



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL MONOFOSFATO DE ADENOSINA
CÍCLICO SOBRE EL RITMO
ELECTRORRETINOGRÁFICO (ERG) DE DOS
GÉNEROS DE CANGREJOS DE RÍO EN DIFERENTES
CONDICIONES EXPERIMENTALES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CARINA MICHELLE MARTÍNEZ AMBRÍZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1.-Datos del alumno.

Martínez
Ambríz
Carina Michelle
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305193092

2.-Datos del tutor

Dra.
María Luisa
Fanjul
Peña

3.-Datos del Sinodal 1

Dra.
Rocío
Salceda
Sacanelles

4.-Datos del sinodal 2

Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte

5.-Datos del Sinodal 3

Dr. Raúl Antonio
Aguilar
Roblero

6.-Datos del Sinodal 4

Dr. René de Jesús
Cárdenas
Vázquez

Datos del trabajo escrito.

Efecto del monofosfato de adenosina cíclico sobre el
ritmo electroretinográfico (ERG) de dos géneros
de cangrejos de río en diferentes condiciones experimentales.

68p.
2013

Índice

1. Resumen.....	6
2. Introducción:	8
2.1 Ritmos circadianos.....	8
2.2 Modelo circadiano en <i>Drosophila melanogaster</i>	10
2.3 El reloj molecular de los mamíferos.....	11
2.4 El cangrejo de río como modelo experimenta en los ritmos circadianos.....	13
2.5 <i>Procambarus clarkii</i>	13
2.6 <i>Cambarellus montezumae</i>	15
2.7 Sistema nervioso-circadiano del cangrejo de río, sistema del tallo ocular y mediadores de la ritmicidad circadiana.....	17
2.8 Registro electrorretinográfico (ERG) y ritmos circadianos del cangrejo de río.....	21
2.9 Monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), elemento de respuesta al AMPc (CRE) y proteína de unión a CRE (CREB).....	26
3. Planteamiento y justificación.....	32
4. Hipótesis.....	32
5. Objetivos.....	32
6. Métodos.....	34
6.1 Registros electrorretinográficos.....	34
6.2 Tratamiento de db-AMPc (dibutiril AMPc) en montajes de cangrejos de río íntegros para el registro del ritmo electrorretinográfico.....	34

6.3 Tratamientos experimentales para el registro ERG en tallos oculares aislados.....	35
6.4 Preparación de los fármacos.....	36
6.5 Análisis estadístico de los datos.....	38
7 Resultados.....	39
7.1 Registros ERG de <i>Procamabrus clarkii</i> íntegros con db-AMPc.....	40
7.2 Registro ERG en Ojos asilados de cangrejo de río (<i>Procambarus clarkii</i>) con el tratamiento de db-AMPc.....	43
7.3 ERG en Ojos asilados de cangrejo de río (<i>Cambarellus montezumae</i>) con el tratamiento de db-AMPc.....	44
7.4 ERG en Ojos asilados de cangrejo de río (<i>Procambarus clarkii</i>) con el tratamiento de forskolina.....	45
7.5 ERG en Ojos asilados de cangrejo de río (<i>Cambarellus montezumae</i>) con el tratamiento de forskolina.....	46
7.6 ERG en Ojos asilados de cangrejo de río (<i>Procambarus clarkii</i>) con el tratamiento de H89.....	47
7.7 ERG en Ojos asilados de cangrejo de río (<i>Cambarellus monstezumae</i>) con el tratamiento de H89.....	48
7.8 Análisis estadístico.....	49
8. Discusión.....	51
9. Conclusiones.....	58
10 Apéndice.....	59
10.1 Fundamento del Periodograma de χ^2	59
10.2 Especificaciones de los fármacos utilizados.....	61

11. Referencias.....62

1. Resumen

En vertebrados, se ha demostrado la participación del AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) y de la proteína de unión al elemento en respuesta al AMPc (CREB, *cAMP response element binding protein*), en la expresión de genes reloj, lo que afecta parámetros circadianos como el periodo del ritmo.

Por lo anterior, y en una primera aproximación al problema, en este trabajo se utilizó el ritmo de amplitud del ERG (registro electroretinográfico) de dos géneros de cangrejos de río como una expresión de los ritmos circadianos, susceptibles de ser modificados por el elemento en respuesta al AMPc, (CRE, *cAMP response element*).

Se registró la respuesta del ritmo ERG de 5 a 10 días en organismos *Procambarus clarkii* adultos e íntegros inyectándoles una solución de 10 μM de un análogo del AMPc, db-AMPc (dibutilil-AMPc) en uno de los tallos oculares. Además, para estudiar la respuesta del ERG *in vitro*, se utilizaron dos géneros de cangrejos de río: *Cambarellus monsteumae* y *Procambarus clarkii*. Cada uno de los dos ojos de cada animal se utilizó ya sea como control o como experimental registrando el ERG en cada ojo; cada condición experimental contaba con un respectivo control, el cual se colocó en una solución salina Van Harreveld. El experimento se dividió en tres grupos diferentes: el primer grupo recibió una solución de 10 μM de db-AMPc; en el segundo grupo se aplicó una solución de forskolina a 7 μM y, en el tercer grupo, se administró una solución de 10 μM de un inhibidor selectivo de la proteína cinasa A (PKA), H89. Se registró el ritmo ERG de 3 a 8 días. Todos los registros ERG (tanto en animales íntegros como en ojos aislados) se realizaron bajo oscuridad constante aplicando sobre los ojos pulsos de luz blanca de la misma intensidad cada 15 minutos para obtener el ERG.

Los resultados fueron analizados mediante cronogramas y periodogramas de X^2 . En los registros ERG en animales íntegros de *P. clarkii*, se encontró que el db-AMPc alarga el periodo del ritmo ERG. Al analizar los periodogramas controles de los registros ERG de tallos oculares aislados entre ambos géneros de cangrejos de río, no

se encontraron diferencias significativas en la duración del periodo de los ritmos. Sin embargo, la aplicación de db-AMPC y forskolina, alargaron el periodo; en contraste con el tratamiento de H89, que provocó arritmias u oscilaciones ultradianas. Se concluye que el periodo del ritmo ERG se ve afectado por el AMPC sobre el oscilador retiniano.

2. Introducción

2.1 Ritmos Circadianos

Es bien sabido que dentro de la gran variedad de mecanismos bioquímicos y fisiológicos, resultado de la evolución de los organismos, se encuentran los ritmos biológicos, los cuales oscilan con diferentes modalidades, manifestándose endógenamente bajo condiciones constantes. Existen variaciones ambientales periódicas que se repiten a intervalos de tiempo constantes, tales como los cambios naturales del día y la noche, los periodos de las mareas o los ciclos lunares o anuales. Estos cambios son producto de la rotación y traslación de la tierra y han generado durante la evolución patrones rítmicos que están impresos en el genoma de los diferentes organismos que constituyen los 5 reinos biológicos. (Cardinali; et al., 1994).

En general, se aplica el término “ritmo” a una secuencia de eventos que se repite de manera regular a lo largo del tiempo, es decir, con el mismo orden y con los mismos intervalos, por lo que un ritmo biológico es toda oscilación regular de una variable biológica, cualquiera que sea el nivel de organización considerado. El periodo es la principal propiedad canónica de un ritmo, ya que es considerado como el intervalo de tiempo en que se repite un ciclo, es decir, la duración de un ciclo completo. Otra propiedad de los ritmos es la fase, la cual es el estado instantáneo de la oscilación; para caracterizar la fase, lo más usual es determinar el momento (hora del día) en el que la variable estudiada alcanza su valor máximo a lo largo del ciclo periódico: a este tiempo se le denomina acrofase y, por otro lado, batifase al tiempo en el que la variable muestra su menor amplitud, (Cardinalli et al., 1994). Ver figura 1.

