experimento, otra salida, otro kit de purificación, otro consejo, unos minutos más o un comienzo nuevo. A los que están y han estado siempre a mi lado, a los recién encontrados, a los que ya conocen mis mañas, a quienes no siguen aquí pero lo estuvieron en su momento, a los que nunca dejarán de estarlo. A los que me aceptan, a los que me odian, los que me toleran, a quienes me aman y a quienes me ladran. A todos ustedes mundos, humanos y animales diferentes, gracias, por hacer cada día, cada segundo de mi vida un nuevo aprendizaje, una enseñanza y una satisfacción o una añoranza. Gracias por ser parte de quien soy, del final de esta etapa y el comienzo del resto de mi vida. Gracias porque sin ustedes esto no sería posible. GRACIAS

CONTENIDO

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1 Generalidades del reloj biológico	9
2.1.1 <i>Ritmos y sincronización</i>	9
2.1.2 <i>Ritmos, relojes y marcapasos</i>	14
2.2 Bases genéticas y moleculares de los ritmos circadianos en vertebrados e invertebrados	15
2.3 El sistema circadiano del acocil <i>Procambarus clarkii</i>	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	31
6. MATERIAL Y MÉTODO	32
6.1. Animales y diseño experimental	33
6.2. Diseño de cebadores (oligonucleótidos/ primers)	33
6.3. Extracción de RNA	34
6.4 . RT - PCR	35
6.5 . Purificación del cDNA	37
6.6 . Clonación	38
6.7 Análisis de secuencias	40
6.8 . Análisis funcional	41
7. RESULTADOS	42
7.1 Análisis del RNA	43
7.2 Establecimiento de las condiciones para la reacción RT- PCR	43
7.4 Identificación de un posible fragmento de <i>P. clarkii</i> Per	50
7.5 Clonación de los productos	54
7.6 Análisis de ritmicidad	57

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	59
8.1 Análisis de secuencias	60
8.2 PCR semicuantitativa y análisis funcional	60
8.4 Conclusiones	64
8.3 Perspectivas	65
BIBLIOGRAFÍA	67
Anexo	72
1. Diseño Cebadores	73

I. RESUMEN

Las bases moleculares del reloj circadiano se han estudiado en diferentes organismos proponiéndose diferentes paradigmas, el más aceptado sugiere un mecanismo que consiste en una doble asa de retroalimentación transcripción-traducción interconectada. La base del modelo es la retroalimentación negativa de la proteína PER sobre su propia transcripción, siendo la proteína CLOCK el elemento positivo del asa. Ambos genes han sido identificados tanto en vertebrados como en invertebrados.

En el acocil *Procambarus clarkii*, no se han descrito los mecanismos moleculares del reloj. Debido a lo cual, el objetivo del presente trabajo fue tratar de caracterizar el RNA mensajero (mRNA) de los genes *Per* y *Clk*, mediante RT-PCR, en una de las estructuras centrales propuesta como posible marcapaso del sistema circadiano de *Procambarus clarkii*, el cerebro, así como determinar si existe un efecto del tiempo circadiano del animal sobre la abundancia en la expresión de estos dos genes.

Para ello, se diseñaron diferentes cebadores a partir de regiones conservadas de los genes *Per* y *Clock* caracterizados en diferentes especies animales. El mRNA extraído de muestras de cerebro de acocil obtenido a 6 diferentes puntos temporales de un ciclo de 24 h se utilizó para obtener el correspondiente cDNA mediante transcripción reversa y PCR (RT-PCR). Los amplicones que se separaron por electroforesis en geles de agarosa y las bandas de interés se cortaron purificaron, secuenciaron y clonaron.

Los resultados muestran que la secuencia de los productos obtenidos (cDNA) tiene diversos grados de identidad con las secuencias de pares de bases y de aminoácidos de genes y proteínas del reloj de otros invertebrados. *PCclock* es similar a la región conservada en el gen *clock* del crustáceo *Machrobranchium rosenbergii*, mientras que *Pcper* muestra identidad con el mismo gen en varias especies de palomillas.

Para determinar si existen variaciones entre el día y la noche subjetivos en la cantidad del mRNA de ambos genes; se cuantificó la densidad de las bandas de todas las horas utilizando el sistema fotodocuemtador Gel Logic 200 (Kodak) y el programa Kodak MI. Los resultados indican que los fragmentos presentan oscilaciones diarias siendo el pico máximo de expresión de *Per* a las 0300 hr y de *Clk* a las 1900 hr.

2. INTRODUCCIÓN

Old Time, that greatest and longest established
spinner of all!....
his factory is a secret place,
his work is noiseless,
and his hands are mutes.

(Charles Dickens)

Whether we wake or we sleep,
Whether we carol or weep,
The Sun with his Planets in chime,
Marketh the going of Time.

(Edward Fitzgerald)

2.1 Generalidades del reloj biológico

2.1.1 RITMOS Y SINCRONIZACIÓN

Los cambios cíclicos son fenómenos siempre presentes en nuestro ambiente, puesto que, tanto la rotación como la traslación de nuestro planeta originan ciclos diarios y estacionales, que se manifiestan como variaciones en la cantidad de luz, la temperatura, las mareas, la humedad y muchos otros factores del medio. De hecho, cambios cíclicos y no constancia, parecen ser la regla de la vida, y la ritmicidad biológica se considera un mecanismo para anticipar dichos cambios. (Willard et. al. 2006).

Un ritmo puede ser definido como un evento que se repite con un patrón similar a lo largo del tiempo. La recurrencia de cualquier evento biológico en intervalos de tiempo más o menos regulares, puede ser considerado un ritmo biológico (Aschoff J; 1981). Muchos de estos ritmos no son tan solo una respuesta a cambios ambientales, sino que provienen de un marcapaso o reloj interno. (Turek F. Takahashi J. 2001), es decir, son endógenos.

Los ritmos biológicos se expresan dentro de una amplia gama de frecuencias (Hiriart M; 2008). El periodo, esto es el inverso de la frecuencia, se define como el tiempo en que tarda en completarse un ciclo en una sucesión de ondas; es decir el intervalo de tiempo que transcurre para que se repita una fase determinada de la oscilación (Dunlap et. al. 2004. Saunders; 2002). Al periodo de un ritmo biológico mantenido en condiciones constantes se le conoce como el periodo ritmo en oscilación espontánea (Aguilar Roblero et al; 2009). Aquellos ritmos cuyo periodo de oscilación es cercano a las 24 h (entre 19 y 27 h) y se mantiene en condiciones constantes, se les conoce como circadianos (del latín: *circa*: alrededor y *diem*: día) y son una adaptación a la vida en la Tierra, que al girar alrededor de su eje, una vez, aproximadamente cada 24 h, somete a las plantas y los animales a ritmos diarios de luz y temperatura altamente predecibles (Moore-Ede et. al. 1982). Aquellos ritmos cuyo periodo es menor a 20 h se les llama ultradianos y los que

presentan periodos mayores a 28 h, se conocen como infradianos (Arechiga H; 1996. Dunlap et. al; 2004. Kuhulman et. al; 2007)

Cabe aclarar que no todos los ritmos son de naturaleza endógena. Algunos son únicamente controlados por las señales externas, como el ciclo luz oscuridad. Estos se denominan ritmos diarios, y a diferencia de los circadianos, no persisten en condiciones ambientales constantes. (Sehgal A; 2004)

Los pioneros en el estudio experimental de los ritmos fueron el astrónomo francés DeMairan en 1792 y posteriormente el botánico suizo DeCandolle, en 1835, que independientemente describieron como las hojas de las plantas presentan movimientos rítmicos con un periodo cercano a 24 h, incluso en ausencia de las señales del medio. A partir de ese momento comenzó un arduo trabajo para tratar de describir, mediante la metodología científica, los mecanismos de las oscilaciones endógenas y gracias a los trabajos de científicos como Bunning, Aschoff y Pittendrigh, es que conocemos los parámetros que describen con rigor y de manera formal los ritmos biológicos (Roenneberg y Merrow; 2002. / Daan y Beersma; 2002).

Los ritmos biológicos son ubicuos y por tanto se pueden observar en organismos tan diversos como las algas, la mosca de la fruta, los crustáceos, las aves y los mamíferos, entre otros. El reloj circadiano le permite a los seres vivos predecir y prepararse con anticipación a los cambios en el ambiente físico asociados con el ciclo día y noche. Así, el organismo esta adaptado tanto fisiológica como conductualmente, para afrontar los retos impuestos por dichos cambios, de modo que existe una sincronía entre el ambiente externo y el medio interno. De esta manera, el reloj biológico dota al organismo con una organización temporal interna y se asegura de que los cambios estén coordinados uno con el otro (Pittendrigh; 1981).

El reloj circadiano ha sido conceptualizado como una serie de tres componentes: 1) Una vía de sincronización que transmite las señales ambientales al aparato medidor y dador de tiempo, 2) el oscilador o marcapaso central, que opera aún en ausencia de señales externas y es el componente central del reloj biológico y 3) las vías de salida, por medio de las cuales se transmite la

información temporal de este oscilador a los diferentes efectores a través de los cuales se hace manifiesto el ritmo. Tanto las vías de salida como los efectores y el ritmo están acopladas al ciclo del oscilador circadiano (Hardin; 2000).

Bajo este supuesto, los ritmos circadianos comparten un conjunto de propiedades, entre las que se pueden enunciar, como las más notables: 1) La persistencia del ritmo en condiciones constantes. 2) La capacidad de sincronizarse con las señales del medio ambiente. 3) Y la cualidad de oscilar con un valor de periodo casi invariable en un cierto intervalo de temperatura, es decir el reloj es capaz de compensar los cambios de temperatura (Arechiga H. 1996). Esta propiedad se ha podido comprobar mediante la observación de que en condiciones de luz u oscuridad constantes, el periodo de oscilación espontánea se mantiene con un valor muy similar cuando es medido a diferentes temperaturas (Dunlap et. al; 2004); es decir, el ritmo posee un Q_{10} (coeficiente de temperatura que representa el factor por el cual el intervalo de una reacción se modifica al aumentar 10 °C su temperatura) se aproxima a 1 (Hastings M, Maywood E; 2000). Esta característica resulta importante, pues un reloj dependiente de la temperatura solo generaría errores en la medición del tiempo. (Pittendrigh C; 1954).

Puesto que el periodo endógeno del ritmo no coincide exactamente con el periodo de los ciclos externos, los organismos deben obtener información de los ciclos ambientales para adecuar sus funciones a los cambios rítmicos del medio. Estos "dadores de tiempo" (Zeitgebers) envían la información sensorial cíclica al marcapaso, que sincroniza el periodo interno con el astronómico, adecuando las funciones del organismo al reloj biológico (Fanjul-Moles; 2007). Así, nos referimos al tiempo definido por el ciclo ambiental como tiempo del zeitgeber (ZT)

La sincronización es el ajuste del periodo del sistema circadiano (τ) de modo que este sea igual el periodo del zeitgeber (T). Cuando hay sincronización, el sistema adopta una relación de fase específica con el ambiente; es decir, la diferencia de fase entre el marcapaso y el zeitgeber se vuelve cero. La sincronización cumple con dos propósitos principales: el control de la fase y el ajuste del periodo (Turek. Takahashi; 2001), de modo que existen tres criterios importantes para demostrar experimentalmente la sincronización:

1) El ritmo debe ser observado en la presencia del zeitgeber y el periodo del ritmo debe ser idéntico al del zeitgeber y diferente al de este en su ausencia. 2) La oscilación circadiana en presencia de señales ambientales debe tener la misma fase que el zeitgeber. 3) Por último, debe ser posible distinguir la sincronización del enmascaramiento o *masking* (en inglés). Este fenómeno se refiere al efecto inductor o inhibidor del zeitgeber sobre la expresión del ritmo, el cual se puede confundir con la sincronización. De hecho, la luz promueve la actividad locomotora espontánea en la mayoría de los organismos diurnos (*masking positivo*), mientras que suprime dicha actividad en animales nocturnos (*masking negativo*) (Dunlap et. al. 2004. Daan y Aschoff; 2001).

Las señales ambientales que sincronizan el reloj incluyen a la luz, la temperatura, los estímulos sociales, la disponibilidad de alimento, entre otros; sin embargo, la luz ha sido identificada como el zeitgeber más importante (Kyriacou et. al. 2000). Esto resulta obvio desde el punto de vista funcional, pues el ciclo luz oscuridad (LO) representa la señal más precisa para medir el tiempo en la mayoría de los ambientes, lo cual puede ser considerado como una presión selectiva para el sistema de sincronización (Daan y Aschoff; 2001). De hecho, los principios y propiedades básicas de la sincronización por el ciclo LO son muy similares entre diversos organismos. (Turek, Takahashi; 2001)

Cuando mantenemos a un organismo en ciclos de 12 h luz y 12 h de oscuridad, el tiempo del zeitgeber donde las luces se encienden, se denomina ZT0 y el momento en que las luces se apagan es el ZT12; de modo que el tiempo transcurrido entre la ZT0 y ZT12 se refiere a las horas del día subjetivo y el tiempo restante (entre 12 y 0) se refiere a la noche subjetiva. (Sehgal. 2004). Si un ritmo se encuentra sincronizado a un ciclo de esta naturaleza, el tiempo circadiano del ritmo coincidirá con el tiempo del zeitgeber puesto que 1 hora circadiana = τ / T .

Con el objetivo de encontrar las relaciones entre el medio externo y el marcapaso; se han llevado a cabo numerosos estudios para evaluar el comportamiento y adaptación de los ritmos circadianos ante el avance o retraso en la fase del ciclo LO. De modo que una modificación en la fase del

zeitgeber da como resultado un ajuste de la fase del periodo endógeno. Sin embargo, el ritmo no se sincroniza de inmediato, sino que pasa por una serie de ciclos transitorios hasta alcanzar una fase estable con el zeitgeber. Estos ajustes también se dan ante cambios en la fase de ciclos de temperatura o de variables bioquímicas. (Koukkari. Southern; 2006. Sehgal. 2004)

Cuando una fase se adelanta es decir que el evento ocurre más temprano, decimos que el cambio de fase es positivo. Si la fase se atrasa, decimos que el cambio es negativo (Koukkari. Southern; 2006). La razón al hacer énfasis en esto es que, cuando le son administrados pulsos de luz a un organismo en oscuridad constante, se producen cambios de fase discretos en el ritmo de oscilación espontánea. La cantidad y dirección del cambio de fase, ya sea positiva o negativa, dependen de la fase del ritmo donde se suministra el pulso de luz (Pittendrigh; 1981). La gráfica que representa la relación entre el cambio de fase del ritmo y la fase donde se aplica el pulso, se conoce como Curva de Respuesta de Fase (CRF) y constituye una descripción de la sensibilidad del sistema circadiano ante un zeitgeber.

Los mayores atrasos de fase, ante un estímulo, ocurren durante la noche subjetiva temprana, cuando los organismos diurnos inician su fase de reposo y los nocturnos su actividad. Los avances de fase más grandes ocurren en la noche subjetiva tardía. Hay relativamente pocos cambios de fase cuando el estímulo llega durante el día subjetivo (Moore-Ede et. al. 1982).

El hecho de que un ritmo sea capaz de sincronizarse con la luz implica la presencia de un fotorreceptor capaz de enviar información al marcapaso. En algunos animales existe evidencia de la presencia de estructuras fotorreceptoras organizadas, como los ojos compuestos, en otros casos se observan receptores extrarretinianos solamente y en algunos parecen coexistir múltiples receptores (Bradley; 1974)

2.1.2 RITMOS, RELOJES Y MARCAPASOS

La mayoría del conocimiento sobre los relojes circadianos, está basada en la observación de los ritmos, sin embargo, dichos ritmos no son el reloj (Dunlap et. al. 2004). Un grupo de células que muestran cambios cíclicos en su fisiología y expresión génica, son consideradas osciladores biológicos. Un oscilador que es influido por el zeitgeber, muestra ritmos endógenos y regula los ciclos fisiológicos de otros osciladores, es denominado marcapaso (Herzog; 2007). Así, el reloj biológico es un oscilador capaz de medir el tiempo de dos formas conceptualmente distintas; al proporcionar una relación de fase entre el programa interno y el ciclo ambiental, mide el tiempo local y al asegurar la sucesión eventos en una secuencia temporal estable, miden el lapso de tiempo sideral. (Pittendrigh; 1981 / Dunlap et. al; 2004)

Existen, por lo tanto, dos tipos de osciladores biológicos: 1) Aquellos autosostenibles, que generan ritmos circadianos y oscilan endogenamente, además de contar con vías de sincronización con el ambiente, tanto externo como interno; 2) y aquellos, denominados osciladores esclavos, que requieren la información de los primeros para mantener la amplitud de su oscilación. Cuando un grupo de marcapasos controlan la misma salida, deben sincronizarse, no solo con el medio, también entre ellos, de modo que se produzca un ritmo coherente (Herzog; 2007)

El reloj en los organismos unicelulares como el hongo del pan (*Neurospora crassa*) y la bacteria (*Sinechococcus elongatus*), parece estar compuesto por osciladores múltiples dentro de una sola célula. En estos sistemas se ha observado como células individuales regulan diversas salidas circadianas. (Bell-Pedersen et. al. 2005)

Entre las pruebas que demuestran la existencia anatómica de los osciladores autosostenibles, se encuentran los experimentos realizados en el molusco *Bulla gouldianna*, donde se estudiaron 100 neuronas retinales basales que presentan un ritmo diario en el potencial de acción, siendo su pico

máximo durante el día, y aún si se secciona el nervio óptico, son capaces de sincronizarse con la luz y oscilar espontáneamente en condiciones constantes (Block y Mc Mahon; 1984).

En el cerebro de la mosca de la fruta (*Drosophilla melanogaster*) se han caracterizado funcionalmente dos osciladores en las neuronas laterales (LN), aquellas que expresan el Factor Dispersor del Pigmento (PDF), dirigen la actividad de la mañana y aquellas que no lo expresan, dirigen la actividad de la tarde (Picot et. al. 2007). Sin embargo, existe un conjunto de evidencias que demuestran la existencia de osciladores periféricos autosustentables y capaces de sincronizarse con la luz (Giebutowicz; 2004), sugiriendo que el sistema circadiano es multioscilario.

En algunas aves, como los gorriones, existe evidencia de que la glándula pineal es el marcapaso central; sin embargo, para otras especies como la codorniz japonesa, un segundo modelo, propone a la retina y el Núcleo Supraquiasmático como el reloj central (Dunlap et. al; 2004).

En el caso de los mamíferos, la localización del reloj se sugirió por primera vez cuando lesiones en el Núcleo Supraquiasmático (NSC) modificaban el comportamiento del reloj de los roedores, volviéndose arrítmico (Hastings M, Maywood E; 2000). Más contundente aún es la observación de que el trasplante de tejido del NSC en organismos donde este había sido lesionado, restituye el comportamiento rítmico de los animales (Bell-Pedersen et. al. 2005).

2.2 Bases genéticas y moleculares de los ritmos circadianos en vertebrados e invertebrados

Las bases moleculares del reloj circadiano han sido estudiadas en diversos organismos que van desde la mosca de la fruta, hasta el hongo del pan y la bacteria *Sinechococcus s.p.* En estos organismos parece haber evolucionado un mecanismo general donde un asa de retroalimentación con elementos positivos y negativos cumple el rol principal. (Hardin et. al. 1990). Este modelo genético del sistema circadiano consiste en la transcripción y traducción de un gen a proteína.

Esta proteína inhibe o promueve, directa o indirectamente, su propia transcripción, y el ciclo reinicia cuando la proteína es degradada. El resultado son oscilaciones circadianas del RNA mensajero (mRNA) y de la proteína (Roenneberg y Merrow; 2003)

El paradigma convencional del reloj molecular en *D. melanogaster*, implica la interacción de las proteínas: Period (dPer), Timeless (dTim), con los factores de transcripción: Clock (dClk), Cycle (dCyc), Par Domain Protein (DPDP1) y Vri (dVri); 3 cinasas: Double-Time (dDbt), Shaggy (dSgg), la Casein Kinase 2 (dCK2) y la Fosfatasa 2a (dPP2a). Esta asa molecular (Fig. 1) está compuesta por varios elementos, cada uno de los cuales depende directamente del componente que lo antecede en el asa; por ejemplo, el intervalo de producción de proteína depende de las cantidades de mRNA transcrito (Roenneberg y Merrow; 2003).

El primer "gen reloj" descubierto, *period* (*per*), fue identificado en mutantes arrítmicas de *D. melanogaster* y el análisis de la cinética de expresión del gen, sugirió el modelo en el que se basan los diversos paradigmas genéticos que tratan de describir los diferentes sistemas circadianos. Posteriormente, se demostró que otro producto génico, conocido como *Timeless* (*Tim*) estaba involucrado en el mecanismo central del reloj. Desde entonces se ha identificado que alelos nulos para cualquiera de los dos genes (*per⁰¹* y *tim⁰¹*) dan como resultado la completa pérdida de la ritmicidad, así como la existencia de alelos, para ambos genes (*per^L*, *per^S* y *tim^L*, *tim^S*), que modifican el periodo. (Yang. Sehgal; 2001) .

En *D. melanogaster*, tanto la vida media de las proteínas como de los mRNAs de *per* y *tim* muestran oscilaciones circadianas robustas, donde el pico de mRNA aparece durante la noche temprana y el de la proteína durante la noche tardía. (Hardin et. al; 1990. Yang. Sehgal; 2001.) Así, se presenta una sucesión de eventos regulados temporalmente, donde se producen retrasos en los picos de los niveles de expresión de los genes y proteínas *dperiod* (*per*) y *dtimless* (*tim*), debido a las modificaciones postraduccionales llevadas a cabo por cinasas y fosfatasas; así como la cinética de dimerización, mediante el dominio funcional de interacción "PAS", de las proteínas PER y TIM para entrar al núcleo y reprimir su propia transcripción (Piccini et. al. 2000).

Tras el aumento en los niveles de mensajero de *dPer* y *dtim*, se observa un incremento en la formación del heterodímero de las proteínas PER/TIM en el citoplasma, cuyo pico muestra un retraso de 6 h con respecto al del mRNA. Este retraso está mediado, en parte, por las cinasas DoubleTime (DBT) y la Casein Kinasa, que fosforilan a Per y promueven su degradación por la vía del proteosoma. (V. Sheeba et. al; 2008)

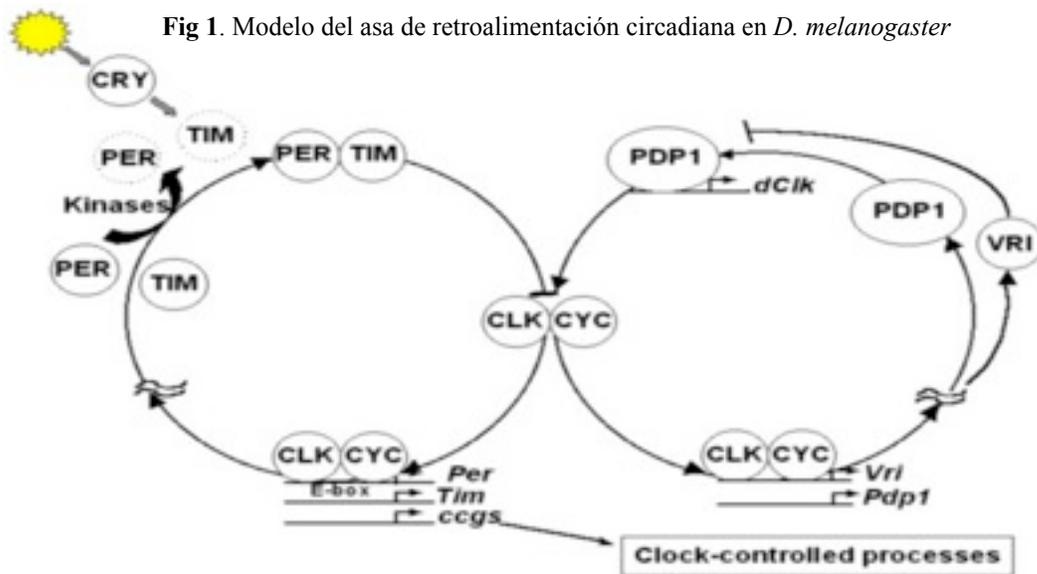
En el paradigma convencional, las proteínas del reloj interactúan entre ellas para formar un asa de retroalimentación, de tal modo que los productos de la traducción de los genes *dClk* y *dCyc*, se relacionan para formar un complejo de factores de transcripción (CLK/CYC) que se une a las secuencias "E-box" en los promotores de los genes *dPer* y *dTim*, activando su transcripción (Rubin et. al. 2006). Por ello, Clk y Cyc constituyen los elementos positivos del asa de retroalimentación. El heterodímero PER/TIM se trasloca al núcleo para inactivar a CLK/CYC y así inhibir su propia transcripción (Rubin et. al; 2006, Kiriakou P. et. al; 2008, V. Sheeba et. al; 2008), siendo entonces, Per y Tim, los elementos negativos del asa.

Sin embargo, se ha demostrado que la traslocación de Per y Tim al núcleo, puede ocurrir independientemente de la existencia del dímero. En estudios *In vitro* en células S2; se observa que la formación del dímero antecede a la disociación y entrada independiente de las proteínas al núcleo; lo que ha llevado a la sugerencia de que la formación del complejo PER/TIM podría tener la función de un cronómetro que mide el intervalo previo al evento de entrada al núcleo (V. Sheeba et. al; 2008).

El reloj molecular es sincronizado a la luz por medio del criptocromo dCry, una foto-proteína que absorbe el espectro de luz azul y UV. Se cree que dCry se asocia a dTim en presencia de la luz, para promover su rápida degradación por la vía del proteosoma (Rosato et. al; 2001), impidiendo así la formación del heterodímero. Las moscas con mutaciones en el gen *dCry* son insensibles a pulsos de luz en condiciones de oscuridad constante (OO) proponiendo a Cry como indispensable para la sincronización (Van Gelder y Sancar; 2003)

En *Drosophilla*, el complejo dClk-dCyc, están relacionado con otra asa de retroalimentación que autorregula los ciclos de producción de dClk uniéndose a los promotores de los genes *vri* (*Vri*) y *par domain protein-1ε* (*pdp1ε*). La proteína PDP1 activa la transcripción de *Clk*, mientras que *Vri* la inhibe competitivamente (Sheeba et. al; 2008). Formando así los elementos negativos y positivos de la segunda asa. De modo que *dClk* se expresa circadianamente y cicla en antifase a *dPer* y *dTim* (Rubin et. al; 2006). Sin embargo estudios recientes sugieren que el papel de *Vri*, podría no ser trascendental en el funcionamiento del reloj (Kim and Edery, 2006).

Además de su función en el reloj central, se cree que *Clk*, una proteína con un dominio BHLH, que, como se menciona anteriormente, está relacionado con la activación de la transcripción génica y un dominio PAS de interacción proteica, regula los niveles de mRNA de varios genes de salida. En este modelo se asume que las modificaciones postraduccionales son las que determinan la longitud del periodo y la fase de los ritmos generados por el oscilador. La amplitud del ritmo podría ser regulada por diversos factores cuya transcripción esta mediada por *Clk*, entre los que se encuentra el reciente candidato *clockwork orange* (*cwo*) (V. Sheeba et. al; 2008. Hardin; 2000).



Se muestra como se cree que están conformadas las asas moleculares de retroalimentación acopladas que dan lugar a los ritmos circadianos. En el esquema se identifican los elementos negativos (—|) y positivos (—>) del asa

Una comparación entre los mecanismos para la generación de ritmos en vertebrados y las moscas, nos muestra que existe un alto grado de conservación, no solo en el diseño y funciones generales del reloj, sino en que genes similares están involucrados en el modelo molecular circadiano. Sin embargo, algunos de estos genes parecen haber tomado diferentes funciones en el reloj de la mosca de la fruta que en el de ratón (*Mus musculus*) (Rubin et. al; 2006).

Estudios en los genes de mamíferos, sugieren un papel similar para los homólogos del gen *per* en ratón (*mper*). En *Drosophilla* el mRNA del gen *clock*, oscila de modo circadiano; sin embargo en el ratón no es este gen que oscila, sino *Bmal1* (Siendo mBMal1 el ortólogo de dCyc). Por esto, pareciera que el mecanismo general del reloj ha sufrido diversas variaciones, tal vez con algunas de las mismas moléculas llevando a cabo tareas ligeramente diferentes incluso entre linajes cercanos. (Piccini et. al. 2000)

En mamíferos existen tres homólogos de *Per* y dos homólogos de *Cry*. A comparación de las moscas, en los mamíferos la expresión de *Clock* es constitutiva tanto en el núcleo supraquiasmático, como en los osciladores periféricos (Alvarez 2004). En *Mus musculus* mCry es un elemento central de los marcapasos moleculares, ya que interactúa con mPer, cumpliendo una función similar a la de dTim, traslocándose al núcleo para inhibir la actividad transcripcional de mClock-mBMal1 (Rubin et. al. 2006). Además, la actividad de mCry parece no depender de la luz, siendo los fotorreceptores de las células ganglionares con proyecciones al NSC, la vía de entrada de la luz al reloj (Looby P. Loudon A. 2005), En algunas de estas células ganglionares existen pigmentos como las melanopsinas y probablemente ciertos criptocromos que envían información al NSQ a través de una vía distinta a la visual, el tracto retino hipotalámico.

Para el caso de estos organismos, el descubrimiento de nuevos componentes como las proteínas Rev-ErbB, Dec1 y Dec 2 que tienen una acción negativa sobre la transcripción de Bmal1, ha añadido un circuito negativo que tiene influencia sobre el asa de retroalimentación central, sugiriendo la existencia de un sistema más complejo que involucra más de un asa de retroalimentación interactuando entre sí. (Roenneberg T. Merrow M., 2003).

Los genes *Per2* y *Per3* ambos, se han encontrado expresados en mamíferos, aves, peces, y anfibios. De igual manera se han descrito dos formas de *Bmal*, *Clock* y dos homólogos de criptocromos, *Cry1* y *Cry2*. En el caso de *Per*, se ha observado su presencia y oscilación en retina, corazón, pulmón y ovarios de aves y mamíferos. Para el caso de las aves, se ha descrito que los genes *Bmal* tienen una correspondencia del 93% y 65% con los genes *Bmal1* y *Bmal2* humanos respectivamente. Poco se sabe sobre los mecanismos moleculares del reloj de reptiles y mucho menos en crustáceos.(Williams 2004).

En el modelo biológico del anfibio *Xenopus laevis*, se han descrito genes *Clock*, *Bmal*, *Cry* y dos genes *period* homólogos para los otros grupos de vertebrados e invertebrados (*Drosophila*), *xPer1* y *xPer2*. A diferencia de las aves y otros vertebrados, el nivel de expresión de *Per* es alto únicamente en la retina; en donde, *xPer1* oscila espontáneamente en condiciones de luz constante. Por su parte, en el pez cebra (*Danio rerio*) el escenario es ligeramente diferente, donde *zPer1* es regulado por la luz, pues en condiciones de luz constante es expresado constitutivamente. Para el caso del pez cebra específicamente, se ha descrito un homólogo de *Clock* llamado *zClk*, el cual presenta una correspondencia del 80% con mamíferos y del 53% con *Drosophila* (Wijnen, 2006).

No existe duda de que los componentes moleculares identificados en diversas especies constituyen una parte esencial del sistema circadiano. Aún cuando, diferentes especies pueden usar distintos tipos de proteínas o utilizar proteínas ortólogas en tareas completamente distintas, la mayoría de los sistemas circadianos funcionan bajo la forma de asas de retroalimentación interconectadas (Roenneberg T. Merrow M., 2003)

Los modelos moleculares del reloj se conciben actualmente como una extensa red de asas de retroalimentación interconectadas, sin que exista una verdadera reconsideración sobre el modelo del asa. Sin embargo, existe una serie de observaciones anómalas, que no encajan con las predicciones del modelo molecular ortodoxo del asa de retroalimentación (Lakin-Thomas; 2006)

Con la finalidad de dilucidar el verdadero mecanismo detrás de la expresión de los ritmos biológicos y comprender la función de los genes del reloj; es necesario identificar y caracterizar funcionalmente los homólogos de los distintos mensajeros relacionados con el sistema circadiano. En el presente trabajo, se pretendió identificar los genes *Per* y *Clock* que forman una parte esencial en el paradigma actual y oscilan en antifase en *D. melanogaster* ; con el propósito de comparar el comportamiento de dichos genes y comenzar a generar un modelo para el acocil.

2.3 El sistema circadiano del acocil *Procambarus clarkii*

El acocil *Procambarus clarkii* es un crustáceo decápodo que pertenece al grupo monofilético de los reptantia de agua dulce. Los acociles han sido utilizados ampliamente en estudios que van desde la oncología, la fisiología hasta la ecofisiología, por lo que pueden ser considerados un importante modelo biológico. (Sinclair et. al; 2004).

P. clarkii es originario del norte de México y el sur de los Estados Unidos, pero dada su importancia económica ha sido introducido en todos los continentes y actualmente representa una amenaza al equilibrio de los ecosistemas donde es exótico (TL web project 2009 / Castañon Cervantes et. al. 1996)

Fig. 2 El acocil *Procambarus clarkii*



El sistema endocrino del acocil esta constituido por diversos órganos que pueden ser de origen neural o epitelial. El sistema neuroendócrino esta compuesto por los órganos del sistema Órgano X - Glándula Sinusal (OX-GS), el órgano postcomisural y el órgano pericardial. El OX-GS es el centro endocrino del acocil, esta constituido por el Órgano X (OX), que es un conglomerado de células neurosecretoras localizadas en la periferia de la medula terminal; y la Glándula Sinusal (GS), que son principalmente las terminales axónicas de las neuronas del OX , que descargan las hormonas en la hemolinfa (Vogt G; 2002).

El sistema nervioso central de *Procambarus clarkii*, al igual que el resto de los crustáceos decápodos, esta conformado por un cordón nervioso ventral recubierto por una capa de tejido conectivo. A lo largo del cordón se localizan 11 ganglios pareados unidos transversalmente por comisuras y longitudinalmente por conectivos. El más rostral es el ganglio cerebroide que en realidad se constituye por tres grupos de ganglios fusionados que reciben el nombre de protocerebro central, deutocerebro y tritocerebro, siendo este último el más caudal (Prieto-Sagredo; 2002).

En el protocerebro se localizan los ganglios ópticos compuestos por la lámina ganglionaris, la medula externa, la medula interna y la medula terminal, también denominada protocerebro lateral. El protocerebro parece ser el principal encargado de procesar la información visual y se cree que controla el sistema endocrino al regular las neuronas del sistema OX-GS. En el deutocerebro encontramos los lóbulos olfatorios y los lóbulos accesorios. Este segmento del cerebro es responsable de la integración y procesamiento de la información olfatoria. Por su parte, el tritocerebro esta formado por los neurópilos antenulares, los ganglios comisurales y la comisura post-esofágica (Vogt G; 2002).

El ganglio cerebroide se une al ganglio subesofágico a través de un par de conectivos que rodean el esófago, los conectivos circumesofágicos. Por debajo de este se encuentran cinco ganglios torácicos seguidos de otros seis ganglios abdominales. De cada ganglio parten nervios con fibras sensoriales y motoras que van a constituir el sistema nervioso periférico (Prieto-Sagredo; 2002).

Es bien sabido que los acociles son animales de comportamiento nocturno y se cree que el sistema nervioso esta involucrado en dichos patrones de actividad (Castañon C; 1996). Se han descrito diversos ritmos circadianos en la fisiología, metabolismo y comportamiento de estos animales. Uno de los primeros ritmos estudiados y bien conocidos de los crustáceos, en particular de los acociles, es el ritmo de actividad locomotora.

Kalmus en 1938 demostró que el ritmo de actividad se manifestaba incluso en condiciones constantes y propuso al sistema neurosecretor del tallo ocular como el marcapaso que controla dicho ritmo. Sin embargo Page y Larrimer (1975) realizaron experimentos donde el ritmo locomotor persistía incluso con el tallo ablacionado y la ritmicidad desaparecía al cortar las conexiones circumesofágicas que conectan el ganglio supraesofágico o cerebroide con el centro locomotor torácico; proponiendo a dicho ganglio como un posible marcapasos (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo; 2003)

En el acocil adulto y en presencia de un ciclo LO 12:12, el ritmo de actividad locomotora ha sido descrito como un ritmo que en algunos animales es unimodal y en otros bimodal y es un comportamiento guiado por un oscilador circadiano probablemente localizado en el ganglio cerebroide y/o los lóbulos ópticos (Page y Larimer; 1975).

Otro de los fenómenos cíclicos que han sido ampliamente estudiados en *P. clarkii* es el ritmo de amplitud del electrorretinograma (ERG); que es el resultado de las variaciones diarias en la amplitud de respuesta del fotorreceptor retiniano a pulsos de luz y se ha propuesto que estas variaciones dependen de los cambios en la sensibilidad del fotorreceptor, así como en la posición de los gránulos de pigmento proximales y distales (Aréchiga et. al. 1993). De modo que los pigmentos proximales (PP) se concentran en la oscuridad y se dispersan con la luz.

Se cree que este ritmo esta controlado tanto por estructuras neurales como neuroendócrinas del cerebro y estructuras neurosecretoras del Lóbulo Óptico, en particular el complejo OX-GS (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo; 2003). Además de ser regulado por la luz; se ha observado que,

la melatonina es capaz de sincronizar el ritmo de ERG, proponiendo a este neurotransmisor como un sincronizador no fótico (Solís-Chagoyan. et. al; 2008)

La variación circadiana a la sensibilidad retinal, medida como cambios en la amplitud del ERG esta acompañada por movimiento rítmico de los pigmentos. De modo que la mayor amplitud de ERG se presenta cuando los pigmentos están en posición de oscuridad y menor amplitud, cuando los pigmentos se encuentran adaptados a la presencia de luz (Fanjul-Moles, Prieto-Sagredo; 2003).