Una de las modalidades más estudiadas del amplio espectro de los ritmos biológicos son los ritmos circadianos, los cuales presentan oscilaciones endógenas que se repiten con periodos cercanos a 24 horas (“circa”, alrededor, “diem”, día). Los ritmos infradianos son los que superan periodos de 24 horas mientras que, los ritmos ultradianos, presentan periodos menores a 24 horas. Los ritmos circadianos se han documentado únicamente en cianobacterias (Golden, 1998; Lee, 2003),

Mientras el núcleo supraquiasmático funciona como un oscilador sensible a señales de luz, este es influenciado fuertemente también por el horario de alimentación, (Vollmers y Gill, 2009).

2.2 Reloj Circadiano en *Drosophila melanogaster*

En los invertebrados, la localización de algunas de las funciones circadianas se encuentran en estructuras ópticas relacionadas con la detección lumínica. El reloj circadiano de la mosca de la fruta está ampliamente estudiado y se considera uno de los modelos paradigmáticos del funcionamiento del reloj a nivel de genética molecular. Aquí se identificó el primer gen reloj, llamado periodo o *per*. A nivel molecular, el reloj circadiano de la mosca de la fruta consiste en una doble asa de retroalimentación, con procesos de transcripción-traducción interconectados. La base del modelo es la retroalimentación negativa de la proteína PER sobre su propia transcripción. Los estudios en *Drosophila* y el hecho de que los genes reloj presenten oscilaciones circadianas robustas llevó a proponer la existencia de secuencias de DNA cis-reguladoras que se unen a factores de transcripción. A tales secuencias se les denominó “cajas-reloj”, donde, más tarde la evidencia apuntó a que estos elementos reguladores eran cajas E (E-box), las cuales son secuencias hexaméricas del tipo (CACGTG), que también pueden ser cajas no canónicas del tipo (CANNTG). Un complejo activador de la transcripción formado por dos proteínas Clock (CLK) y Cycle (CYC) es capaz de unirse al núcleo a una secuencia de 6 nucleótidos en los promotores (E-Box) de dos genes *tim* (timeless) y *per* (period) activándolos. Los productos de estos genes, las proteínas TIM y PER dimerizan formando un complejo capaz de ingresar al núcleo e interactuar con CLK-CYC para inhibir su actividad transcripcional. Así los genes *per* y *tim* se transcriben rítmicamente determinando la oscilación de los niveles de las proteínas TIM y PER. En una segunda asa de retroalimentación paralela, la proteína vrilie (VRI) reprime cíclicamente la transcripción del gen *clk* y, puesto que PER y TIM inhiben la transcripción del gen *vri*, *clk* oscila en antifase con *per* y *tim*. (Aguilar, Fanjul y Carmona, 2009. *Ritmos circadianos*. En Fanjul y Hiriart, Biología funcional de los animales II. México: Siglo XXI Editores).

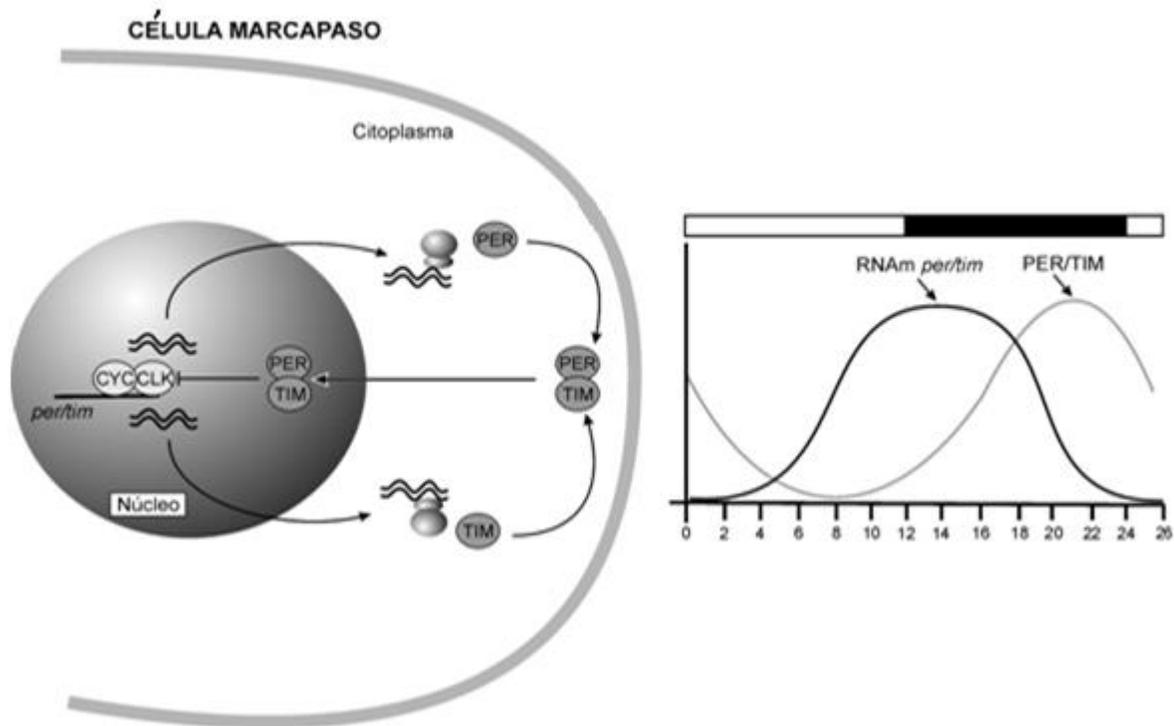


Figura 2. Diagrama que resume los componentes del oscilador molecular en la mosca de la fruta. Los factores de transcripción heterodímeros CLK-CYC promueven la expresión del RNA, los genes *per* y *tim*, la que es máxima al final del día. La traducción del RNA de esos genes produce una acumulación y dimerización de las proteínas PER y TIM dentro del citoplasma cuyos niveles son máximos en la noche donde entran al núcleo para inhibir la actividad transcripcional de CLK-CYC. (Aguilar, Fanjul y Carmona, 2009. *Ritmos circadianos*. En Fanjul y Hiriart, *Biología funcional de los animales II*. México: Siglo XXI Editores).

2.3 El reloj molecular de los mamíferos.

El reloj molecular de los mamíferos presenta un asa de retroalimentación transcripcional y postraduccional, a través de genes reloj que son suprimidos periódicamente con sus propios productos protéicos. Como se muestra en la figura 3, el reloj consiste en un asa de retroalimentación primaria que incluye a CLOCK y BMAL1, los cuales se heterodimerizan iniciando así la transcripción de genes blanco que contienen secuencias potenciales regulatorias *cis* E-box (cajas E). Estas secuencias

incluyen a tres genes *Period* (*per1*, *per2* y *per3*), dos genes criptocromo (*cry1* y *cry2*), el gen *bmal1* y el gen *clock*. En estas secuencias (cajas E) se pueden unir factores de transcripción del tipo BHLH/PAS como las proteínas BMAL y CLOCK. En el núcleo supraquiasmático de mamíferos, se ha descubierto que el mecanismo es similar que en la mosca de la fruta: una red de asas de retroalimentación que conducen a una ritmicidad endógena cercana a las 24 horas. (Ko y Takahashi, 2006). Actualmente las evidencias indican que el factor de transcripción CLOCK-BMAL1 se une a las cajas E en el promotor de los genes *per*, *cry*, *dec* y *reb-erba*. Por su parte la proteína REV-ERB α inhibe la transcripción de *bmal1* al desplazar a los factores de transcripción ROR α o ROR β de las secuencias RORE, las cuales regulan la expresión de *bmal1*. (Aguilar, Fanjul y Carmona, 2009. *Ritmos circadianos*. En Fanjul y Hiriart, *Biología funcional de los animales II*. México: Siglo XXI Editores).

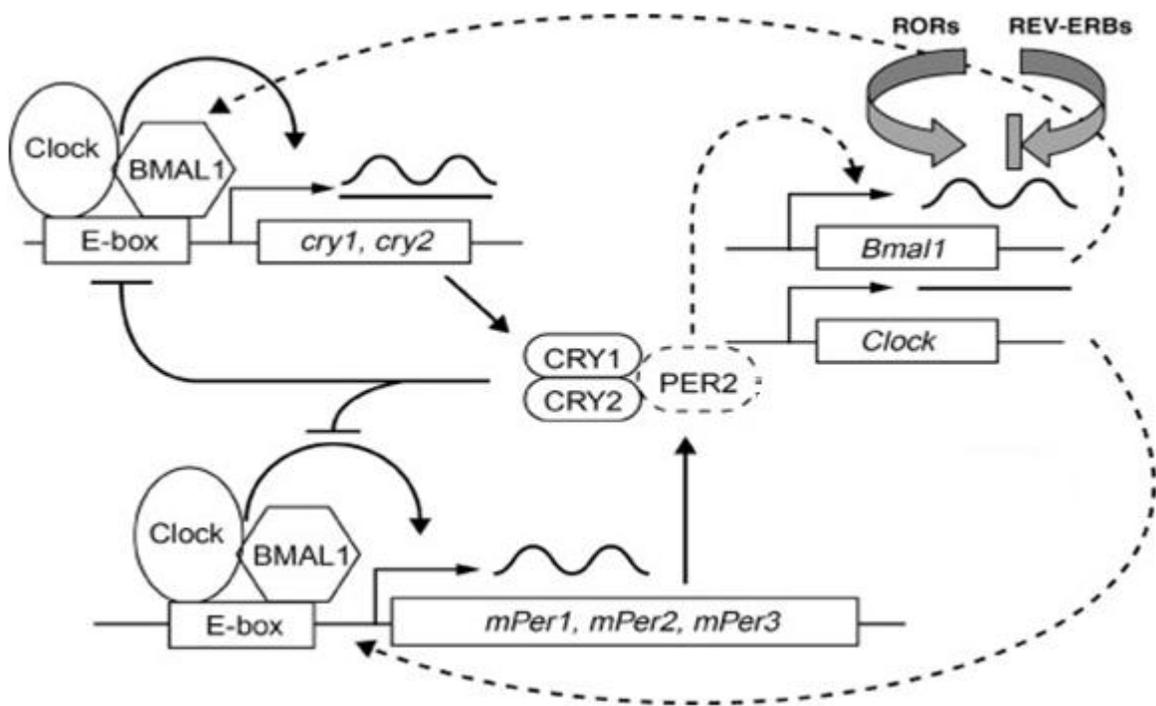


Figura 3. Asa de retroalimentación transcripcional y postraduccional: CLOCK y BMAL se heterodimerizan iniciando la transcripción de genes blanco conteniendo secuencias potenciales regulatorias *cis* E-box. Estas incluyen a tres genes *Period* (*per1*, *per2* y *per3*), dos genes criptocromo (*cry1* y *cry2*), el gen *bmal1* y el gen *clock*. (Tomado de Murphy, 2010).

2.4 El cangrejo de río como modelo experimental en ritmos circadianos.

Entre los modelos animales que se han utilizado para realizar estudios cronobiológicos están los cangrejos de río, pertenecientes al orden Decápoda de los Artropodos del grupo monofilético de los reptantia de agua dulce; conocidos también como acociles, chacales, chacalines o langostas de río, existe una amplia variedad de especies. Existen tres familias diferentes de cangrejos de río: *Cambaridae*, *Parastacidae* y *Astacidae* presentando una amplia distribución geográfica (Ver figura 6). Una gran parte de estas especies son originarias de México. Los cangrejos de río de la familia *Cambaridae* se dividen en 3 géneros: *Cambarellus*; *Orconectes* y *Procambarus*. Las diferentes especies de cangrejos de río son mayoritariamente nocturnas, las cuales presentan una gran variedad de ritmos circadianos controlados por el sistema nervioso. Kalmus (1938) concluyó que el sistema neuro-secretor encontrado en los tallos oculares es la principal fuente de actividad rítmica en estos animales. Welsh (1941), propuso que las variaciones en la actividad de los centros nerviosos son responsables del control hormonal de la migración rítmica de la capa de pigmentos retinianos. A partir de estos primeros estudios, se supo que el sistema nervioso central y el sistema neuroendócrino son responsables de la coordinación de diversos ritmos circadianos de naturaleza fisiológica y conductual como son la actividad locomotora, la migración de los pigmentos en la capa retiniana, la amplitud del ERG (registro electrorretinográfico), el ritmo cardiaco, como también funciones metabólicas y hormonales. (Fanjul y Prieto, 2003).

2.5 Cangrejo de río *Procambarus clarkii*

El cangrejo de río *Procambarus clarkii* (fig. 4) es un crustáceo decápodo de la familia *Cambaridae*, el cual es nativo del centro y sur de Estados Unidos y el noreste de México. Este animal ha sido introducido a Japón, Europa, Hawaii y Egipto. (Huner, 1998). Sus hábitos suelen ser mayoritariamente nocturnos, mostrando un temperamento agresivo con sus competidores. En los años 30' se introdujeron a China, donde han alcanzado un gran crecimiento debido a la falta de depredadores locales, causando problemas ecológicos en poblaciones de plantas, otros crustáceos y

peces. Por otra parte, estas especies propician la falta de irrigación de agua a través del daño de la hidrología de los suelos, provocando así la filtración y fuga del agua, lo cual dificulta los avances agrícolas, causando problemas económicos serios. (Li, 2005).

Este cangrejo de río es capaz de vivir tanto en aguas someras bien aireadas como en medios pantanosos salobres, lo que le confiere la posibilidad de invadir diversas zonas geográficas, (Aguilar, Fanjul y Carmona, 2009. *Ritmos circadianos*. En Fanjul y Hiriart, *Biología funcional de los animales II*. México: Siglo XXI Editores). *P. clarkii* es un gran excavador y esta labor puede producir daños en el curso de los ríos y en los cultivos, particularmente en el arroz, y sus hábitos de alimentación pueden alterar los ecosistemas nativos. Puede competir y desplazar a los cangrejos de río autóctonos, además de ser vector del hongo *Aphanomyces astaci* que causa grandes daños a otros organismos. También es vector de diversos virus de cangrejos de río como también de varios gusanos parásitos de vertebrados. Debido a su potencial colonizador y su potencial amenaza, ya sea para las especies autóctonas, los hábitats o ecosistemas, esta especie ha sido incluida en el Catálogo Español de Especies exóticas invasoras, estando prohibida en España su introducción al medio natural, posesión, transporte, tráfico y comercio; si bien se puede autorizar su pesca o captura dentro de las estrategias de eliminación. (National Biological Information Infrastructure (NBII) & IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG), 2005).