Welsh describió por primera vez la existencia de ritmos circadianos en la migración de los pigmentos retinianos accesorios (Prieto-Sagredo; 1992). En los crustáceos, la migración de los gránulos de pigmento en los cromatóforos tegumentarios de las células retinales se da como resultado de la acción de la serotonina (5HT), dopamina y norepinefrina; que promueven la activación de la hormona dispersora del pigmento distal (PDH) y la hormona concentradora del pigmento (RPCH) en el complejo ocular. Así, los pigmentos se dispersan durante el día y se concentran por la noche, donde el pigmento distal se mueve hacia el extremo de la cornea en el ojo compuesto, mientras que el pigmento proximal migra en la dirección opuesta, dejando el área del rabdomo expuesta a la luz. Esto se presenta incluso en condiciones constantes. (Martínez-Pérez et. al; 2005).

También se ha descrito la presencia de ritmos de secreción neuroendócrina, como el de la hormona hiperglicémica de los crustáceos (CHH) que es sintetizada y secretada por el sistema OX-GS y la retina de acociles tanto jóvenes como adultos, y cuya secreción es regulada por la 5HT, al igual que el de otras neurohormonas. Se ha sugerido una posible relación entre la secreción de CHH y los ritmos circadianos en el complejo ocular. (Escamilla-Chimal et. al; 2002 / Prieto-Sagredo; 1992).

Se ha hecho un gran esfuerzo por localizar físicamente al oscilador o los osciladores y las vías de sincronización que controlan los elementos que contribuyen a la ritmicidad en los acociles. Page y Larimer en 1975 propusieron al ganglio supraesofágico como el marcapaso central; sin

embargo, se ha demostrado que el ritmo de amplitud del ERG se manifiesta incluso en el tallo ocular ablacionado, lo cual sugiere un control local de la oscilación, e incluso se ha propuesto a la retina como un oscilador autosustentable. (Aréchiga y Rodríguez-Sosa; 1998).

En cuanto a las vías de sincronización, se ha observado que, junto con los receptores retinianos, existen otras estructuras extrarretinianas fotosensibles capaces de transmitir señales al sistema circadiano. Tal es el caso de las neuronas fotorreceptoras caudales localizadas en el sexto ganglio, que controlan el movimiento fototáctico negativo efectuado por las patas traseras del acocil. Este ganglio presenta una frecuencia de disparo de potenciales de acción espontáneo, que incrementa al estimularlo con luz (Prieto-Sagredo y Fanjul-Moles; 2001). Además, se ha observado que pulsos de luz en la zona caudal provocan adelantos de fase en el ritmo de ERG cuando son suministrados en la noche subjetiva temprana, y retrasos en la noche subjetiva tardía (Bernal-Moreno et. al. 1996).

Estos autores, realizaron experimentos donde demostraron que las frecuencias de disparo en dos neuronas del sexto ganglio presentan cambios endógenos que oscilan alrededor de las 24 h. Estos resultados sugieren que estas células pueden actuar no solo como fotorreceptores y transmisores de órdenes motoras, sino también como un oscilador circadiano encargado de regular conductas. Por otra parte, resultados de laboratorio no publicados, han mostrado que la cadena ganglionar ventral expresa proteínas reloj como Per y TIM (Velazquez-Amado; 2008).

Anteriormente Page y Larimer (1976) propusieron la existencia de un fotorreceptor circadiano cerebral. Recientemente el grupo de Sullivan *et. al.* (2009) ha realizado experimentos donde se muestra como los fotorreceptores cerebrales son suficientes para sincronizar el reloj aún en la ausencia de fotorreceptores caudales y retinianos. Toda esta evidencia, parece indicar que en el acocil, como en otros organismos, el sistema circadiano es multioscilar y cuenta con más de una vía de sincronización fótica.

Además se han estudiado algunos aspectos referentes al desarrollo ontogénico de los ritmos de actividad locomotora y del electroretinograma planteando la posibilidad de que los osciladores encargados de ambos ritmos no son necesariamente el mismo (Fanjul-Moles et. al 1996)

A pesar de que existe un gran número de trabajos con respecto al sistema circadiano del acocil; es muy escaso el conocimiento tanto de la expresión como del funcionamiento del reloj circadiano a nivel molecular y genético en los crustáceos. En general se han reportado tanto la expresión de la proteína PER en la retina y la lámina ganglionaris (Aréchiga y Rodríguez-Sosa; 1998) como la expresión de ritmos circadianos significativos de la proteína CRY en el protocerebro medial y oscilaciones no significativas en el protocerebro lateral el tallo ocular (Fanjul Moles et. al; 2004 / Escamilla-Chimal y Fanjul-Moles , 2008). Además, se ha visto que tanto Per como Tim muestran patrones de expresión temporal diaria en la lámina la médula del tallo ocular así como en el protocerebro medial (Escamilla-Chimal et. al. 2007)

Hasta el momento no se ha reportado la secuencia de ninguno de los genes conocidos como genes reloj en el acocil. En los crustáceos, solamente se ha secuenciado el gen *Clock* en el langostino *Machrobrachium rosenbergii* (Gene Bank: AY842303.1) y un fragmento de *Per* en el cangrejo *Callinectes sapidus* (Gene Bank: AAL77484.1). Por ello, son necesarios estudios que amplíen nuestro conocimiento, de modo que se puedan vislumbrar las respuestas a las distintas preguntas de como opera el mecanismo circadiano en el acocil.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Clocks slay time...
time is dead
as long as it is being
clicked off by little wheels;
only when the clock stops
does time come to life.

(William Faulkner)

Las bases moleculares del reloj circadiano se han estudiado en diferentes organismos proponiéndose diferentes paradigmas aunque en general el mecanismo consiste en una doble asa de retroalimentación transcripción-traducción interconectada. (Roenneberg y Merrow; 2003).

Sin embargo, un cúmulo de evidencias recientes han puesto en duda el papel de las oscilaciones de RNA mensajero en la maquinaria del marcapasos (Yang y Sehgal; 2001 / Merrow et. al; 2005. / V. Sheeba et. al; 2008). Por ello, con el objetivo de descifrar los mecanismos que dan como resultado la expresión de los ritmos biológicos, resulta importante desarrollar una comprensión global y comparada del comportamiento y características de los genes del reloj en diversas especies, que nos permita la estructuración de un modelo coherente que defina la función de los genes con sus peculiaridades en cada organismo.

Existe, día con día, un aumento considerable en el conocimiento del comportamiento de los genes reloj en diversos organismos, especialmente en insectos y mamíferos; pero particularmente en modelos biológicos usados comúnmente como *D. melanogaster*, *Mus musculus*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*. El acocil *Procambarus clarkii*, un organismo en el que se ha caracterizado un sistema circadiano multioscilar de naturaleza jerárquica, parece ser un buen modelo para este tipo de estudio.

Para lograr integrar un paradigma del comportamiento molecular del reloj, uno de los primeros pasos a seguir es la caracterización de los genes que se cree están involucrados en el sistema, es decir, la amplificación, clonación y análisis de la secuencia; así como el estudio de su patrón de expresión diario. Seguido de la caracterización morfofisiológica tanto de los mensajeros como de las proteínas. Por último, de ser posible, el análisis dirigido mediante mutaciones o RNA de interferencia, para observar las manifestaciones relacionadas con la expresión de determinados genes.

Planteamiento del problema

El acocil *P. clarkii*, ha sido un modelo ampliamente utilizado en el estudio de los ritmos circadianos controlados por la función periódica del sistema nervioso (Fanjul-Moles, Prieto-Sagredo; 2003). Aunque no se han descrito los mecanismos moleculares del reloj en el acocil, trabajos de nuestro laboratorio han aportado información sobre el comportamiento de algunas de las proteínas reloj (Escamilla-Chimal et. al. 2007). En cuanto a CLK, no existen resultados sobre el comportamiento de la proteína en *P. clarki*. Sin embargo, experimentos en *M. rosenbergii* indican que el gen no oscila al lo largo del día (Yang et. el. 2006).

4. HIPÓTESIS

Los genes Clk y Per, por tener homólogos con altos grados de similitud en diversos organismos, también deben estar presentes en el genoma del acocil *Procambarus clarkii* y podrían ser expresados rítmicamente en el ganglio cerebroide, que es considerado un posible marcapaso del sistema multioscillatorio de este animal .

5. OBJETIVOS

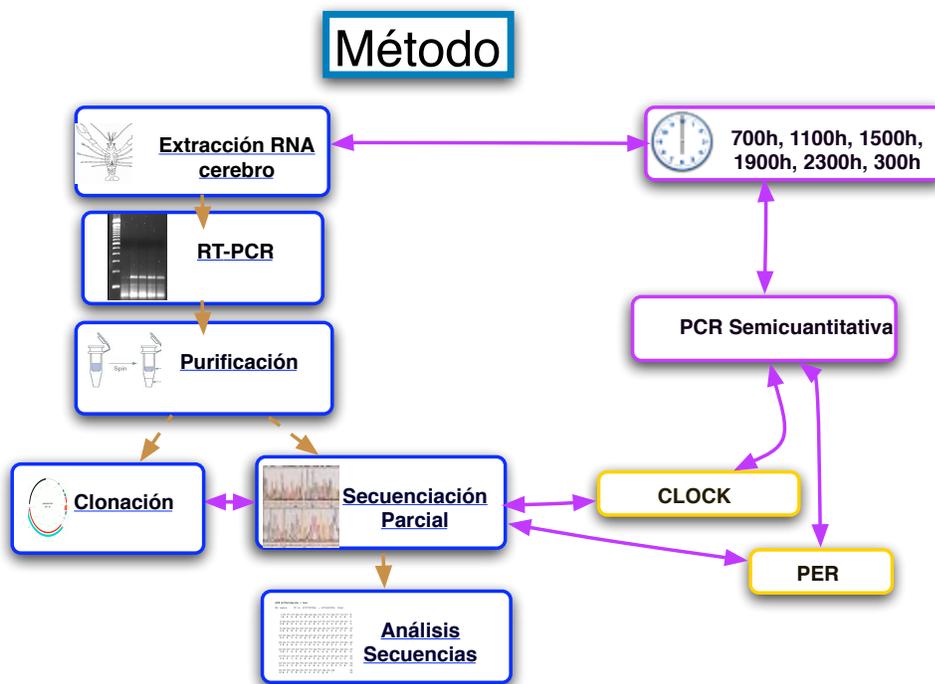
5.1 Particular:

Caracterizar a partir del cDNA el RNA mensajero de los genes *Per* y *Clk* en una de las estructuras centrales propuestas como un posible marcapaso del sistema circadiano de *Procambarus clarkii*, el cerebro, así como determinar si existe un efecto del tiempo circadiano del animal sobre la abundancia en la expresión de estos dos genes.

5.2 Generales:

- Diseñar un conjunto de cebadores que amplifiquen los genes *Per* y *Clk* en el acocil.
- Purificar y secuenciar los productos amplificados por las distintas combinaciones de cebadores
- Identificar y clonar las secuencias que presenten un mayor grado de identidad con los genes reloj reportados para otros organismos.
- Mediante una RT-PCR semicuantitativa hacer un estudio funcional de la ritmicidad diaria de las secuencias con mayor grado de identidad.

6. MATERIAL Y MÉTODO



The only reason for time
is so that everything
doesn't happen at once.

(A. Einstein)

6.1. Animales y diseño experimental

Dos lotes de 45 acociles *Procambarus clarkii* cada uno, se mantuvieron: Lot. 1 en fotoperiodo LD12:12 (700h = zt0) y Lot. 2 en fotoperiodo invertido DL12:12 (1900h = zt0), durante una semana antes del experimento, con el objeto de poder extraer las muestras del día y de la noche en el mismo momento. Se utilizaron adultos sin distinción de sexo y en etapa de intermuda, los animales fueron alimentados *ad libitum*. El Lot. 1 se dividió en 3 grupos de 15 animales de los cuales se disectó el grupo 1 a las 1100h (zt 4), grupo 2 a las 1500h (zt 8) y grupo 3 a las 1900h (zt 12). Con el Lot. 2 se hizo lo mismo y se disectó a las mismas horas (tiempo real) correspondientes a los zt 16, zt 20 y zt 0, respectivamente.

6.2. Diseño de cebadores (oligonucleótidos/ primers)

Se buscaron, en la base de datos de Gene Bank, las secuencias reportadas de los genes circadianos *Clock* y *Period* de diferentes especies tanto de vertebrados como de invertebrados entre ellos: *Drosophilla melanogaster* (Gene Bank: *Clock* AAC62234 y *Per* NM_080317), *Antherea sp* (Gene Bank: *Clock* AAR14936 y *Per* APU12769), *Bombix mori* (Gene Bank: *Per* AY526605), *Mus sp.* (Gene Bank: *Clock* AAC53200 y *Per1* NM_001159367), *Xenopus laevis* (Gene Bank: *Clock* AF203107), *Machrobrachium rosenbergii* (Gene Bank: *Clock* AY842303.1) y otros. Así como las respectivas secuencias de aminoácidos.

El conjunto de secuencias correspondientes a cada gen se alinearon utilizando el programa Clustal W (EMBL-EBI) para detectar homologías tanto entre la secuencia de pares de bases como en la de aminoácidos, localizando preferencialmente aquellas que estuviesen dentro de los dominios funcionales de cada gen (Anexo 1).

Con base a dichas secuencias conservadas y utilizando la tabla de preferencia de codones para el acocil *P. clarkii* (CITA), se diseñaron pares de cebadores sentido y antisentido (Tabla 1. Anexo 1) para su uso en la técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction). Para ello se utilizó el programa

Material y método

Oligo v.4.1 (National Bioscience Inc) buscando que la temperatura de alineación (TM) fuese alta (entre 60 y 70 °C), que el perfil del oligo presentara una buena estabilidad interna y la probabilidad de formación de dímeros fuese baja.

6.3. Extracción de RNA

Se extrajo el RNA total del cerebro, tallo y cadena ganglionar en distintos tiempos circadianos (300, 700, 1100, 1500, 1900, 2300 h, tiempo real). Para ello se tomaron de 10 a 15 acociles *P. clarkii* en un fotoperiodo LD 12:12 (Lot. 1) para las extracciones del día y aquellos del Lot. 2, en fotoperiodo invertido, para las extracciones de la noche.

Se procedió a la extracción de tejido nervioso del ganglio cerebroide sacrificando al animal por decapitación, lo más rostral posible, prestando especial cuidado en evitar derramar los líquidos estomacales sobre el resto de los tejidos. La disección se hizo sumergiendo los tejidos en una solución estabilizadora del RNA (RNAlater, Ambion).

Una vez colectados 15 cerebros (aproximadamente 150 mg de tejido) se colocaron en un tubo de 1.5 ml con 250 µl de Tripure (Roche), un reactivo que permite aislar DNA, RNA y proteínas de la misma muestra mediante una separación de la fase líquida.

Los tejidos se homogeneizaron utilizando un pistilo de plástico estéril. La mezcla se centrifugó a 12, 000 x por 10 min a 4 °C. Se retiró y transfirió el sobrenadante, que contenía proteínas, RNA y DNA, en un tubo estéril de propileno, al que se le agregó 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de TriPure inicial. Se incubó 15 min y se centrifugó 12, 000 x por 15 min a 4 °C.

En el tubo se separaron tres fases, de las cuales se tomo la fase acuosa superior (traslúcida) y se transfirió a un nuevo tubo, agregando 0.5 ml de isopropanol 100% por cada ml de Tripure inicial, mezclando e incubando 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min. La pastilla

(pellet) de RNA total, producto de la precipitación por isopropanol, se lavó con etanol al 75% y tras centrifugarlo y retirar el exceso del alcohol, se resuspendió en 30 µl agua estéril, desionizada, libre de RNAsas (tratada con DEPC) a 60 °C.

El RNA obtenido para cada hora se cuantificó con el uso de un espectrofotómetro de masa Ultrospec 200 (Amersham Pharmacia Biotech) diluyendo 2 µl de muestra en 500 µl de agua desionizada (Fd=4) y se calculó la cantidad utilizando la relación de Sambrook (F. Martínez-Pérez; 2005) donde:

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

De modo que: $RNA\ ng/\mu l = (DO\ (Abs\ 260\ nm) \times 40\ \mu g/ml / Fd) \times 1,000.$

Dicha cuantificación se corroboró corriendo un gel de agarosa desnaturalizante de RNA de 40 ml al 1.2%. Con 4 ml de MOPS 10X y 6.6 ml de formaldehído. Las muestras se prepararon con 2 µl de MOPS 10X, 3 µl de formaldehído y 3 µl de formamida. Los geles se corrieron a 50 V por 90 min.

6.4 . RT - PCR

Para la amplificación de *per* y *clock* se corrieron reacciones de RT (transcripción reversa) utilizando 2 µg de RNA total de cerebro de las 300, 700, 1100, 1500, 1900, 2300 h, respectivamente. utilizando el kit Gene Amp PCR Core Kit (Applied Biosystems) con una concentración de MgCl 5 mM y DNTP's 10 mM; amplificando con cebador de oligos dT a una concentración 100 pM, los cuales sintetizan cDNA a partir de RNA total con cadenas de poli A, como el caso del RNA mensajero (mRNA). (Haddad F; 2007) en un termociclador programado con un ciclo de 10 min a 25 °C, 15 min 42 °C y se mantiene a 4 °C

Como control, para corroborar la calidad del cDNA producto de cada grupo de reacciones de RT con RNA de las diferentes horas, se corrieron reacciones de PCR utilizando los cebadores para amplificar el péptido relacionado a la taquinina (TRP), perteneciente a una familia de neuropéptidos que se relacionan con distintas funciones en el sistema nervioso central y periférico de varios organismos y cuya secuencia y cebadores han sido reportados previamente para el acocil (Y. Yasuda-Kamatani. y A. Yasuda; 2004). Dicha amplificación de TRP sirvió como control de calidad del RNA y partir de esto se determinaron los lotes de cDNA a utilizar en las reacciones de PCR.

Con el cDNA obtenido de las RT, se corrieron reacciones de PCR de 25 μ l, con una concentración de MgCl 2 mM, para las diferentes combinaciones de cebadores Sentido (Up) y Antisentido (Dwn) diseñados, a una concentración 100 pM. Además se probó con 3 distintas temperaturas de alineación ($T_m \pm 5^\circ\text{C}$).

Posteriormente se realizó una electroforesis de las muestras amplificadas en un gel de Agarosa 1.5%, TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio 1:10. Las muestras se prepararon con Buffer de carga "TrackIt" (Invitrogen) y bromuro de etidio 1:10. Para aquellas combinaciones de cebadores que mostraron bandas, se rediseñaron reacciones de PCR de 100 μ l cuyos productos fueron purificados, secuenciados y clonados posteriormente.