Figura 4. Cangrejo de río *Procambarus clarkii*

2.6 Cangrejo de río *Cambarellus montezumae*

El cangrejo de río *Cambarellus montezumae* (fig. 5) es un crustáceo decápodo perteneciente a la familia Cambaridae. En México, se les puede encontrar en lagos como el de Pátzcuaro, Michoacán y, algunas especies del mismo género, se pueden encontrar en lugares más comunes como el lago de Xochimilco. Es uno de los cangrejos de río más pequeños que se conocen, junto con la especie *Cambarellus diminutus*, originaria de Estados Unidos, abundando en las zonas de Mississippi y Alabama (Adams y Jones, 2010). *C. montezumae* presenta un temperamento pacífico. Se encuentra en ríos, lagos, presas, bordos y canales, asociado a las raíces de la vegetación riparia en los primeros 50 cm de profundidad. Los integrantes del género *Cambarellus* tienen potencial importancia dentro de las tramas tróficas y sólo existen unos cuantos estudios sobre su biología y, en general, se desconocen todas sus características poblacionales (Castañón et al., 1996; Rojas et al., 2002; Rangel, 2004). Se ha mostrado que los cangrejos de río *C. montezumae* pueden modificar diversas cadenas tróficas en base a su tipo de alimentación (Nystrom et al., 1996), ya que pueden consumir cantidades importantes de macrófitas, (Lodge y Lorman, 1987; Nystrom y Strand, 1996), servir de presa a una amplia variedad de organismos (Foster y Slater, 1995; Davis et al., 1999; Hinojosa-Garro y Zambrano, 2004), así como ser depredadores tanto de vertebrados como de invertebrados en los cuerpos de agua donde se encuentran (Foster y Slater, 1995; Nystrom et al., 2001; Sagova, 2002).



Figura 5. Cangrejo de río *Cambarellus montezumae*

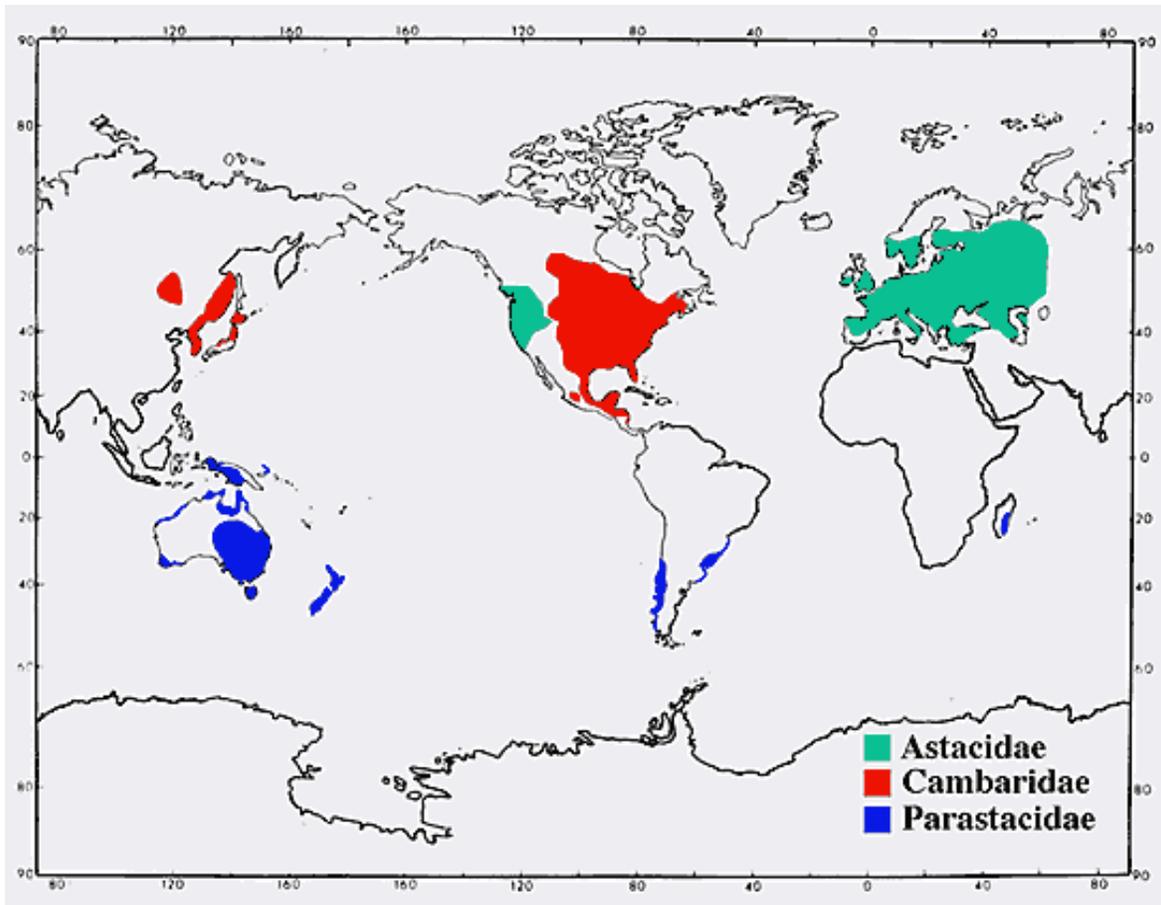


Figura 6. Distribución geográfica global de las familias de los cangrejos de río. (Tomado de Hobbs, 1974).

2.7. Sistema nervioso circadiano del cangrejo de río, sistema del tallo ocular y mediadores de la ritmicidad circadiana.

El sistema visual del cangrejo de río está localizado en un par de tallos oculares pedunculados. El ojo se encuentra en el extremo distal del tallo; por abajo del ojo se encuentran diversos neurópilos que conforman los lóbulos ópticos así como componentes del sistema neuroendócrino. Dentro de los elementos parareceptores del tallo ocular del cangrejo de río se incluyen estructuras anexas a los fotorreceptores que influyen en la captación de luz. El ojo se forma por unidades visuales u omatidias (ver figura 7) que se componen a la vez de un sistema dióptrico, un sistema fotorreceptor y un sistema parareceptor adyacente a los dos anteriores. Los más importantes son las células del pigmento distal, el pigmento proximal contenido en las células retinulares y el pigmento reflector que se encuentra a la altura de la membrana basal. Los cambios de posición que representan estos pigmentos (conocidos como pigmentos retinianos accesorios) pueden hacer que la omatidia quede protegida por ellos, o bien, que quede expuesta a la llegada de luz no sólo por el eje principal, sino también por las regiones laterales. En el primer caso, se habla de una adaptación a la luz, mientras que en los pigmentos proximales se habla de una adaptación a la oscuridad (figura 8). La adaptación a la luz implica la poca llegada de luz hacia el rabdomo y lo contrario sucede durante la adaptación a la oscuridad. Los mecanismos involucrados en los pigmentos distales funcionan a través del sistema neuroendócrino, mientras que el pigmento proximal funciona en base al sistema nervioso. (Fuentes y García, 1979). No hay información reportada respecto al pigmento reflector.

Como se aprecia en la figura 7, las omatidias son las unidades sensoriales formadas por las células fotorreceptoras, capaces de responder a la luz, y en algunos casos, capaces de distinguir colores. El conjunto de omatidias forman los ojos compuestos, presentes en crustáceos e insectos. (Müller y Sombke, 2000).