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

En el caso de *per*, se trabajó con las combinaciones de cebadores: PER up1-1dwn , y PER up1-dwn2. Para *clock*, se amplificaron los productos obtenidos de la combinación de oligos CLK up2-dwn4, CLK up1-dwn4 y CLK up1-dwn3.

Material y método

6.5 . Purificación del cDNA

Para la purificación de los productos obtenidos se separaron los fragmentos amplificados utilizando un gel preparativo con agarosa de baja temperatura de fusión, que permite manipular y recuperar los ácidos nucleicos, después de una electroforesis, sin dañarlos. Las bandas se cortaron y se colocaron en tubos de 1.5 ml a baño maría a 70 °C para derretir el gel. Se purificaron las bandas utilizando un kit de miniprep (Promega) con microcolumnas. Para ello se adhirió el DNA a la resina y se paso a través del filtro en la microcolumna con ayuda de una jeringa de 3 ml, posteriormente se lavó con 2 ml de isopropanol al 80% y se centrifugó la columna adaptada a un tubo de 1.5 ml, el líquido depositado en el tubo fue desechado y en la columna, el DNA purificado se eluyó en 35 a 50 µl de agua estéril a 65 °C y se centrifugó durante 30 seg. para recuperar el material en un nuevo tubo. El producto se almacenó a -20 °C.

Tras la purificación, se realizó la cuantificación del material obtenido. Para ello, se utilizaron dos técnicas que se complementan con la finalidad de tener una estimación más precisa:

- 1) Se cuantificó el DNA por espectrofotometría y se calculó el índice de pureza (Abs_{260}/Abs_{280})
- 2) Se corrió una electroforesis en un gel de agarosa con un marcador de masa (Fago λ - HindIII), contra el cual se comparó estimó la cantidad de nucleótidos en la muestra. De acuerdo con los datos arrojados por el espectrofotómetro.

La cuantificación se realizo con el uso de un espectofotómetro de masa Ultrospec 200 (Amersham Pharmacia Biotech) diluyendo 2 µl de muestra en 500µl de agua desionizada (Fd=4) y se calculó la cantidad utilizando la relación de Sambrook donde:

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

De modo que: $DNA\ ng/\mu l = (DO\ (Abs\ 260nm) \times 50\ \mu g/ml / Fd) \times 1,000.$

Material y método

Dicha cuantificación se corroboró corriendo un gel de agarosa al 1.5%.

Por este medio nos fue posible identificar si las muestras estaban significativamente contaminadas por aminoácidos y establecer si se contaba con la cantidad suficiente de DNA para la determinación de la secuencia.

Los productos se secuenciaron tanto en el Instituto de Biología de la UNAM, con el apoyo de la Dra. Laura Márquez, así como en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

6.6 . Clonación

Los productos identificados como posibles homólogos de los genes *clock* y *per*, se clonaron utilizando bacterias supercompetentes Match1-1 incluidas en el kit Topo-TA cloning (Invitrogen). Sin embargo, dada la dificultad para obtener resultados positivos repetitivos, se decidió preparar bacterias supercompetentes DH5- α . Para ello, se incubaron las bacterias en medio LB y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C.

Posteriormente se tomaron 5 ml y se mezclaron con 500 mL de medio LB en un matraz de 2 L. Las células se cultivaron a 37 °C, midiendo constantemente la Densidad Óptica: DO_{600nm}. Una vez alcanzada una DO₆₀₀ de entre 0.4 y 0.6 se transfirió, inmediatamente, el cultivo a hielo y después de 10 min se transfirió a tubos Falcon de 500 mL, el cual se centrifugó a 4000 x durante 5 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante para resuspender cuidadosamente la pastilla in 150 mL de buffer CGM. La suspensión se incubó en hielo durante 15 min y nuevamente se centrifugó por 5 min. Se repitió el procedimiento anterior usando 36 mL de buffer y la suspensión se transfirió a tubos de 50 mL.

Finalmente se agregaron 1.25 mL de DMSO incubando en hielo por 5 min. El procedimiento se repitió y se alíquotó la suspensión en tubos estériles de 1.5 mL que fueron rápidamente transferidos a nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -72 °C.

Material y método

Para la clonación se utilizó el plásmido al pGEM T-easy vector (Promega). En el primer paso, se insertó el producto de la PCR (2 -5 μ l) en el vector, es decir, se generó un plásmido recombinante en una reacción de 6 a 10 μ l finales y posteriormente se incubó en hielo una porción de esta reacción junto con 100 μ l de las bacterias DH5- α supercompetentes. Pasados 30 min se dio un choque térmico de 42 °C durante menos de un minuto al tubo con la combinación plásmido bacteria, con el propósito de cambiar la fluidez de la membrana bacteriana y permitir la incorporación de plásmido al interior de la célula.

Posteriormente se agregaron entre 250 y 900 μ l de medio, LB o SOC sin antibiótico, y se dejó agitar el tubo horizontalmente a 200 r.p.m. a 37 °C durante al menos 1 h, para promover el crecimiento de las bacterias, que fueron concentradas, centrifugando la suspensión, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en 50 μ l de LB, que después fue cultivado en un medio sólido.

El cultivo de las bacterias se hizo bajo un ambiente estéril, en cajas de petri con medio LB sólido, al cual se le agregó antibiótico, ya sea Ampicilina o Carboxicilina a una concentración de 50 a 100 μ g/ μ l. Además se agregó, sobre el medio solidificado, 40 μ l de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosida (β -galactosidasa) y 40 μ l de isopropil β -D-thiogalactopiranosido (IPTG), como parte del método "Blue-White screening". Una vez precalentadas las placas a 37 °C, se tomó la suspensión de bacterias y se vertió dentro de la caja de Petri, dispersándola con perlas de vidrio. Dichos cultivos se mantuvieron toda la noche a 37 °C.

El último paso del proceso de clonación, consistió en analizar las bacterias transformantes, producto del cultivo en las cajas de petri, con el propósito de definir cuales tenían el inserto de interés para finalmente purificar y almacenar, secuenciar o retransformar bacterias. Para ello, se eligieron las colonias positivas que resultaron de el uso de la técnica "Blue-White screening", basada en la aparición de colonias blancas cuando hay un inserto en el plásmido y se recultivan en 3 a 5 ml de LB líquido con ampicilina 100 μ g/ μ l dejandose crecer toda la noche con agitación

Material y método

horizontal 200 r.p.m. a 37 °C. Estas se centrifugaron y concentraron hasta formar una pastillat de bacterias a partir del cual se extrajo el DNA y se purificó utilizando el QUIAprep (QIAGEN).

El DNA purificado se cuantificó utilizando el sistema de espectofotometría Nanodrop el cual nos permitió determinar el espectro de absorbancia, el grado de pureza y la cantidad de la muestra de DNA, expresada en ng/μl . Con base en dichas estimaciones se montó una reacción de digestión utilizando 1 μg de DNA total y la enzima ECORI, que reconoce las secuencias aledañas al sitio de inserción del producto de PCR en el plásmido. Las muestras resultantes se corrieron en geles de agarosa al 1.2% para corroborar la presencia del inserto en la clona. Aquellas resultantes positivas se secuenciaron.

6.7 Análisis de secuencias

Los productos se secuenciaron en 2 reacciones, en una de ellas se utilizó el cebador sentido (Up) correspondiente y para la otra el antisentido (Dwn). De este modo, los resultados de cada una se alinearon entre sí utilizando el programa clustal W y se complementaron para conformar un marco de lectura mas preciso.

Para el análisis de las secuencias tanto de PCR, como aquellas resultantes de la clonación, se utilizó el programa BLASTn (Altschul et. al; 1997) , para identificar la homología entre el amplicón y otras secuencias almacenadas en diversas bases de datos. Además se tradujo cada secuencia a los seis posibles marcos de lectura de aminoácidos, mismas que se compararon utilizando el programa BLASTp.

Tanto las secuencias de pares de bases, como aquellas de aminoácidos con un marco de lectura abierto se compararon, por alineación, contra secuencias ya reportadas de cada uno de los genes *per* y *clock* de diferentes especies; utilizando el software ClustalW (EMBL-EBI) así se determinó el grado de identidad entre dichos genes reloj y los productos amplificados por los cebadores diseñados.

Material y método

6.8 . Análisis funcional

Para determinar si existen variaciones en la cantidad de mRNA, presente en el cerebro del acicil; se realizó una PCR semicuantitativa con cDNA de 6 h circadianas (0700 h, 1100 h, 1500 h, 1900, 2300 h y 0300 h) para *per* y *clk*. Utilizando las combinaciones de oligos CLK 2Up-4Dwn, y Per 1Up-1Dwn.

Además se hicieron pruebas control con cebadores de TRP, de modo que se pudiese establecer un parámetro estable de comparación para medir si los fragmentos identificados oscilaban.

Para ello, fue necesario establecer un intervalo de cuantificación lineal, lo cual consistió en montar cuatro reacciones de PCR con distinto número de ciclos (20, 25, 30 y 35) con los parámetros ya establecidos previamente para Clk up2-dwn4 y Per up1-dwn1. Con 2µg de RNA totales para la RT de las 11 y las 22 h, y las temperaturas y tiempos de alineación correspondientes a cada par de cebadores. Así se determinó la cantidad de ciclos donde no se saturaba la reacción, haciendo posible una cuantificación más precisa de la cantidad de RNAm en cada hora circadiana.

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

7. RESULTADOS

No para siempre en la tierra,
Solamente un poco aquí.
Aunque sea jade, se rompe.
Aunque sea oro, se hiende.
Y el plumaje del quetzal se quiebra.

No para siempre en la tierra,
Solamente un poco aquí.

(Nezahualcoyotl de Texcoco)

7.1 Análisis del RNA

Para cada una de las horas se obtuvieron entre 50 y 100 μg de RNA total, cuantificados por espectrofotometría, en cada extracción, los cuales al ser observados en los geles desnaturizantes de RNA, mostraron no estar degradados y tener buenas cantidades de RNAs ribosomales (Fig. 1).

Fig 1. Extracción de RNA del cerebro del acocil a las 1100 h y 2200 h

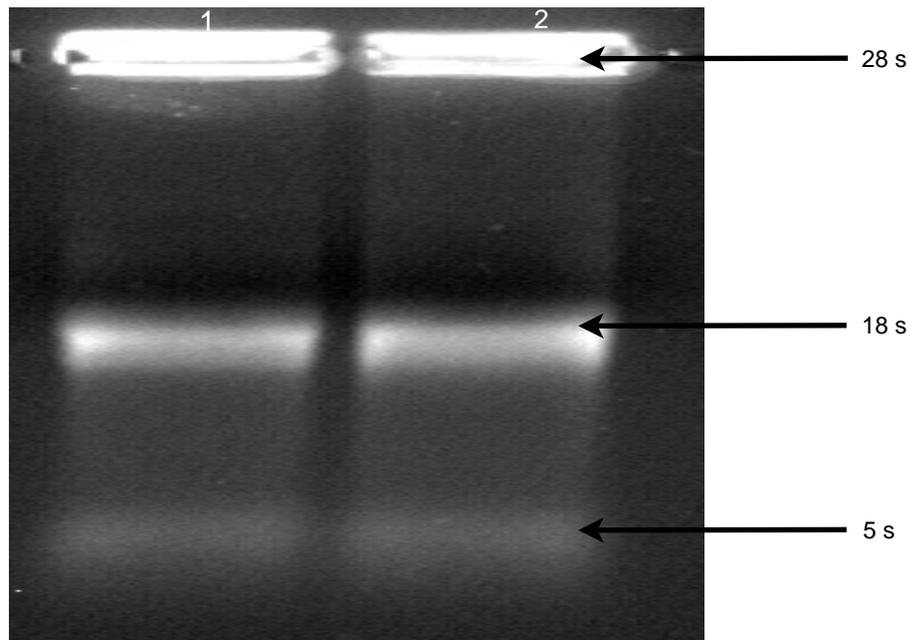


Fig 1. Gel desnaturizante de RNA. Agarosa 1.2% . Se observan las subunidades ribosomales 28s, 18s y 5s para cada extracción. Carril 1: RNA 1100 h. Carril 2: RNA 2200 h

7.2 Establecimiento de las condiciones para la reacción RT- PCR

Para todas las combinaciones de cebadores se montaron reacciones de PCR con cDNA de dos horas extremas (1100 h y 2200 h), además cada combinación de cebadores se probó con 3 diferentes temperaturas de alineación ($T_m \pm 5^\circ\text{C}$). En base a esto se decidió realizar las reacciones subsecuentes con el cDNA de las horas y temperaturas donde las bandas mostraban

Resultados

mejor amplificación, valorada visualmente en forma subjetiva. Los parámetros elegidos se muestran en la Tabla 1.

Las reacciones de PCR se montaron con distintos tipos de enzimas, dos Taq polimerasa de distinta marca (Applied Biosystems y Altezyme) y una Pfx polimerasa (Invitrogen). Para la combinación de cebadores Per Up1-Dwn1, no se mostró diferencia en los productos amplificados entre la Taq polimerasa y la Pfx polimerasa. Sin embargo, para la combinación de oligonucleótidos Clk Up2-Dwn4 la Pfx polimerasa amplifica, además de la banda de 350 pb, un fragmento de 800 pb, de tamaño similar al esperado para dicha combinación de cebadores. En cuanto a la combinación Clk Up1-Dwn4, las reacciones con Pfx aumentan la intensidad de amplificación de la banda de 500 pb.

Tabla 1. Condiciones de la reacción de PCR para las diferentes combinaciones de cebadores.

COMBINACIÓN OLIGOS	PROGRAMA	TEMP ALIN	No. CICLOS	PRODUCTOS AMPLIFICADOS
CLK- 1Up-4Dwn	Inicio: 95 °C 5 m	55 °C	30	- Clk1-4 S 650 pb
CLK-2Up-4Dwn	Desnaturalización: 95 °C 30 s Extención: 72 °C 1m FIN: 72 °C 10 m	55 °C	25	- Clk2-4 S 800 pb - Clk 2-4 I 350 pb
CLK-1Up-3Dwn	Mantener: 4 °C	60 °C	30	- Clk1-3 S 410 pb - Clk 1-3 I 170 pb
PER- 1Up-1Dwn	Inicio: 95 °C 5 m Desnaturalización: 95 °C 30 s Extención: 72 °C 1m	55 °C	20	- Per1-1 S 250 pb - Per 1-1 I 150 pb
PER-1Up-2Dwn	FIN: 72 °C 10 m Mantener: 4 °C	55 °C	25	- Per 1-2 S 250 pb

Resultados

7.3 Identificación de un posible fragmento de *P. clarkii Clock*

Las bandas amplificadas y purificadas (Tabla. 2) de las diferentes combinaciones de cebadores diseñados para la amplificación del gen *Clock* se secuenciaron y se llevo a cabo un extenso análisis de cada una de ellas.

Para la combinación de cebadores Clk Up1-Dwn4 se amplificó una banda clara arriba de los 500 pb, y por debajo se observó una masa que podría contener mas de una banda, por ello se purificó solamente la banda superior y se corrieron más reacciones de PCR para el mismo producto. Esta vez, el gel preparativo se elaboró a una mayor concentración (2%) con lo que se logró separar una banda por debajo de los 500 pb (Fig. 2c), la cual se purificó y secuenció, sin embargo, a pesar de múltiples intentos, no se pudo obtener una secuencia identificable. Una posibilidad es que varios productos de tamaños similares estuviesen amplificados dentro de la misma banda. El análisis de la secuencia de 500 pb muestra identidad con diversos productos génicos, pero ninguno de ellos relacionado con el reloj biológico (Tabla. 2).

Para la combinación de cebadores Clk Up1-Dwn3 observamos 2 bandas: la mayor de alrededor de 450 pb y la mas pequeña de 100 pb (Fig. 2a). Mientras que para la combinación de cebadores Clk up2-dwn4 se amplifican 3 bandas de 800, 350 y 150 pb (Fig. 2b).

El producto que mostró mayor identidad con otros genes *Clock* de diversos organismos, en particular con el crustáceo *M. rosenbergii* (Tabla 2) fue el amplificado por Clk Up2-Dwn4 banda M , cuya intensidad de brillo en todas las muestras de electroforesis fue notoriamente mayor a la de las otras dos bandas.

Tabla 2. *Productos que amplifican las distintas combinaciones de cebadores para Clk*

Combinación cebadores	Bandas	Tamaño pb	Rendimiento Total ng	Tamaño Secuencia PCR pb	Similitud (Blast)
Clk up1-dwn4	Superior S	510	650	404	Clona de <i>Danio rerio</i> (score: 46) similar a rRNA. Gene Bank: CR847541.8
	Inferior I	180	180	'	No se pudo secuenciar
Clk up1-dwn3	Superior S	410	400	242	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide (score: 42) Gene Bank: 471819
	Inferior I	170	570	189	Proteína de union al DNA <i>Ricinus communis</i> (score: 42) Gene Bank: 8283971
Clk up2-dwn4	Superior S	750	430	720	Biblioteca cDNA Homarus americanus (score: 159) Gene Bank: FD699468.
	Media M	380	580	PCR: 354 CLON: 381	<i>Macrobrachium rosenbergii</i> Clock cDNA (score: 46) Gene Bank; AY842303.1 Homologo de Clock <i>Rattus norvegicus</i> (score: 37) Gene Bank; AB019258.1
	Inferior I	150	250	148	28 s rRNA (score: 107) GENE ID: 100008589

Al probar la combinación de cebadores Clk up2-dwn4 y up1-dwn4 a diferentes temperaturas (Tm= 60 y 50 °C) no se amplificó ningún producto. Sin embargo, para la combinación Clk up1-dwn3, se logra una mayor fidelidad de amplificación de la banda S (Tabla 1).

Por su parte, el uso de la Platinum Pfx (Invitrogen) hizo más específica la amplificación de la Clk up2-dwn4 banda S de 720 pb, la cual, a pesar de ser del tamaño aproximado del producto esperado, no mostró mayor identidad que la banda M con otros genes *Clk*, aunque guarda homología con la secuencia de una clona del crustáceo *Homarus americanus* (Tabla 2).

Resultados

Fig. 2. Geles preparativos con las diferentes combinaciones de cebadores para el gen *Clock*

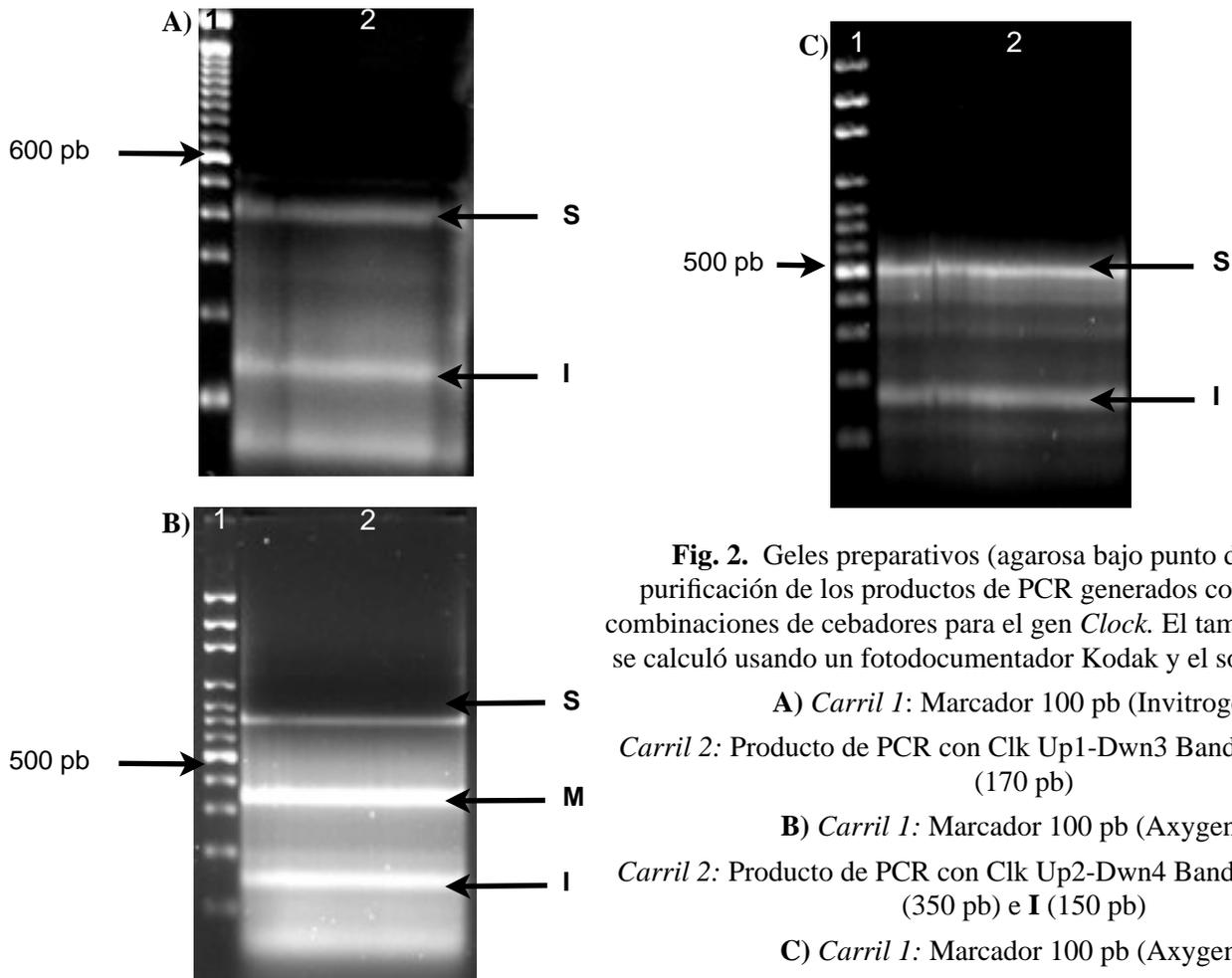


Fig. 2. Geles preparativos (agarosa bajo punto de fusión) para purificación de los productos de PCR generados con las diferentes combinaciones de cebadores para el gen *Clock*. El tamaño de las bandas se calculó usando un fotodocumentador Kodak y el software KodakMI

A) Carril 1: Marcador 100 pb (Invitrogen).

Carril 2: Producto de PCR con Clk Up1-Dwn3 Bandas S (410 pb) e I (170 pb)

B) Carril 1: Marcador 100 pb (Axygene).

Carril 2: Producto de PCR con Clk Up2-Dwn4 Bandas S (750 pb), M (350 pb) e I (150 pb)

C) Carril 1: Marcador 100 pb (Axygene).

Carril 2: Producto de PCR con Clk Up1-Dwn4 Bandas S (500 pb) e I (180 pb)

La banda M Clk up2-dwn4 fue amplificada tanto con la Pfx, como con la Taq polimerasa y ambas secuencias se compararon, dando como resultado una secuencia consenso (*Clk2-4bigconsensus*). El producto de dichas amplificaciones fue clonado utilizando el plásmido pGEM T-easy (PROMEGA) y la secuencia del plásmido (*Clk Up2-Dwn4 ClonG*) fue comparada contra la del producto de PCR. Como se discute posteriormente, el inserto del plásmido es prácticamente idéntico al producto de la PCR. Sin embargo, la secuencia de la clonación presenta una mayor similitud al gen *Clock* de *M. rosenbergii* (ClustalW Score: 39). Por ello, se utilizó dicho producto para hacer el análisis de la secuencia (Fig. 3).

Resultados

Fig 3. Comparación de la secuencia CLKup2-dwn4ClonG con genes *clk* reportados para otros organismos

Secuencia Problema	Tamaño(pb)	Secuencia Comparada	Tamaño (pb)	Score
		Género		
===== CLKup2-dwn4ClonG	381	<i>Macrobrachium.clk</i>	2115	39
CLKup2-dwn4ClonG	381	<i>DrosophilaM.clk</i>	3084	6
CLKup2-dwn4ClonG	381	<i>MamestraB.clk</i>	2337	8
CLKup2-dwn4ClonG	381	<i>MusM.clk</i>	2568	11
CLKup2-dwn4ClonG	381	<i>DanioR.clk</i>	2682	6
===== CLKup2-dwn4ClonG	381	<i>Xenopus.clk</i>	4219	13

<i>CLKup2-dwn4ClonG</i> Macrobrachium.clk_	-----CCT GTGGTAGTGCTGTTTATAGAATTCCT ---AACACT	35
	AGTAGCTGTAGTAGAAGTATGTTTCG GTGGTAATGCCGGGGGAGGAGTTACTGGTAGCAGT	720
	* *	
<i>CLKup2-dwn4ClonG</i> Macrobrachium.clk_	GATGT--GTCCTAATCCATCTCAAACCTTAGGAATCTAGTACTTGGATAACAGACTGAACA	93
	AATGCTGGTTCTGGTCTCTGT CAGAGCTC-----TCTTGTACAGACTAATCCATCTCA-G	774
	* *	
<i>CLKup2-dwn4ClonG</i> Macrobrachium.clk_	AAAACCACCTAGTTATCGCAGGGGACT-TTAAT--ATTGACCTCTGCGAGCCTGAACACC	150
	GAACTACGAAGCTAGTGT TTTGTGGCTATTGGTCGACTGGAACGGCCACAGCTGGTTAGG	834
	* *	
<i>CLKup2-dwn4ClonG</i> Macrobrachium.clk_	CCACTGCTGTTAGCATACAACCAAGTATAACAGTATATACTTGAGGACACTGTTTA----	206
	GAAATGATGATA-- ATAGAACCAAGTAAACAGAATTTACTTCAAGACACAGTTTAGAAT	892
	* *	
<i>CLKup2-dwn4ClonG</i> Macrobrachium.clk_	----- CCTCAACTGTAT---- GA ACTCCTGCTTCCTCATACCCTTAACCACCTTGACC	254
	GGAAATTT CTTTTTCTAGACCACAGAGCTCCTACCATCATTGGCTACCTTCCATTGAAG	952
	* *	
<i>CLKup2-dwn4ClonG</i> Macrobrachium.clk_	TGTTAGAATCACTGATAGCACTGCCACGACTCTCGATAAACATCTGCACATA-CCGCATCA	313
	TGTTAGGAACCTTCGG-GGTATGACTATTATCACGTAGAAGATCTGGACAAAGTCCGCATCA	1011
	* *	
<i>CLKup2-dwn4ClonG</i> Macrobrachium.clk_	TAACATCTCCGCTTACTGAAGGTATAATCGCCAATATCTTGTTACTACAGATTCTTGACC	373
	TGCCATGAACAATTAATGAAGACTGGAAAGGGAAACATCTTGTTACTACAGATTCTTGACC	1071
	* *	
<i>CLKup2-dwn4ClonG</i> Macrobrachium.clk_	AAAGGACA-----	381
	AAAGGACAACAATGGATATGGTTGCAAACCCAGTATTACATTACTTATCATCAGTGGAAAC	1131
	* *	

Comparación de la secuencia *Clk Up2-Dwn4 ClonG* producto de la clonación de la banda *M Clk Up2-Dwn4* con genes *clk* reportados para otros organismos. En la parte superior se observa una tabla donde se muestra la secuencia problema y el score (Clustal W) de la alineación contra cada gen. Podemos ver como la similitud con el crustáceo *M rosenbergii* (Macrobrachium.clk) es mayor que la de otros organismos.

Abajo se muestra la alineación (ClustalW) del producto de la clona G contra Macrobrachium.clk. En negritas se resaltan los pares de bases que son idénticos (*).

Al traducir la secuencia a los tres posibles marcos de lectura en sentido (+) y antisentido (-), 6 marcos de lectura totales, ninguno de ellos da un marco de lectura abierto y al buscar en la base de datos del BLASTp, no se encuentran similitudes significativas con ninguna proteína

Resultados

reportada. A excepción del marco +2 que, a pesar de tener varios codones de termino en el principio de la secuencia, la parte final da un marco de lectura que presenta una similitud con Clock del langostino *M. rosenbergii*.

Se alineó dicho marco de lectura contra diversas proteínas CLK tanto de vertebrados como de invertebrados (Fig. 4), a partir de esto se pudo identificar que la secuencia cae dentro del dominio PAS de las diferentes proteínas y es idéntica en la zona donde se diseñó el cebador. Sin embargo, cinco de los aminoácidos (aa) codificados no forman parte de la secuencia del cebador, lo cual nos indica que nuestro fragmento muestra similitud con una zona altamente conservada en la secuencia de aa. Aunque continua habiendo parecido, no podemos decir lo mismo para los primeros aa de la secuencia.

Fig 4. Comparación del marco de lectura +2 del producto de la clona con proteínas CLOCK reportados para otros organismos

Secuencia Problema	Tamaño (pb)	Secuencia comparada	Tamaño (pb)	Score
CLKup2-dwn4ClonG	68	<i>Macrobrachium</i> .clk	704	26
CLKup2-dwn4ClonG	68	<i>DrosophilaM</i> .clk	1027	30
CLKup2-dwn4ClonG	68	<i>MusM</i> .clk	855	14
CLKup2-dwn4ClonG	68	<i>Xenopus</i> .clk	778	14

MusM.clk	TPQFIKEMCTVEEPNEEFTSRHSLEWKFL FL LDHRAPPIIGYLPFEVLGTSGYDYYHVDL	318
Xenopusclock	TPQFIKEMCTVEESNEEFTSRHSLEWKFL FL LDHRAPPIIGYLPFEVLGTSGYDYYHVDL	309
Macrobrachium.clk	RPQLVREMMIIEPSKTEFTSRHSLEWKFL FL LDHRAPTIIGYLPFEVLGTSGYDYYHVEDL	332
DrosophilaM.clk	NPQLIREMSIIDPTSNEFTSKHSMEWKFL FL LDHRAPPIIGYMPFEVLGTSGYDYYHFDDL	309
CLKup2-dwn4ClonG	-----HTTKYN--- SI YLRT LF TSTV TP -ASSY PLDL LESL-IALPRLSIT	42
	. :. . * : ** . :* . * * : : : . .	
MusM.clk	ENLAKC HE HL M QY G K G K SCY Y R F L T K G Q Q W I W L Q T H Y I T Y H Q W N S R P E F I V C T H T V V S Y	378
Xenopusclock	ENLAKC HE HL M QY G K G K SCY Y R F L T K G Q Q W I W L Q T R Y I T Y H Q W N S R P E F I V C T H T V V S Y	369
Macrobrachium.clk	DKVAS C HE Q L M K T G K T SCY Y R F L T K G Q Q W I W L Q T Q Y I T Y H Q W N S K P E F I V C T N T V V S Y	392
DrosophilaM.clk	DSIV A C HE E L R Q T G E G K SCY Y R F L T K G Q Q W I W L Q T D Y V S Y H Q F N S K P D Y V V C T H K V V S Y	369
CLKup2-dwn4ClonG	SAHT A S H L R L L K V S P - I SCY Y R F L T K G -----	68
	. . . * . * : . *****	

Comparación del marco de lectura +2 de las secuencia *CLKup2-Dwn4ClonG* producto de la clonación de la banda *M Clk Up2-Dwn4* con proteínas Clock reportadas para otros organismos. En la parte superior se observa una tabla donde se muestra la secuencia problema y el score (Clustal W) de la alineación contra cada gen. Podemos ver como la similitud con la mosca de la fruta *D. melanogaster* (*DrosophilaM.clk*) y el crustáceo *M rosenbergii* (*Macrobrachium.clk*) no es mayor al 30%.

Abajo se muestra la alineación (ClustalW) del marco de lectura contra la secuencia de la proteína reportada para diferentes especies. En negritas se resaltan los aminoácidos que son idénticos (*), también se muestran aquellos que son sustituciones conservadas (:) y sustituciones semiconservadas (.) ClustalW (EMBL-EBI).

Resultados

7.4 Identificación de un posible fragmento de *P. clarkii* Per

Al hacer las PCR prueba se observó la mayor intensidad de brillo en las bandas amplificadas por los cebadores Per Up1-Dwn1 y Per Up1-Dwn2; razón por la cual se decidió tomar dichas combinaciones de oligonucleótidos para reamplificar las muestras, cuyos productos fueron secuenciados y clonados.

Ambas combinaciones de cebadores amplifican una banda de alrededor de 220 pb y Per Up1-Dwn1 también amplifica una banda de 150 pb (Tabla 3).

Tabla 3. Productos que amplifican las distintas combinaciones de cebadores para *Per*.

Combinación cebadores	Bandas	Tamaño pb	Rendimiento Total ng	Tamaño Secuencia PCR pb	Similitud (Blast)
Per up1-dwn2	Superior S	218	300	-	No se obtuvo secuencia clara
Per up1-dwn1	Superior S	210	300	205	Period (<i>Per</i>) mRNA, partial cds <i>Unzela japix</i> y <i>Pachylia ficus</i> (score: 46 y 42) Gene Bank: EU479441.1 y EU479414.1
	Inferior I	150	1500	'	No se obtuvo secuencia clara

A pesar de diversos intentos, no se pudo obtener una secuencia coherente para l Per Up1-Dwn1 banda I ni Per Up1-Dwn2 banda S (Fig. 5 / Tabla 3). Una hipótesis es que se conglomeraban diferentes bandas de tamaños similares en un mismo punto. Por ello se intentó separar con geles de agarosa a altas concentraciones (2.5 %) y geles de acrilamida, pero no se lograron resolver bandas bien definidas..

Fig 5. Geles preparativos con las diferentes combinaciones de cebadores para el gen *Per*

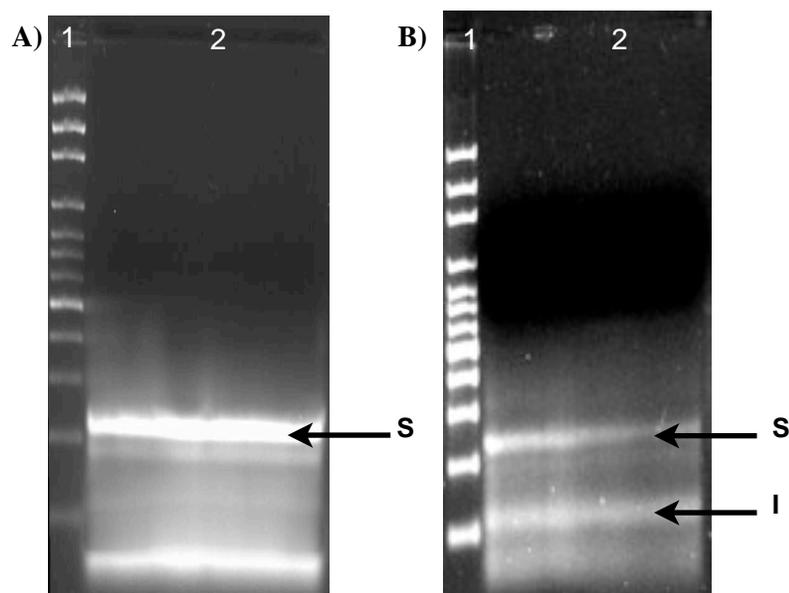


Fig 5. Geles preparativos (agarosa bajo punto de fusión) para purificación de los productos de PCR generados con las diferentes combinaciones de cebadores para el gen *Per*. El tamaño de las bandas se calculó usando un fotodocumentador Kodak y el software KodakMI

A) Carril 1: Marcador 100 pb (Axygene). Carril 2: Producto de PCR con *Per* Up1-Dwn2; Banda S (210 pb)

B) Carril 1: Marcador 100 pb (Axygene). Carril 2: Producto de PCR con *Per* up1-dwn1; Bandas S (218 pb) e I (110 pb)

La secuencia obtenida, de *Per* Up1-Dwn1 banda S (Fig. 5) muestra similitudes con fragmentos del gen *Per* reportados para diversos géneros de palomillas (Tabla 3) con un buen grado de similitud.

Resulta interesante que el software BLAST encuentre inmediatamente una relación entre una fracción del amplicón y las secuencias incompletas recién reportadas de estos organismos, pues nos indica la posibilidad de tener un fragmento del gen. Sin embargo, el tamaño de la secuencia es muy pequeño en comparación con otras ya reportadas para el mismo gen. Lo cual es una señal de que el amplicón no necesariamente es el mRNA de *Per*.

Al alinear el amplicón con otras secuencias de pares de bases en el programa Clustal W, encontramos que la mayor similitud se encuentra en la zona inicial de la secuencia (primeros 50 pb), en especial con las palomillas y la mosca de la fruta. Como se observa en el cuadro de la Fig. 6, la identidad con *per* del ratón (*MusmusPerI*) es casi la mitad de el parecido con los invertebrados.