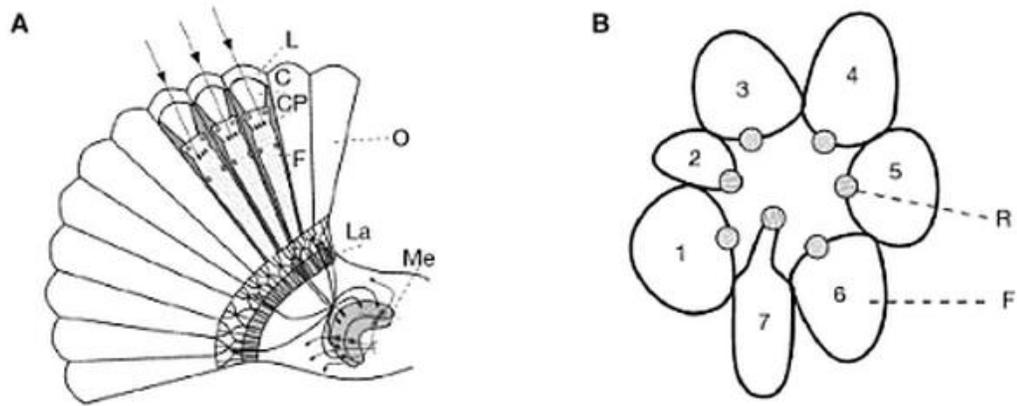


Fig.7. A Diagrama de un corte a través del ojo compuesto y parte del lóbulo óptico de la mosca. L: lente de la córnea; La: lámina; Me: médula externa; C: cono cristalino; CP: célula pigmentada; O: omatidia. | B. Corte transversal de las células retinulares; 1-7: fotorreceptores; R: rabdomero; F: fotorreceptor. (Pérez y Salceda, 2009. *El proceso visual en invertebrados y vertebrados*. En Fanjul y Hiriart, *Biología funcional de los animales II*. México: Siglo XXI Editores).

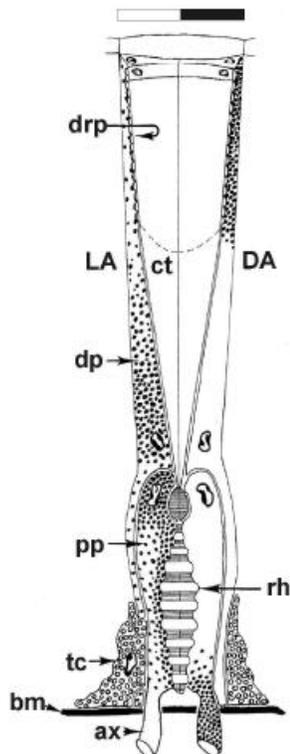


Figura 8. Distribución de los pigmentos retinianos en la omatidia del cangrejo de río adaptada a la oscuridad (DA) y adaptada a la luz (LA). Ambos pigmentos proximales (pp) en células fotorreceptoras y pigmentos distales (dp) en células del pigmento distal cambian de posición dependiendo de la iluminación. Abreviaciones ax: axón de la célula retinular; bm: membrana basal; ct: tracto cristalino de las células del cristalino; drp: plaquetas distales reflectoras; dp: células del pigmento distal; pp: pigmento proximal entre las células fotorreceptoras; rh: rabdoma de las células fotorreceptoras; tc: células del tapete = células reflectoras del pigmento. (Richter, 2002).

El tallo ocular de los crustáceos decápodos está constituido por ganglios visuales o neurópilos formados por neuronas periféricas, la medula ganglionaris, la médula externa, la médula interna y finalmente la medula terminalis, la cual, puesto que el ojo se formó por una evaginación cerebral, es de hecho parte del protocerebro lateral del cerebro central. (Ver figura 9). El tallo ocular es una importante fuente de neuropéptidos y pequeñas moléculas moduladoras tales como la melatonina y serotonina, involucrados en la regulación circadiana, que afectan los ritmos de locomoción, distribución de los pigmentos y sensibilidad de los ojos. (Blaustein, 1988). La mayor parte de la neurosecreción se produce en el órgano X y se almacena en la glándula sinusal formada por las terminales axónicas de los diferentes tipos neuronales que constituyen este órgano. La glándula sinusal está irrigada por capilares sanguíneos por los cuales vierte las diferentes neurosecreciones a la hemolinfa de manera cíclica. Esta glándula es por lo tanto un importante órgano neurohemal. El órgano X se ubica en la corteza lateral anterior de la médula terminalis, próximo al cuerpo hemielipsoide y a la glándula sinusal; esta última se sitúa usualmente adyacente al borde entre la médula externa e interna, la cual, como se señaló anteriormente, está formada por terminales axónicas del sistema órgano X-glándula sinusal y otras neuronas que colindan alrededor de la arteria ocular. A partir de tal organización en el sistema órgano X-glándula sinusal, se han identificado neuropéptidos clave que son liberados dentro de la hemolinfa tales como la hormona

de concentración de pigmento rojo (RPCH), hormonas hiperglucémicas de crustáceos (CHH's), hormona inhibidora de la muda (MIH), hormona inhibidora de la vitelogénesis/gónadas (VIH/GIH) y hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH). (Margerich, 1986). Sin embargo, la glándula sinusal recibe señales de otras regiones del cerebro. La expresión y liberación de neuropéptidos a partir de este sistema, en particular de neuropéptidos como son RPCH y CHH's, presentan una ritmicidad circadiana. Este sistema puede ser modulado por la iluminación retiniana. (Harzsch, 2009).

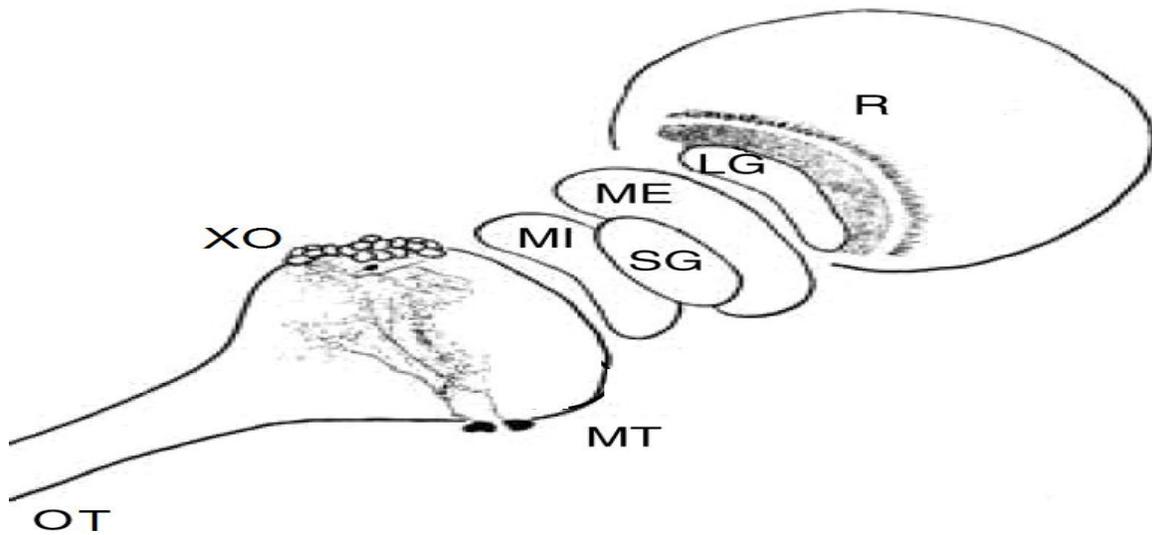


Figura 9. Pedúnculo ocular de *P. clarkii*; R: retina; LG: lámina ganglionaris; ME: Médula externa; MI: Médula interna; MT: Médula terminalis; SG: Glándula sinusal; XO: Órgano X; OT: Tracto óptico. (Tomado de Cebada y García, 2007).