Resultados

Fig 6. Comparación de las secuencia *PerUp1-Dwn1* con genes *Per* reportados para otros organismos

Secuencia Problema	Tamaño (pb)	Secuencia comparada Género	Tamaño (pb)	Score
PerUp1-Dwn1	205	<i>Drosophila</i> M.Per	3657	23
PerUp1-Dwn1	205	<i>Apis</i> M.Per	3375	24
PerUp1-Dwn1	205	<i>Musmus</i> Per1	4669	14
PerUp1-Dwn1	205	<i>Unzela</i> japixPer	948	25
PerUp1-Dwn1	205	<i>Pachylia</i> FicusPer	948	26

```

PachyliaFicusPer      -----ATTGGCAGATCGTTCATCGATTTTGT---TCAT 30
Unzela-japixPer      -----ATCGGCAGGTCCTTCATCGACTTTTGT---TCAT 30
Droso.per            GTCCTGGGCTACCCGCGCGACATGTGGCTGGGCAGGTCCTTCATCGATTTTGT---GCAC 837
Apis.per            GCTCTAGGATATCTCAAGGATGCATGGATTGGCCGTTCTTTTCATCGATTACGT---CCAT 609
PerUp1-Dwn1        -----TGGGCAGGTCCTTCATCGATTTTGCATGGCAT 32
                      * * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```

```

PachyliaFicusPer      CCTAGGGACCGCAACACCTTCGCATCGCAGATCACCAGCGGGCTAGCTGTGCCRAAGATA 90
Unzela-japixPer      CCTAGGGACCGCAACACGTTTCGCCTCGCAGATCACCAGCGGGCTTGCTGTGCCAAAATA 90
Droso.per            CTTAAGGACCGCGCCACCTTCGCCAGTCAGATCACCACGGGCATACCCATTGCCGAATCC 897
Apis.per            CCCAAGGATAAGGCCACACTGGCTGATCAGATTA AAAACGGAATAGTCTCGCCTCAAGAA 669
PerUp1-Dwn1        CCAAGGGAGGGAACAGGCTCGCAGTTCAGTTCACCAGCCGGTACTCGGTCCTGAACTT 92
                      * * * * * * * * * * * * * * * * *
  
```

```

PachyliaFicusPer      GTA-----AATTCGACTATGGTATGT 111
Unzela-japixPer      GTA-----AATTCGACGATGGTCTGC 111
Droso.per            AGGGGCAGCGTGCCCAAGG-----ACGCCAAGAGCACCTTCTGCGTGA 940
Apis.per            GAAAGACCGAAAGGTATTA-----ATGGGAGAAGAGCAAGTCTGTTTTGC 714
PerUp1-Dwn1        ACATGCCTATACTCGATTA-----GGAGAACAGAG-CGTCCTGT 130
                      * * * * *
  
```

```

PachyliaFicusPer      CGCATTTCGKCGTTAC-CGTGGGCTCA---CCACYGGGT--TTGGAGTAAAGGACCGCGTT 165
Unzela-japixPer      CGCATCCGCCGGTAC-CGCGGTCTCA---CCACAGGGT--TCGGAGTAAAGGACCGTGTG 165
Droso.per            TGC-TGCGTCGCTAC-CGGGGACTCAAGTCCGGCGGAT--TCGGCGTCATCGGCAGGCC 996
Apis.per            GGATTACAGAAGTACACAAGATCTTTTCGCTCATCAATCGATCAACAAGAGGCAAGATCG 774
PerUp1-Dwn1        TTGTTGCATGTTTCGCCCTCTTGCTCGTGCTCACCC TTC---TTGTATAATGGGACTACCT 187
                      * * * * * * *
  
```

```

PachyliaFicusPer      GTCACCTTCATGCCGTTCTCCTGAAGTTCACCTTCAAGAACATCTCT-----GATGAGG 220
Unzela-japixPer      GTGACCTTCATGCCCTTCCTGCTGAAGTTCACCTTCAAGAACATTTCT-----GATGAGG 220
Droso.per            GTCAGCTACGAACCCCTTCGCGCTGGGGCTCACCTTCAGGGAGGCTCCGGA--GGAGGCGC 1054
Apis.per            AATTTGTATCTCCGTTCCACTTGACATTGTCGTTTCAGAGATTTTCGAGATCGTACGACT 834
PerUp1-Dwn1        TAAGCTTACAACCGTTC----- 205
                      * * * * *
  
```

Comparación de las secuencia *Per up1-dwn1* banda S contra genes *Per* reportados para otros organismos. En la parte superior se observa una tabla donde se muestra la secuencia problema y el score (Clustal W) de la alineación contra cada gen. Podemos ver como la similitud con las palomillas *Pachylia Ficus* (*PachyliaFicusPer*), *Unzela japix* (*Unzela-japixPer*) y en general, de los insectos, es mayor que comparada con el ratón *Mus musculus* (*MusmusPer1*).

Abajo se muestra la alineación (ClustalW) del producto de la clona G vs invertebrados. En negritas se resaltan los pares de bases que son idénticos (*).

Resultados

Fig 7. Comparación del marco de lectura +3 del producto de *Per up1-dwn1 S* contra proteínas PER reportados para invertebrados

Secuencia Problema	Tamaño (pb)	Secuencia comparada	Tamaño (pb)	Score
PerUp1-Dwn1frame+3	57	Unzela-	316	31
PerUp1-Dwn1frame+3	57	Pachylia	316	31
PerUp1-Dwn1frame+3	57	Acosmeryx	316	31

Unzela-	I GRSFIDFV- H PRDRNTFASQ I TSGLAVPKIVNSTMVCR I RRYRGLTTGFGVKDRVVTFM	59
Pachylia	I GRSFIDFV- H PRDRNTFASQ I TSGLAVPKIVNSTMVCR I RRYRGLTTGFGVKDRVVTFM	59
Acosmeryx	V GRSFIDFV- H PRDRNTFASQ I TTGLAVPEVVDSTMVCR I RRYRGLSAGFAVKDRVVTFM	59
<i>PerUp1-Dwn1frame+3</i>	- G RSFIDFA W H P REGNRLAV Q FTSPVL G PELT--- C LY S IRR----- T ERP V CCMF	47
	*****. ***: * :* *:: : *:: : : *** : * ::	
Unzela-	P FL L KFTFKNISDEEK V I Y L V IQATPF F SAFRIPNEVVAKAVPFV M RHSANGNLEYIDPE	119
Pachylia	P FL L KFTFKNISDEEK V I Y L V IQATPF F SAFRIPNEVVAKA I PFV M RHSANGNLEYIDPE	119
Acosmeryx	P FL L KFSFKNVADDA K V I Y L V IQATPF F SAFRIPNEVLAKSNPFV I RHSANGNLEFIDPE	119
<i>PerUp1-Dwn1frame+3</i>	A LL L ----- V L T LL V -----	57
	.:** * : *::	

Comparación del marco de lectura +3 de las secuencia *Per Up1-Dwn1 S* con proteínas PER reportados para 3 diferentes especies de palomilla. En la parte superior se observa una tabla donde se muestra la secuencia problema y el score (Clustal W) de la alineación contra cada gen.

Abajo se muestra la alineación (ClustalW) del marco de lectura vs la secuencia de la proteína reportada para diferentes especies. En negritas se resaltan los aminoácidos que son idénticos (*), también se muestran aquellos que son sustituciones conservadas (:) y sustituciones semiconservadas (.) ClustalW (EMBL-EBI).

Se tradujo la secuencia a los tres posibles marcos de lectura en sentido (+) y antisentido (-), 6 marcos de lectura totales. De los cuales únicamente los marcos + 3 y +1 son marcos de lectura abiertos. Para el marco +1, al ser alineado con el programa BLAST, no se encuentran similitudes significativas con ninguna secuencia. Sin embargo, para el marco + 3, se encuentra similitud (score: 36) con la proteína Per reportada para una especie de palomilla *Ascosmeryx naga* (Gene Bank: ACDo1778.1). Como se puede ver en la alineación con ClustalW (Fig. 7), el marco de lectura + 3 es idéntico en la zona conservada donde fue diseñado el oligo, y esa similitud continua 16 aa más, aunque conforme nos alejamos en la secuencia el parecido disminuye.

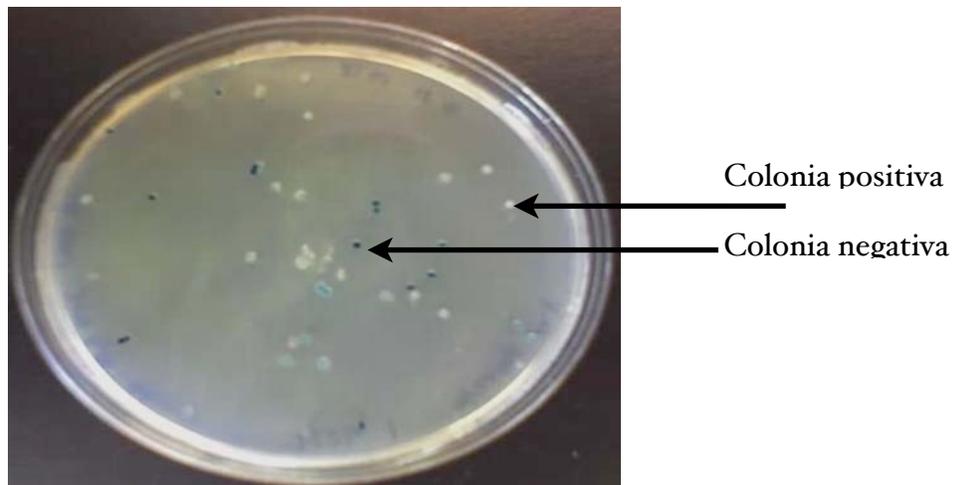
Resultados

El mismo marco de lectura también se alinea con una proteína de dominio PAS (LPAS1) del mamífero *Murina leucogaster* (Gene Bank: FJ858730.1) , en la base de datos del Protein Data Bank (RSCB.org)

7.5 Clonación de los productos

Se clonaron en bacterias DH5- α supercompetentes utilizando el vector pGEM T-easy (Promega), los fragmentos: *M*; amplificado por los cebadores *Clk Up2-Dwn4* y *S*; amplificado por los cebadores *Per Up1-Dwn1*, por ser aquellos que mostraban mayor identidad con sus respectivos homólogos.

Fig 8. Placa con colonias DH5- α transformadas con marcador X-Gal e IPTG



Las reacciones de clonación del fragmento *S Per Up1-Dwn1* como del *M Clk Up2-Dwn4* se llevaron a cabo utilizando el kit TopoTA (Invitrogen) con sus propias bacterias (MatchT1); así como el plásmido pGEM T-easy (Promega) con bacterias supercompetentes fabricadas en el laboratorio. los resultados con el Kit siempre fueron negativos, la mayoría de las bacterias transformantes no contenían inserto, sino que el plásmido se había circularizado y les había conferido resistencia al medio con antibiótico.

Resultados

El análisis de las transformantes se agilizó y simplificó con el uso del método de tamizaje "Blue-White screening", pues de este modo nos fue posible diferenciar visualmente entre las colonias que contenían el vector de clonación sin inserto, de aquellas que portaban un inserto. Dado que el vector utilizado es del tipo *pUC* y contiene una secuencia que codifica para el fragmento- α del gen de la β -galactosidasa y que las bacterias DH5- α portan en su genoma el fragmento complementario del gen, entonces esta combinación permitió el ensamblaje de un complejo activo que, en presencia de X-Gal (el sustrato cromogénico de la β -galactosidasa) y el inductor IPTG dio lugar a la formación de colonias de color azul (Messing J, et. al. 1977), mientras que la inactivación del gen de la β -galactosidasa debido a la inserción de un fragmento de DNA en el vector de clonación dio como resultado la pérdida de la actividad funcional de la β -galactosidasa. Por lo tanto, las bacterias que fueron transformadas con un plásmido con inserto generaron colonias que se mantuvieron blancas (Fig. 8).

De este modo, las colonias de las cuales se extrajeron los plásmidos poseían casi con certeza el inserto, lo cual se corroboró al hacer la digestión con la enzima EcoRI. Ninguno de los plásmidos recombinantes (pGEM T-easy) para el fragmento *S Per Up1-Dwn1* muestra similitud con la secuencia de PCR para este amplicón, ni con algún otra secuencia en el Gene Bank. Por lo que consideramos que el cDNA presente en la muestra contenía diferentes amplicones, de los cuales había poca cantidad del fragmento esperado y por ello el rendimiento de la clonación para dicho fragmento fue muy bajo.

Para el amplicón *M Clk up2-dwn4*, tras varios intentos, clonando diversos productos desconocidos, finalmente una clona portaba un inserto de 381 pb (Fig. 9), la cual es del tamaño esperado del amplicón (Tabla 2. Fig. 2) y como se puede ver en la figura 9, al ser comparado con la secuencia de PCR, la similitud es del 92% . Pero en el plásmido, el secuenciador detecta con claridad una secuencia de 40 pb que no se había identificado en la secuenciación del producto de PCR.

Resultados

Fig 9. Comparación entre la secuencia de PCR de Clk Up2-Dwn4 banda M (Clk2-4bigconsensus) vs la secuencia de la clona del mismo producto (Clk Up2-Dwn4 ClonG)

CLKup2-dwn4ClonG 34	-----CCTGTGGTAGTGCTGTTTATAGAATTCCTAACAC
CLK2-4bigconsensus 58	TTGTTGATGACAAGTCCACTGTCCTGCCTGTGG--GTGCAGTTTATAGAATTCCTAACAC ***** **
CLKup2-dwn4ClonG 94	TGATGTGTCCTAATCCATCTCAAACCTTAGGAATCTAGTACTTGATAACAGACTGAACAA
CLK2-4bigconsensus 118	TGATGTGTCGGAATTCAACTCAAACCTTAGAAAATCTAATACTTGATAACAGACTGAACAA ***** ** *
CLKup2-dwn4ClonG 154	AAACCACCTAGTTATCGCAGGGGACTTTAATATTGACCTCTGCGAGCCTGAACACCCAC
CLK2-4bigconsensus 178	AAACCACCTAGTTATCGCAGGGGACTTTAATATTGACCTCTGCGAGCCTGAACACCCAC *****
CLKup2-dwn4ClonG 214	TGCTGTTAGCATAACAACCAAGTATAACAGTATATACTTGAGGACACTGTTTACCTCAACT
CLK2-4bigconsensus 198	TGCTGTTAGCTT-----CCTCAACT ***** * *****
CLKup2-dwn4ClonG 274	GTATGAACTCCTGCTTCCTCATACCCTTAACCACTTGACCTGTTAGAATCACTGATAGCA
CLK2-4bigconsensus 258	GTATGAAATCCTGCTTCCTCATACCCTTAATCACTAGACCTACTAGAATCACTGATAGCA ***** ***** ** *
CLKup2-dwn4ClonG 334	CTGCCACGACTCTCGATAACATCTGACATACCGCATATAACATCTCCGCTTACTGAAG
CLK2-4bigconsensus 312	CTGCCACGACTCTCGATCACATCTGGACA-----AACATAACCTCTCCGCTTACTTCAG ***** ***** ** * ***** ***** **
CLKup2-dwn4ClonG	GTATAATCGCCAATATCTTGTACTACAGATTCTTGACCAAAGGACA 381
CLK2-4bigconsensus	GTATAATCACCGATAGC-----ACTACAGATTCTTGACCAAAGGACA 354 ***** ** ** * *****

Alineación entre la secuencia de PCR de clk up2-dwn4 banda M (Clk2-4bigconsensus) y la secuencia de la clona del mismo producto (Clk2-dwn4ClonG).

Se puede observar como la clona no presenta el fragmento inicial de la secuencia correspondiente a el oligonucleótido “clk Up2”. A pesar de que los productos son prácticamente idénticos (*), ClustalW Score: 92 (EMBL-EBI), el tamaño de la secuencia de la clona es el esperado por la cuantificación del fotodocumentador (Tabla 2) y presenta un fragmento de 40 pb que no se había identificado en el producto de PCR.

7.6 Análisis de ritmicidad

Teóricamente, si la eficiencia de la amplificación es del 100%, el número de amplicones se duplica en cada momento. Sin embargo, en este trabajo, la mayoría de las PCRs tuvo una eficiencia menor al 100% y en una amplificación típica se obtuvo eficiencia constante de entre el 70% y el 80% a partir del XV° ciclo. De hecho, la amplificación solo es exponencial durante un número limitado de ciclos, después de los cuales se alcanza un estado estable; esto se debe, entre otras cosas al agotamiento de los cebadores con respecto a su constante de afinidad por el cDNA.

De este modo, para hacer una PCR adecuada para la cuantificación, se debe encontrar el punto donde la amplificación deja de ser exponencial y se detiene. Lo cual dependerá de número de ciclos, la cantidad de material con el que se inicia la reacción y el sistema de detección y cuantificación del producto amplificado. A esta ventana de ensayos donde la cuantificación es significativa, se le conoce como intervalo de amplificación lineal (Ferre F; 1992), el cual definimos mediante la cuantificación de la brillantez de las bandas en reacciones de las 1100 h y las 2200 h, sometidas a distintos números de ciclos (20, 25 y 30), todas con 2 µg de RNA totales al inicio de la reacción de RT. De este modo se eligió, para la PCR semicuantitativa, el número de ciclos en el que se amplificaba la menor cantidad de producto (Tabla 1) y así poder comparar la cantidad de brillantez de la banda a las diferentes horas.

Los productos de PCR se cuantificaron por electroforesis con geles de agarosa al 1.5%, TAE 1X y teñidas con bromuro de etidio en un fotodocumentador Kodak y con el software del mismo (ver material y método). Dichos valores se normalizaron y se expresaron como eje de control al ser graficados en un cronograma donde se observa que, tanto *Per* (Fig. 10) como *Clk* (Fig. 11) muestran un ritmo diario, siendo el pico máximo de expresión del primero a las 1900 h y para el segundo a las 0300 h.

Fig 10. PCR semicuantitativa de la expresión de *Per Up1-Dwn1 S* a lo largo del día

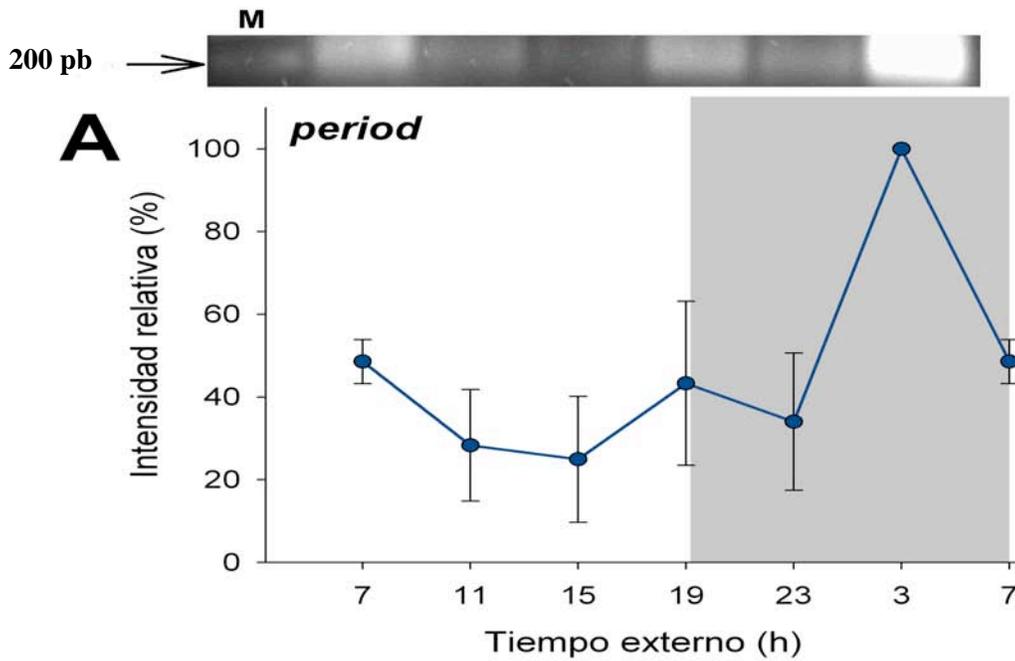


Fig 10. Cronograma de la expresión de *pcPer*.

Carril 1: Marcador.

Carriles 2-7: Producto de PCR con los cebadores *Per Up1-Dwn1* a partir de cDNA de diferentes horas, del cerebro del acocil (LO 12:12). n= 2 reacciones PCR.

Fig 11. PCR semicuantitativa de la expresión de *Clk Up2-Dwn4 M* a lo largo del día

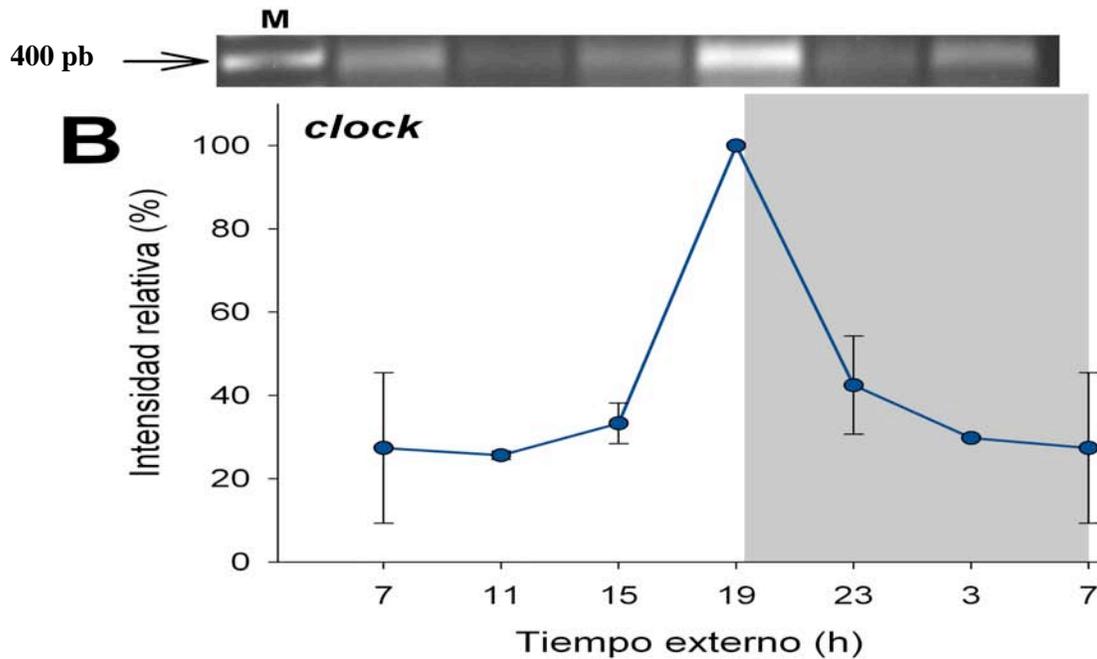


Fig 11. Cronograma de la expresión de *pcClock*.

Carril 1: Marcador.

Carriles 2-7: Producto de PCR con los cebadores *Clk Up2-Dwn4* a partir de cDNA de diferentes horas, del cerebro del acocil (LO 12:12). n= 2 reacciones PCR.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

¡Levántate, muchacho haragán de la taberna!"

Llena nuevamente nuestros tarros vacíos
con la medida del día.

¡Antes de que sea llenada
la medida de nuestras vidas!

(Omar Kayam)

8.1 Análisis de secuencias

Los resultados muestran que la secuencia de los productos obtenidos (cDNA) tiene diversos grados de identidad con las secuencias de pares de bases y de aminoácidos de genes y proteínas del reloj de otros invertebrados. *Clock* es similar a la región conservada en el gen *clock* del crustáceo *Machrobranchium rosenbergii* (BLAST score: 46) y *per* muestra identidad con el mismo gen en las palomillas *Pachylia Ficus* y *Unzela japix* (BLAST score: 42 y 46 respectivamente).

Sin embargo, estos resultados no son concluyentes por diversas razones. El que no se haya logrado determinar la secuencia de todas las bandas que se observaban en la electroforesis de cada grupo de cebadores, deja en duda si alguna de esas secuencias muestra mayor similitud con los genes buscados que aquellas que presentan los dos productos de PCR analizados. De la misma manera, la necesidad de ampliar las secuencias ya identificadas mediante el diseño de cebadores basados en los productos amplificados, es una limitante para aseverar la existencia de homología con otros genes reloj.

La dificultad para clonar los fragmentos fue también un problema recurrente durante el desarrollo de este trabajo que tiene repercusión en la determinación de las secuencias dentro de los amplicones. Como lo podemos observar en el caso de *Clk*, cuya clona nos muestra la secuencia completa del producto amplificado y la similitud con el gen del langostino es mayor. Por ello, resulta indispensable el establecimiento de las condiciones para la clonación de los fragmentos de *Per*, pues sin un plásmido recombinante con el amplicón se dificulta el desarrollo de otros experimentos funcionales.

8.2 PCR semicuantitativa y análisis funcional

La habilidad para medir con precisión los patrones de expresión génica, es esencial en el estudio de las funciones de los genes. La expresión de RNA puede ser determinada con diversos ensayos

como northern blots o análisis de protección de la RNasa. Sin embargo, estos métodos carecen de sensibilidad y requieren grandes cantidades de RNA. Por ello, no son apropiados para casos en los que se analizan cambios en los niveles de expresión de un mensajero poco abundante que se expresa en una estructura muy pequeña (Haddad F; 2007), tal es el caso que observamos en este trabajo, donde se buscó amplificar genes cuya expresión, de acuerdo al modelo del asa, esta altamente regulada; lo cual significa, no solo que la cantidad de mensajero es poca, sino que varía ampliamente a lo largo del día.

Por esta razón se eligió el uso de la técnica de transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que se ha convertido en uno de los métodos de elección para quienes desean medir y detectar los patrones de expresión de mRNA en células y pequeñas cantidades de tejido.

Actualmente no existen dudas del poder cuantitativo de la PCR, que puede ser definido como el nivel de reproducibilidad, precisión y exactitud que se logra al cuantificar una cantidad específica de ácidos nucleicos. Sin embargo, es muy reconocido que la precisión de cuantificación de la PCR a partir de cDNA es menor, en parte debido a la adición de un segundo paso enzimático, la transcripción reversa. (Ferre F; 1992).

Con el propósito de eliminar el ruido causado por la reacción de RT, se procuró estandarizar al máximo las reacciones, calibrar frecuentemente las pipetas y mantener constante la cantidad de RNA total, así como la prueba control con los cebadores para TRP para definir en forma visual y subjetiva la calidad y cantidad de cada lote de reacciones de RT. En estas pruebas se observó que no hay diferencias de la intensidad de brillo, de la banda del producto de la TRP, entre el RNA de las 1100 h y de las 2200 h (datos no mostrados), lo cual podría sugerir que este producto no muestra diferencias de expresión entre el día y la noche. Aún cuando no se tiene un control de carga para la cuantificación de la intensidad relativa de brillo en las pruebas funcionales, consideramos las pruebas de TRP como control interno de la cantidad de cDNA en cada lote de RT's para las diferentes horas.

Discusión y conclusiones

Además, se estableció el intervalo lineal de saturación para las reacciones de *clk* y *per*, para determinar el número de ciclos apropiado para realizar la cuantificación sin que se limitara la reacción. Aún así, en los geles para la PCR semicuantitativa, se observa como la brillantez de las bandas en horas donde se encuentra el pico máximo de expresión (0300 h en *Per* y 1900 h en *Clk*), esta por encima de la saturación, comparado con otras horas, lo que sugiere la presencia de altas cantidades del mensajero para esa hora. Es posible que los valores tan grandes en la desviación estándar se deban a que la muestra es muy pequeña, por lo que es sugerible ampliar la muestra, no solamente aumentando el número de reacciones sino los lotes de extracción de RNA utilizados para las reacciones de reversa transcriptasa.

No existen resultados concluyentes sobre el comportamiento de la proteína PER en *P. clarkii*. En cuanto a CLK, los datos en el crustáceo *M. rosenbergii* indican que el gen no oscila al lo largo del día (Yang et. al. 2006). Sin embargo, nuestros experimentos muestran que hay mayor cantidad del producto hacia la noche temprana, contrario a lo observado en la mosca de la fruta donde el mínimo de expresión es al inicio de la noche.

Estudios realizados en los genes del reloj, sugieren que existen variaciones en los mecanismos moleculares entre los organismos, incluso entre aquellos que están relacionados filogenéticamente (Rubin et. al. 2007). Mas intrigante aún es lo que se observa en el molusco *Bulla gouldiana*, donde los patrones de expresión temporal de PER en las neuronas retinianas basales, no encajan con el modelo de asa de retroalimentación negativa descrito para *Drosophila*, pues en este molusco el pico de expresión del mRNA del gen es durante el día subjetivo temprano, mientras que en la mosca, el máximo se presenta durante la noche subjetiva temprana (Constance et. al; 2002).

En el presente trabajo se mostró como los fragmentos identificados como porciones de la secuencia para los genes del reloj *Clock* y *Per*, presentan oscilaciones diarias en la cantidad de RNA mensajero (Figs. 10 y 11) sin embargo, la fase de la oscilación no coincide con el modelo propuesto para *D. melanogaster*, pues en este organismo se ha descrito que los RNA mensajeros

Discusión y conclusiones

de *per* y *clock*, oscilan en antifase, siendo el pico de expresión máxima de *per* durante la noche temprana justo cuando *clock* se encuentra en su mínimo. (Piccini et. al. 1999. Yu y Hardin 2006). En los resultados aquí mostrados y el trabajo desarrollado en nuestro laboratorio (datos sin publicar), la diferencia entre la acrofase del mRNA de *clk* y *per* es de 8 horas, presentando una diferencia de 4 horas entre el pico de expresión del mRNA de *clk* y la proteína. Esta última muestra un adelanto de fase en relación con el zenith del mensajero de *per*; sugiriendo una acción positiva de Clock sobre la transcripción de *per*, como se ha propuesto en el modelo canónico del reloj molecular .