2.7.1 Hormona dispersora de pigmento (PDH).

La hormona dispersora de pigmento (PDH) es una neurohormona reguladora de: 1) La dispersión de los gránulos de pigmento en los pigmentos distales de células retinianas, 2) la dispersión de los pigmentos en cromatóforos integumentales, (Kleinholz et al, 1962) y, 3) las respuestas fisiológicas y sensibilidad del ojo compuesto directamente. (Gaus y Stieve, 1992). La PDH no afecta los movimientos de

los gránulos de los pigmentos proximales en células retinulares fotorreceptoras. La dispersión de los pigmentos dentro de las células primarias pigmentarias, provee un escudo extra a los fotorreceptores y al aparato dióptrico durante la fase lumínica, lo cual incrementa la agudeza visual. En experimentos de ablación del tallo ocular, se ha visto que el sistema neuroendócrino del tallo ocular es elemental para que se lleven a cabo los movimientos de los pigmentos distales retinianos. La PDH incluso causa la dispersión de los pigmentos en retinas aisladas del cangrejo de río *O. limosus* y *P. clarkii*. (Strauss y Dirksen, 2010). Ver figura 8.

2.8 Registro Electrorretinográfico (ERG)

La respuesta eléctrica de los fotorreceptores del cangrejo de río *Procambarus clarkii* a la luz (registro electrorretinográfico, ERG), varía de una manera circadiana. En este modelo animal, se ha estudiado ampliamente el ritmo de amplitud ERG. El ritmo ERG es el resultado de variaciones en el día y la noche en la amplitud de la respuesta del fotorreceptor a un pulso de luz de una intensidad estándar. (Fanjul y Prieto, 2003). Tales variaciones dependen de: 1) cambios en la sensibilidad del fotorreceptor, 2) la posición de los gránulos del pigmento proximal absorbente (PP) o pigmentos retinulares, dentro del mismo fotorreceptor, y 3) la posición de los gránulos del pigmento distal (DP). (Aréchiga, 1993). Ambos pigmentos son principalmente omócromos (Ghidalia, 1985), los cuales son los efectores de una respuesta foto-motriz a la luz que provee a cada omatidia con su propia pupila regulatoria. En la oscuridad, los pigmentos proximales se retractan a la estructura terminal del axón de la célula retiniana, dejando así al fotorreceptor expuesto a la luz. El pigmento distal se localiza dentro de las células del pigmento distal, (Rao, 1985). Estas células se localizan alrededor del cono cristalino con sus procesos extendidos hacia las células de la córnea y basalmente hacia la membrana basal. Estos pigmentos también son retractados en oscuridad, y se dispersan con iluminación. (Fanjul y Prieto, 2003).

Hay evidencia de que el movimiento del pigmento proximal puede ser controlado a través de cambios de conductancia en los potenciales de membrana de las células retinianas en algunos crustáceos (Ludolph et al., 1973), o bien, a través de una modulación serotonineérgica en el cangrejo de río, (Frixione y Hernández, 1989). Es ya sabido que el pigmento proximal exhibe un ritmo circadiano con movimiento mecánico bajo oscuridad constante (DD), (Bennitt, 1932), mientras que el pigmento distal muestra un ritmo circadiano parecido, ya sea en oscuridad constante o luz constante (LL), (Welsh, 1930). En los cangrejos de río *Procambarus bouvieri* y *Procambarus clarkii*, los pigmentos retinianos distales y proximales presentan ritmos circadianos en sus movimientos. Pero, en el pigmento reflector contenido en las células secundarias del pigmento o células del tapetum, tales movimientos son estacionarios, (Rao, 1985). Los movimientos rítmicos de los pigmentos anteriores son acompañados por una variación circadiana de sensibilidad retiniana, que se pueden medir como cambios en la amplitud del ERG, (Aréchiga y Fuentes, 1970). En este ritmo, la amplitud del ERG es mayor cuando los pigmentos están en posición de adaptación a la oscuridad, y menor durante el estado de adaptación a la luz. (Aréchiga y Wiersma, 1969). Es importante mencionar que la amplitud del ritmo ERG del cangrejo de río sólo se ha asociado a los ritmos circadianos de los dos pigmentos retinianos mencionados anteriormente.

Se cree que este ritmo está controlado tanto por estructuras neurales como neuroendócrinas del cerebro y estructuras neuro-secretoras del lóbulo óptico, en particular el complejo OX-GS (Fanjul y Prieto, 2003). Además de ser regulado por la luz; se ha observado que la melatonina es capaz de sincronizar el ritmo del ERG, proponiendo a esta neurohormona como un sincronizador no fótico (Solís, et al., 2008).

Tanto en *Procambarus bouvieri* como en *Procambarus clarkii* se han hecho diversos experimentos para localizar marcapasos y funcionamiento del ritmo circadiano ERG. Estos experimentos incluyen lesiones y ablaciones, así como aislamiento y cultivo de órganos. Estos estudios sugirieron que el ritmo ERG es controlado por mecanismos neurales y neuroendócrinos que dependen del cerebro y

estructuras neuro-secretoras del lóbulo óptico (en particular el XO-SG), aunque existe una oscilación intrínseca que depende de la retina. (Aréchiga y Rodríguez, 1998). Al remover el cerebro, tanto la amplitud del ritmo ERG, así como la de los ritmos de los pigmentos retinianos desaparecen (Aréchiga, 1973), mientras que existen otros reportes que marcan la persistencia de ambos ritmos, pero con amplitudes bajas (Barrera, 1976). Si se extrae completa la sección del tracto del protocerebro, no se muestra un ERG claro, sin embargo muestra un bajo nivel de ritmicidad con un estímulo de baja intensidad (Barrera, 1978). En base a una bidisección del cerebro en la línea media, desaparece la amplitud del ritmo ERG de ambos ojos, pero cuando al cerebro se le realiza una bidisección parcial a partir del centro dorsal del órgano, el ritmo del ERG de cada ojo persiste en cierto grado. (Page y Larimer, 1975).