Hay que tener en cuenta que los resultados funcionales corresponden a la media aritmética de tan sólo dos experimentos por ello no pueden ser considerados como un hallazgo definitivo, aunque parecen sustentar los datos moleculares, las pruebas de oscilación no son contundentes ya que se ha encontrado mRNA expresado rítmicamente que no forma parte del grupo de genes canónicos, sino de la salida del reloj (Hardin; 2000).

Aún cuando el paradigma actual sugiere que las oscilaciones de *per* y *clock* proveen de información al reloj, la importancia y el papel de dichas oscilaciones no es muy claro. El hecho de que la oscilación de los productos del reloj desaparezcan en condiciones constantes y aún así se mantenga el ritmo de actividad locomotora en *D. melanogaster* (Hardin et. al; 1990), es una observación que pone a prueba la hipótesis de las asas de retroalimentación .

Se ha demostrado que la expresión constitutiva de *per* y *tim* no interviene en la expresión de los ritmos de actividad, pero, al eliminar la oscilación de cualquiera de las proteínas, los ritmos conductuales desaparecen. (Yang. Sehgal; 2001). Y recientemente, en uno de los experimentos más sorprendentes del estudio molecular del reloj, se demostró de que la fosforilación de las proteínas reloj de la bacteria *Synechococcus* exhiben un ritmo circadiano dentro de un tubo de ensayo, con tan solo agregar cinasas y fosfatasas (Nakajima et. al; 2005).

Los resultados de estos autores dejan en duda si las oscilaciones del RNAm son indispensables para el funcionamiento del reloj, pero hasta ahora no se ha llevado a cabo un estudio donde se bloqueen simultáneamente todos los componentes del reloj, y resulta probable que aún no se hayan identificado otros componentes redundantes del marcapasos (Sheeba et. al; 2008). Aún así, ello no implica que las oscilaciones de el mensajero no tengan un papel bajo circunstancias normales (Yang. Sehgal; 2001).

La importancia del estudio del comportamiento de los genes y proteínas canónicas del reloj en diversos grupos de organismos, en particular en el acocil *P. clarkii*, radica en la posibilidad de, en un futuro, comprender el mecanismo bajo el que opera el sistema cicadiano, y más aún, su evolución.

8.4 Conclusiones

Durante la elaboración de este proyecto se lograron establecer las condiciones para la extracción de RNA, la reacción RT-PCR y la PCR semicuantitativa de diversos productos génicos del cDNA del acocil *P. clarkii*. Esto representó gran parte del trabajo debido al complejo proceso de estandarización de las técnicas moleculares para el genoma del acocil. que, por experiencia personal, ha resultado ser un sencillo modelo neurobiológico pero uno complicado a nivel molecular.

Se secuenciaron varios productos de la amplificación de diversos cebadores diseñados sobre las secuencias conservadas de los genes reloj *Per* y *Clock*. No todos los productos muestran similitud con los genes reloj reportados, e incluso queda pendiente la corroboración de la identidad de los amplicones descritos como fragmentos de *pcPer* y *pcClock*, los cuales muestran parecido (BLAST) con otras secuencias de genes reloj reportadas para diferentes organismos, en particular entre los pares de bases de nuestro amplicón y *clock* del langostino *M. rosenbergii*. La secuenciación de productos que no muestran homología con los genes reloj no resulta en vano,

pues surge la posibilidad de ir generando una base de datos de cDNA de *clarkii*, la cual es indispensable en esta época de la biología molecular.

El análisis del comportamiento diario de los fragmentos mencionados se realizó mediante la PCR semicuantitativa de dos lotes, cada uno con muestras de 6 h del día de cDNA del cerebro de acociles en ciclos LO 12:12. Siendo el pico máximo de expresión del amplicón identificado como *clock* en la noche temprana 1900 h (ZT 12) momento en el que parece comenzar a aumentar la abundancia de la proteína CLK (resultados no publicados). La acrofase de expresión de *per* se presenta durante la noche tardía 0300 h (ZT 20) alrededor de 4 h después del máximo de la proteína CLK.

8.3 Perspectivas

La biología molecular de los crustáceos es un campo poco explorado. Sin embargo, con el análisis molecular podemos investigar procesos complejos en las células del sistema nervioso del acocil, cuyas características anatómicas y funcionales lo convierten en un buen modelo para el estudio de las neurociencias y en particular de los ritmos biológicos.

El aislamiento de cDNA que contenga un pequeño fragmento de RNA es un buen punto de inicio para plantear experimentos funcionales. Examinar la expresión de mRNA a través de una ribosonda en una sola o varias células, localizar la expresión proteica dentro de un tejido, o suprimir la expresión de una proteína específica con inhibidores de RNA (McClintock et. al. 2002), son solo algunas de las técnicas que se pueden montar tras la identificación de un fragmento de un gen específico.

En el presente trabajo se secuenciaron diversos amplicones, producto de la amplificación por PCR de cDNA del genoma de *P. clarkii* con cebadores diseñados en zonas conservadas de los genes del reloj circadiano (*Period* y *Clock*) conocidos en vertebrados e invertebrados. La

importancia de estos experimentos está en la identificación de secuencias que muestran diversos grados de similitud con los genes reloj mencionados, dichos amplicones han sido utilizados para un análisis funcional, que es la detección de su comportamiento en los ciclos luz oscuridad.

Sin embargo, los resultados que se presentan no son concluyentes, pues además de la necesidad de identificar con mejor precisión el grado de homología. Se requiere un mayor número de pruebas funcionales para determinar si estos genes están realmente involucrados en el mecanismo central del reloj.

Muchos experimentos han puesto a prueba la capacidad del modelo del asa de retroalimentación para explicar todos los aspectos involucrados con el sistema circadiano. Pero existe aún un largo trecho por recorrer y la necesidad de determinar el funcionamiento del mecanismo en diversos organismos surge cuando, bajo nuestra perspectiva de biólogos, nos percatamos de la importancia de una visión holística que deje atrás el reduccionismo y contemple la diversidad para tener una perspectiva completa de como operan los relojes biológicos. Por ello la trascendencia en el estudio de los ritmos en modelos como *P. clarkii*.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez; "Genetic basis of circadian rhythms in mammals"; 2004; en: "Molecular biology of circadian rhythms"; Ed. Sehgal A; 2004; John Wiley and Sons Inc; pp: 93-140
- Arechiga; 1996; "Neuronal mechanisms of biological rhythms"; en "Internal clocks and movement"; Ed. Pastor MA. Artieda J; Elsevier Science.
- Aréchiga, Fernandez-Quiroz, Fernandez de Miguel y Rodriguez-Sosa; 1993; "The circadian system of crustaceans"; Chronobiol Int. 10; pp: 1-9
- Aréchiga H, Rodríguez-Sosa; 1998; "Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish"; Proc. R. Soc. Lond; 265; pp: 1819-1823
- Altschul, Madden, Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, y D. J. Lipman; "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", 1997; Nucleic Acids Res. 25; pp: 3389-3402.
- Aschoff; 1981; en "Handbook of behavioural neurobiology, vol 4: Biological Rhythms"; 1984; ed. J. Aschoff; Plenum Press: 2ed; pp: 81-94.
- Bernal-Moreno, Miranda-Anaya y Fanjul-Moles; 1996; "Phase shifting the ERG Amplitude Circadian Rhythm of Juvenile Crayfish by Caudal Monochromatic Illumination"; Biol. Rhythm. Res; Vol 27; No. 3; pp: 299-301
- Bell-Pedersen, Cassone, Earnest, Golden, Hardin, Thomas y Zoran; 2005; "Circadian multiple oscillators: Lessons from diverse organisms"; Nat Rev Genet; vol. 6; no. 7; pp: 544-56.
- Bradley; 1974; en "Handbook of behavioural neurobiology, vol 4: Biological Rhythms"; 1984.; ed. J. Aschoff; Plenum Press: 2ed; pp: 125-140.
- Castañon-Cervantes, Escamilla-Chimal. y García-Rivera; 1996; "El cultivo del acocil"; Ciencia y desarrollo; vol. 22; no. 130; pp 76-81.
- Constance, Green, Tell y Block; 2002; "Bulla gouldiana period exhibits unique regulation at the mRNA/protein levels"; J. Biol. Rhythms; vol. 17; no.5; pp: 413-427
- Daan y Beersma; 2002 en Biological Rhythms; Ed. Vinod Kumar ; Springer; pp: 24-37
- Dunlap, Loros y DeCoursey P; 2008; "Chronobiology biological timekeeping"; Sinauer; California USA; 406 p.
- Enright; 1981; en "Handbook of behavioural neurobiology, vol 4: Biological Rhythms"; 1984; ed. J. Aschoff; Plenum Press: 2ed; pp: 11-19.
- Escamilla-Chimal, Fanjul-Moles; 2008; "Daly cicadian expression of cryptochrome during the ontogeny of crayfish"; Comparative Biochemistry and Physiolog; 151; pp: 461-470

- Escamilla-Chimal; 2007; 37th Annual Meeting Society of Neuroscience.
- Escamilla-Chimal, Hiriart; Sánchez-Soto, Fanjul-Moles; 2002; "Serotonin Modulation of CHH secretion by isolated cells of the Crayfish retina and optic lobe" Gen. Comp. Endocrin; 125; pp: 283-298.
- Haddad, Qin, Giger, Guo y Baldwin; 2007 "Potential pitfalls in the accuracy of analysis of natural sense-antisense RNA pairs by reverse transcription-PCR" BMC Biotechnology; 1472-6750; pp:7:21.
- Fanjul-Moles, Oyarzabal; "Navegación animal"; Investigación y Ciencia; Diciembre 2007; pp: 66-73
- Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo; 2003; "The circadian system of crayfish, A developmental approach". Microsc. Res. Tech; 60; pp: 291-301.
- Fanjul-Moles, Miranda-Anaya y Prieto-Sagredo; 1996; Circadian locomotor activity during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. Chronobiol. Int. 13(1), pp: 15-26.
- Fanjul-Moles, Escamilla-Chimal, Gloria-Soria y Hernandez-Herrera; 2004; "The crayfish *Procambarus clarkii* shows daly and circadian variation"; Journal of Experimental Biology; 207; pp: 1453-1460
- Ferre; "Quantitative or Semi-Quantitative PCR: Reality Versus Myth"; 1992; Genome Res; no.2; pp: 1-9.
- Giebultowicz J; 2004; "Multiple oscillators" en Molecular Biology of Circadian Rhythms; Ed Amita Sehgal; John Wiley & Sons, Inc; pp : 3-16
- Hardin; 2000; "From biological clock to biological rhythms"; Genome Biology; Vol. 4; No. 1
- Hardin, Hall y Rosbash; 1990; "Feedback of the *Drosophila* period gene on circadian cycling of its messenger RNA levels". Nature 343, pp: 536–540.
- Hastings y Maywood E; 2000; "Circadian clocks in mammals"; BioEssays 22:23–31.
- Herzog; 2007, "Neurons and networks in daily rhythms" Nature Reviews; Vol. 8; pp: 790-802
- Hiriart; 2008 en: "Biología funcional de los animales I"; Ed. Fanjul e Hiriart; Siglo XXI; 2ed; México; 2008; pp: 305-306
- Kim y Edery; 2006; "Balance between DBT/CKIepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein"; Proc Natl Acad Sci; USA; 103; pp: 6178–6183.
- Kiriakou; Peixoto; Sandrelli; Costa y Tauber; 2008; "Clines in clock genes: fine tuning circadian rhythms to the environment"; Trends in Genetics; Vol. 24; No.3
- Koukkari y Southern; 2006; "Introducing biological rhythms"; Springer ed; E.U; 650p
- Kuhulman, Mackey y Duffy; 2007; en Clocks and Rhythms; Ed. Stillman B, Stewart

D; Cold Spring Harbor Laboratory CSHL Press, 2008

pp: 1-6

- Lakin-Thomas; 2006; "Transcriptional feedback oscillators: Maybe, Maybe not..."; J. Biol. Rhythms; vol. 22; no. 2; pp: 83-92

- Looby y Loudon; 2005; "Gene duplication and complex circadian clocks in mammals"; TRENDS in Genetics Vol.21 No.1.

- Martinez-Perez, S.Zinker, Aguilar, Valdes y Arechiga; 2005; "Circadian oscillations of RPCH gene expression in the eyestalk of the crayfish *Cherax quadricarinatus*"; Peptides; 26; pp: 2434-2444.

- Messing, Gronenborn, Muller-Hill y Hofschneider; 1977 ; "Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro"; Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 74, No. 9; pp: 3642-3646.

- Moore-Ede, et. al., 1982; "The clock that time us"; Harvard Press; EUA; 448pp

- Page y Laimer; 1975; "Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm"; J. Comp. Physiol; 97; pp: 59-80

- Page y Laimer; 1976; "Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms"; Photophysiology. vol. 23; no. 4; pp:245-51

- Piccini, Couchman, Clayton, Chalmers y Kiriakou; 2000; "The clock gene *period* of the housefly, *Musca domestica*, rescues behavioral rhythmicity in *Drosophilla*

melanogaster: Evidence for intermolecular coevolution?"; Genetics Vol. 154; pp 747-758.

- Pittendrigh; 1954; "On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophilla*"; PNAS; Zoölogy; Vol. 40; pp 1018-1029

- Pittendrigh; 1981; en "Handbook of behavioural neurobiology, vol 4: Biological Rhythms"; ed. J. Aschoff; 1984; Plenum Press: 2ed; pp: 57-77.

- Prieto-Sagredo; 2002; "Caracterización del fotorreceptor caudal del acocil como posible marcapaso circadiano"; Tesis de Maestría; UNAM; Pp. 18-29, 53-61.

- Prieto-Sagredo; 1992; Tesis de licenciatura; F. Ciencias; UNAM

- Prieto-Sagredo, Fanjul-Moles; 2001; "Spontaneous and light-evoked discharge of the isolated abdominal nerve cord of crayfish in vitro reveals circadian oscillations". Chronobiology Int; vol. 8; no. 5; pp:759 – 765.

- Roenneberg y Mellow; 2002; "Life before the clock: Modeling Circadian Evolution" Journal of Biological Rhythms; Vol. 17; No. 6; pp: 495-505

- Roenneberg y Mellow; 2003; "The network of time: Understanding the molecular circadian system"; Current Biology; Vol. 13; pp: 198-207

- Rosato, Codd, Mazzotta, Piccin, Zordan, Costa y Kyriacou, C.P. "Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy

terminus of CRY". Curr. Biol. 11; pp: 909–917.

- Rubin, Shemesh, Cohen, Elgavish, Robertson, Bloch; 2006; "Molecular and phylogenetic analysis reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the evolution of the circadian clock"; Genome Research; Vol. 16; pp: 1352-1365.

- Saunders; 2002; "Insect clocks" 3rd ed.; El Sevier; Amsterdam; pp: 551

- Sehgal; 2004 en Molecular Biology of Circadian Rhythms; Ed Amita Sehgal; John Wiley & Sons, Inc; pp: 3-16

- Sheeba, Kaneko, Sharma y Holmes; 2008; "The Drosophila Circadian Pacemaker Circuit: Pas de Deux or Tarantella?"; Crit Rev Biochem Mol Biol; vol. 43 no. 1; pp: 37–61.

- Sinclair, Fetzaner, Buhay y Crandall; 2004; "Proposal to complete a phylogenetic taxonomy and systematic revision for freshwater crayfish"; Freshwater Crayfish 14; pp: 21-29.

-Solís-Chagoyán, Mendoza-Vargas, Fuentes-Pardo; 2008; "Melatonin modulates the ERG circadian rhythm in crayfish"; Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol; vol. 149; no. 4; pp: 373-9.

- Sullivan, Geneco, Marlow, Benton, Beltz y Sandeman C; 2009; "Brain Photoreceptor pathways Contributing to Circadian Rhythmicity in Crayfish"; Chron. Biol. Int; vol. 26; no. 6; pp: 1136-1168

- Turek y Takahashi; 2001 en "Handbook of Behavioral Neurobiology" Vol. 12.

Circadian clocks; Ed. Takahashi, Turek y Moore; Pleum pub; New York; 2001; 770p.

- Van Gelder y Sancar; 2003; en "Molecular clocks and light signaling"; Chadwick G y Goode A. ed; Jhon Wiley and Sons; Canada; pp: 571

- Vogt; 2002 en "Biology of fresh water crayfish"; Ed Hodich D; Blackwell Science; pp 53-141

- Wijnen y Young; 2006; Interplay of Circadian Clocks and Metabolic Rhythms. Annu. Rev. Genet; vol. 40; pp: 409-448.

- Koukkari y Sothorn; 2006; "Introducing biological rhythms: a primer on the temporal organization of life, with implications for health, society, reproduction and the natural environment"; Springer; 655p

- Williams; 2004. en: "Molecular Biology of Circadian Rhythms"; ed. Sehgal A.; Wiley Int. pp: 75-95.

- Yang et. al. 2006; "Molecular cloning of Clock cDNA from the prawn, Macrobrachium rosenbergii"; Brain Research; 1067 ; 13-24

- Yang y Sehgal; 2001; "Role of Molecular Oscillations in Generating Behavioral Rhythms in Drosophila"; Neuron; Vol. 29; pp: 453–467; 2001

- Yasuda-Kamatani. y Yasuda; 2004; "APSGFLGMRamide is a unique tachykinin-related peptide in crustaceans"; European Journal of Biochemistry; vol. 271; no. 8; pp: 1546-1556; 2004

- Yu W y Hardin P; 2006; “Circadian
oscilators of *Drosophilla* and mammals”;
Jour. Cell. Science; vol. 119; pp: 4793-4795

- <http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>

- www.ncbi.nlm.nih.gov

- www.ebi.ac.uk

- www.rcsb.org

ANEXO

I. Diseño Cebadores

Fig 1. Mapa de la posición de los cebadores para *Clock*

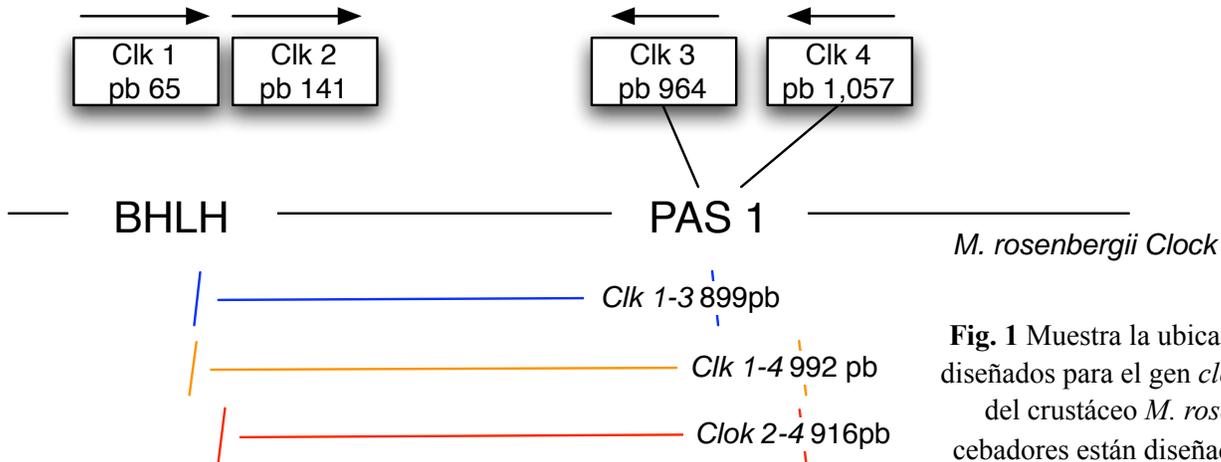


Fig. 1 Muestra la ubicación de los cebadores diseñados para el gen *clock* sobre la secuencia del crustáceo *M. rosenbergii*. todos los cebadores están diseñados sobre dominios y secuencias conservadas del gen.

Las líneas de colores representan los productos esperados para cada combinación de cebadores

Fig 2. Mapa de la posición de los cebadores para *Per*

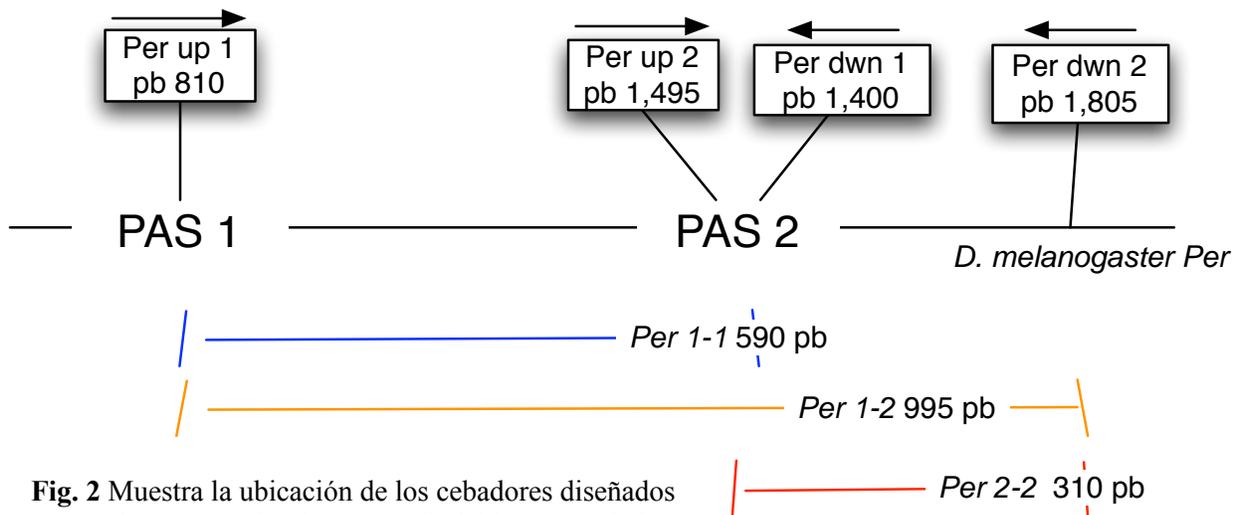


Fig. 2 Muestra la ubicación de los cebadores diseñados para el gen *per* sobre la secuencia de la mosca de la fruta *D. melanogaster*. Los cebadores están diseñados sobre dominios y secuencias conservadas del gen.

Las líneas de colores representan los productos esperados para cada combinación de cebadores y su tamaño

Fig 3. Alineación de diversas secuencias de la proteína CLOCK

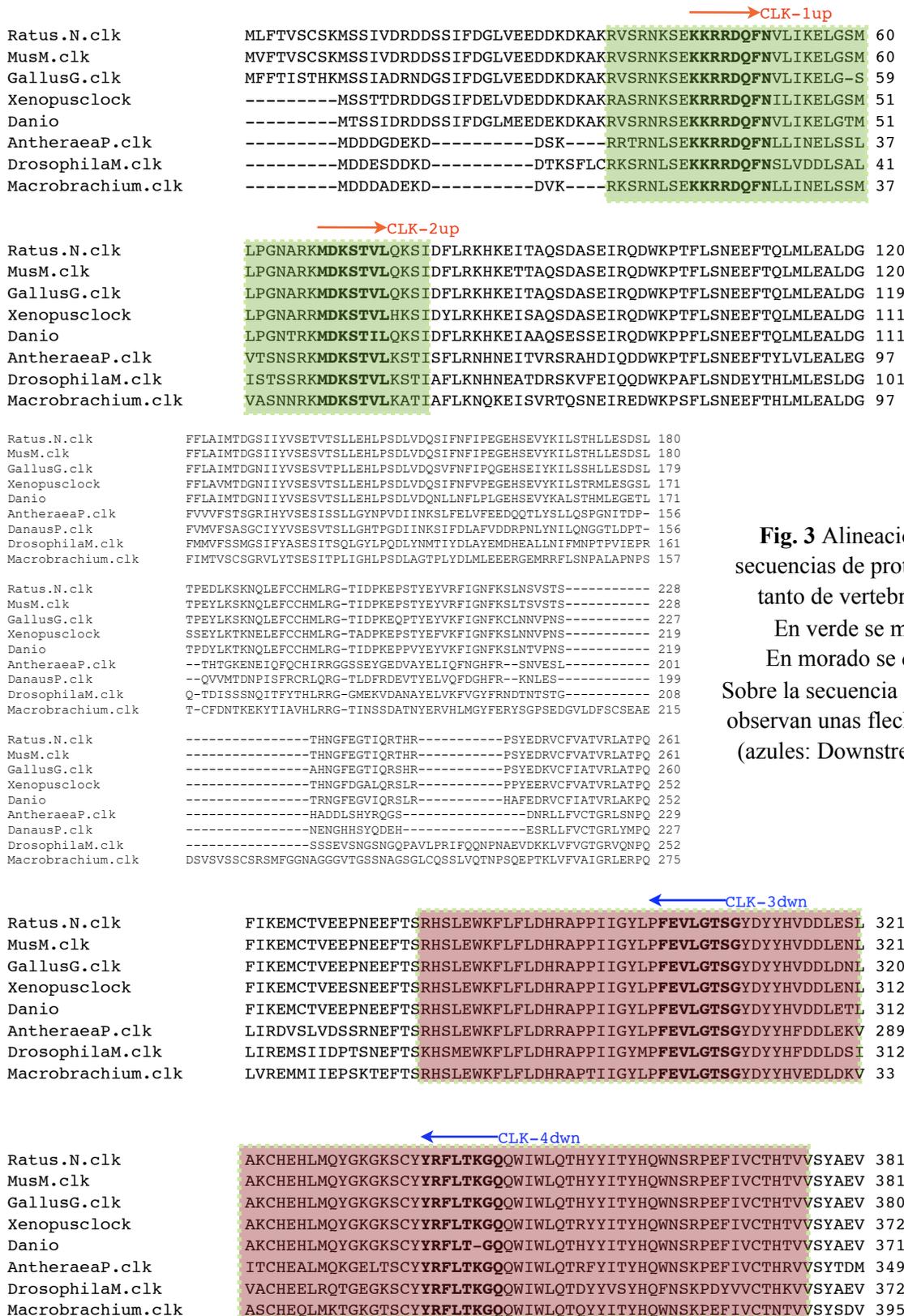


Fig. 3 Alineaciones (ClustalW) de varias secuencias de proteínas CLOCK (Gene Bank) tanto de vertebrados como invertebrados. En verde se marca el dominio BHLH. En morado se delimita el dominio PAS. Sobre la secuencia donde se diseñó el cebador se observan unas flechas con el nombre del primer (azules: Downstream (Dwn)/ rojas: Upstream (Up))

Tabla. 1 Cebadores diseñados para la amplificación de los genes *Per* y *Clk*

CEBADOR <i>Clock</i>	SENTIDO	SECUENCIA pb	TM
CLK-1up	Upstream	CGCCGCGACCAGTTCAAC	66 °C
CLK-2up	Upstream	GATGGACAAGTCCACTGTCCTG	62 °C
CLK-3dwn	Down stream	TGAAGTGTTAGGAACTTCGGGG	63 °C
CLK-4dwn	Down stream	CTACAGATTCTTGACCAAAGGAC	57 °C
CEBADOR <i>Per</i>	SENTIDO	SECUENCIA pb	TM
PER-1up	Upstream	GGCCGCTCTTTCATCGACTT	64 °C
PER-2up	Upstream	CGGCGACTACCTTAAGCTGG	62 °C
PER-1dwn	Down stream	GACTACCTTAAGCTGGAAACCG	59 °C
PER-2dwn	Down stream	AACGACTCTAAGTCTTCTACCGGC	61 °C

Tabla. 1 Muestra los diferentes cebadores diseñados con el programa Oligo v.4.1 para amplificar los genes *Per* y *Clock*.

En la primera columna se enlistan los nombres de los cebadores para cada gen y en la segunda el sentido de amplificación. La última columna señala la TM de cada cebador según la hoja de datos de los cebadores (Invitrogen).