En cultivos de tallo óptico se presenta una baja amplitud del ritmo ERG sin oscilaciones de los pigmentos retinianos (Sánchez y Fuentes, 1976). Reportes posteriores muestran la persistencia del ritmo ERG en preparaciones aisladas de retina y lámina mantenidos en oscuridad (Aréchiga y Rodríguez, 1998). Todos los experimentos en animales intactos mostraron que en ambos ojos se presentan oscilaciones con cambios de fase, pero el máximo desacoplamiento ocurre cuando se hace una pequeña lesión en el centro del tracto del protocerebro luego de la disección del tracto óptico, o en preparaciones de cerebro separadas. El ritmo en cada ojo persiste en base a diversas preparaciones, lo cual implica un sistema de osciladores bilaterales. Barrera y Block, 1990, demostraron que la preparación protocerebro/tallos oculares aislados exhibe cambios de fase significativos en el ritmo ERG, los cuales pueden desincronizarse a través de una bidisección del protocerebro. Estos estudios indican que hay una vía de entrada desde el cerebro hacia el lóbulo óptico que controla los diferentes efectores del ritmo circadiano exhibido a través del ERG. Anteriormente Larimer y Smith, en 1980, propusieron que el ritmo ERG es regulado mediante axones neuro-secretores procedentes del cerebro hasta los lóbulos ópticos, de tal forma que el cerebro sería el responsable de controlar las neurosecreciones del lóbulo óptico las cuales provocan el movimiento de los pigmentos. Los experimentos de Barrera y Block (1990) indican que probables

marcapasos protocerebrales y sus vías de entrada a los lóbulos ópticos, son responsables de la expresión y sincronización bilateral del ritmo ERG (ver figura 10). Este complejo axonal puede ser modulado por axones que se encuentran de un extremo a otro del SOG, o por fibras eferentes del cerebro hacia el lóbulo óptico. Algunos de estos axones muestran contenido de serotonina, (Aréchiga, 1990). Una segunda vía que contribuye a la unión y sincronización de estos ritmos, es la vía hormonal que regula a los pigmentos distales y proximales en la retina, la cual hace posible el transporte de elementos hormonales como la DPH, RPCH y 5-HT (5-hidroxitriptamina). La presencia de ritmos circadianos de la DPH y RPCH se ha comprobado en tallos ópticos aislados de *Procambarus clarkii*. (Aréchiga et al., 1990)

El hecho de que los ritmos circadianos puedan controlarse por un ciclo de luz, demuestra que los marcapasos tienen acceso a fotorreceptores. Como en el caso del ritmo de la actividad locomotora, se ha mostrado que la amplitud del ritmo ERG en *P. clarkii* es controlada por fotorreceptores extra-caudales y extra-retinianos que se localizan en el ganglio supraesofágico, (Page y Larimer, 1975; Sullivan et al., 2009). Sin embargo, se ha reportado que el cambio de fase del ritmo y amplitud del ERG es posible a través de una iluminación local del sexto ganglio abdominal de *P. bouvieri*. (Fuentes e Inclán, 1987, Bernal-Moreno et al., 1996; Rodríguez-Sosa, 2006). Se ha comprobado la presencia de fotorreceptores en el cerebro de cangrejos de río tanto, de *Procambarus clarkii* como de *Cherax destructor* (Sullivan et al., 2009).

Los axones de los fotorreceptores extra-retinianos finalizan en el puente protocerebral, donde las fibras de serotonina se proyectan hacia la médula externa y a la región de la glándula sinusal. (Sanderman, 1988). Si esta glándula se remueve, se corrompe el ritmo del ERG y de las pseudopupilas de *P. clarkii*, (Hernández, 1987). Lo anterior sugiere una vía de entrada serotoninérgica a partir de fotorreceptores cerebrales hacia el sistema circadiano. Los ritmos circadianos de la sensibilidad retiniana son controlados por un par de fotorreceptores extrarretinianos y tres pares de osciladores (las células retinulares en los dos ojos, el sistema neuro-secretor en los dos lóbulos ópticos y un par de marcapasos putativos. (Fanjul y Prieto, 2003).

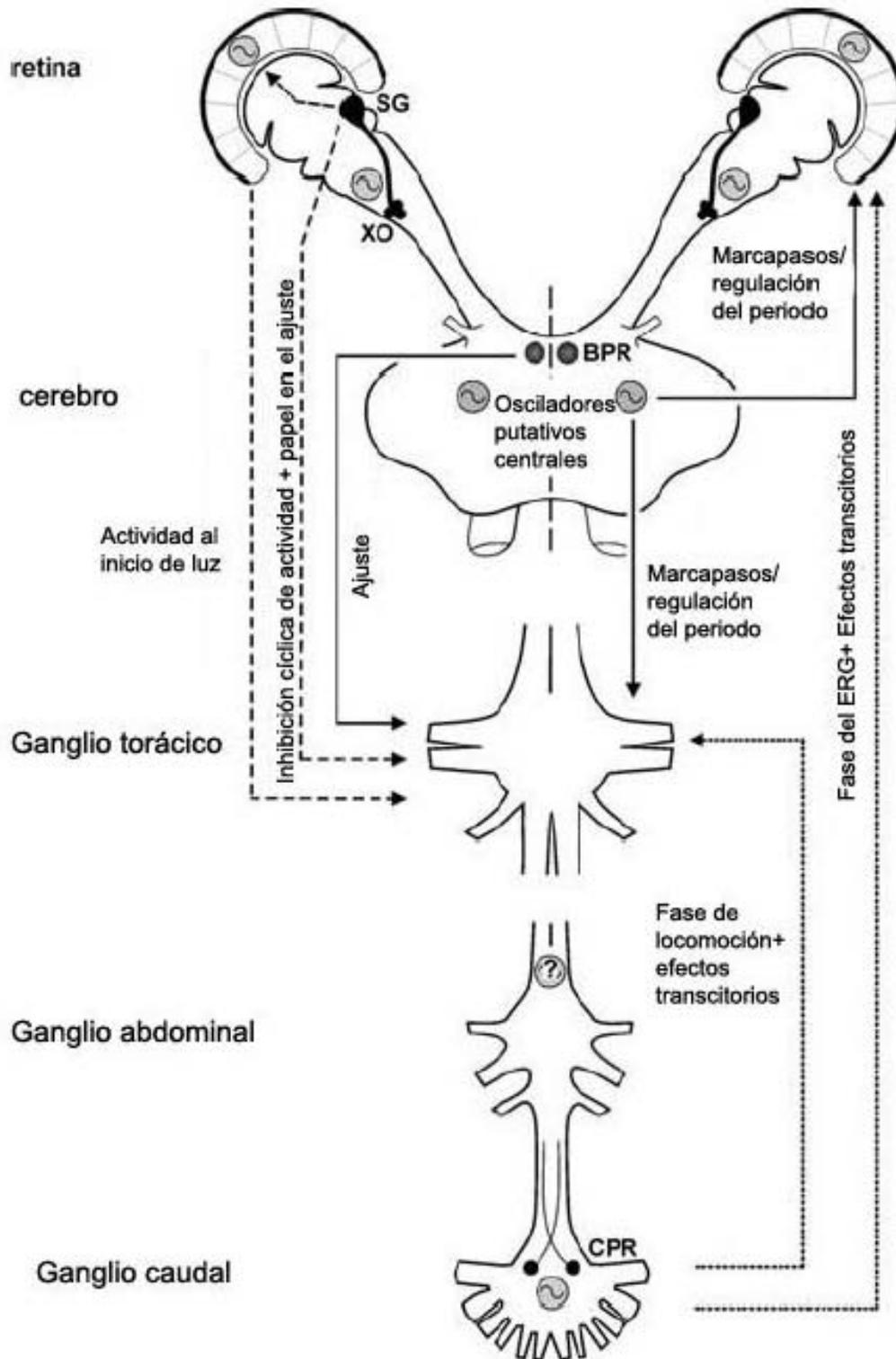


Figura 10. Esquema del sistema multi-oscilatorio propuesto para el cangrejo de río donde se muestran los osciladores circadianos y sus correlaciones funcionales. Los

osciladores o marcapasos fisiológicos establecidos (círculos grises) se presentan en la retina, el sistema del órgano X y la glándula sinusal, los fotorreceptores caudales (CPRs), los cuales modulan los cambios de fase durante la fotosincronización. Se muestra también el cerebro junto con los fotorreceptores cerebrales (BPR); estos últimos, no son osciladores, pero son responsables de la fotosincronización de la luz en los ritmos locomotores; las flechas indican los efectos respectivos sobre la locomoción y la amplitud del registro ERG. El símbolo de interrogación en el ganglio abdominal se refiere a un posible oscilador en el cordón nervioso ventral. Abreviaciones: BPR: fotorreceptor cerebral; CPR: fotorreceptor caudal; R: retina; SG: glándula sinusal; XO: órgano X. (Tomado de Strauss y Dirksen, 2010).

2.9 Monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), elemento de respuesta al AMPC (CRE) y proteína de unión a CRE (CREB).

El monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) actúa como segundo mensajero al activar de manera alostérica una o varias proteínas cinasas (PK) denominadas PKA. Estas enzimas fosforilan diversas proteínas de membrana y citoplasmáticas. Además, modifican la expresión génica por medio de la activación de uno o varios factores de transcripción. El más conocido es el denominado CREB (*Cyclic-AMP response-element-binding protein*/proteína de unión al elemento en respuesta al AMPC). Los niveles de AMPC son regulados por la actividad de las enzimas adenilato ciclasa (síntesis) y de las fosfodiesterasas (degradación). La adenilato ciclasa es activada por una o varias proteínas G (asociadas a GTP) estimuladoras (Gs), e inhibida por las proteínas G inhibitoras (Gi), ubicadas ambas en la cara interna de la membrana celular. (Dvorkin, 2010).

Algunos mecanismos de control de la transcripción pueden clasificarse basándose en la respuesta común a ciertos factores metabólicos. Las moléculas que responden a estos factores son llamados elementos de respuesta. CRE (elemento de respuesta al AMPC) se enlaza con proteínas (factores de transcripción, como CREB) producidas en ciertas condiciones de la célula, activando así a varios genes

relacionados. En esta forma difieren así de los operones porque los genes no se enlazan en secuencias ni son controlados por un promotor único. Varios genes diferentes, todos ellos con promotores únicos, pueden ser afectados por el mismo factor de transcripción que se enlaza con el elemento de respuesta al AMPc. (Campbell, 2004).

El factor de transcripción CREB es una proteína de 43 kilodaltones localizada en el interior del núcleo que puede unirse al AMPc y afectar de este modo a la actividad génica, regulando la transcripción de genes que contienen un lugar CRE en sus regiones reguladoras. CREB es un elemento de la familia básica de factores de transcripción "helix-loop-helix", las cuales incluyen a ATF-4 (factor activador de transcripción 4) y CREM (proteína moduladora del elemento de respuesta al factor activador de transcripción 1 y AMPc). El proceso en donde participa CREB involucra al AMPc, el cual interactúa con la proteína cinasa A (PKA) que fosforila a CREB en el núcleo de la célula. La proteína CREB fosforilada interviene en la regulación de la actividad de algunos genes que, al expresarse, dan lugar a diferentes productos protéicos que pueden modificar la actividad de la célula. (Soriano, 2007). Aunque aún continúan las investigaciones, la transcripción mediada por CREB se ha relacionado con una gran variedad de procesos fisiológicos como son la proliferación, diferenciación celular, espermatogénesis y ritmos circadianos. (Campbell, 2004).

La inducción de la expresión génica a través de CREB (transactivación) es un proceso que inicia con la fosforilación de la serina 133 a través de vías activadoras de cinasas de AMPc, como la vía de la PKA, la cual es activada por la liberación de AMPc; la proteína cinasa C, que es estimulada por la liberación de Ca^{2+} y MAPK's (*mitogen activated protein kinase*) también fosforilan a CREB. (Campbell, 2004). Estos eventos permiten que el dominio KID (región de 60 aminoácidos que contiene al sitio de fosforilación por PKA) de CREB se una a la proteína scaffold de andamiaje CBP la cual, es una proteína ligadora enlazándose a CREB después de que ha sido fosforilado, para formar posteriormente un puente entre el elemento de respuesta y la región promotora, considerándose así a CBP como un mediador o coactivador. (Campbell, 2004). La asociación de CREB con CBP antes explicada, estabiliza al complejo

transcripcional que facilita la transcripción de genes. Se ha determinado que la importancia de CREB en la fisiología del núcleo supraquiasmático en mamíferos, subyace en que esta vía se activa con una respuesta fótica, induciendo así con la luz el ajuste del reloj, donde la activación de CREB está bajo control de un oscilador circadiano, por lo que varios genes reloj son blanco de la vía CREB/CRE (Boyoung, 2010). EL aumento de AMPc estimulando a la PKA, provoca la translocación al núcleo donde fosforila a CREB y aumenta así su afinidad por CBP. El complejo CREB-CBP activa la transcripción. La respuesta termina cuando la PKA fosforila una fosfatasa que desfosforila a CREB. (Barne y Levy, 2009). Ver figura 11.

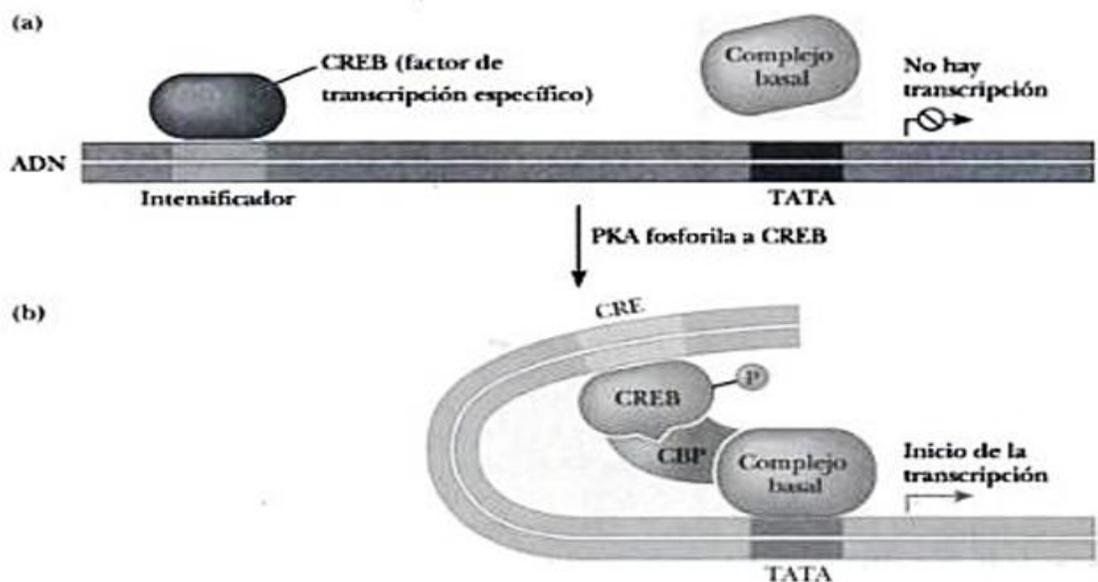


Figura 11. Activación de la transcripción vía CREB y CBP. a): CREB no fosforilado no se enlaza con la proteína enlazante de CREB (CBP) y no ocurre la transcripción. b) La fosforilación de CREB ocasiona que se enlace CBP a CREB, uniéndose posteriormente con el complejo basal ARN polimerasa y el Factor General de Transcripción-GTF) que activa la transcripción. (Tomado de Molecular Biology por Weaver F.R., McGraw-Hill, 1999).

2.9.1 Papel del AMPc y CREB en el reloj circadiano.

La señalización de segundos mensajeros se ha visto como una parte importante dentro de la inducción celular. La modulación circadiana de la señalización con segundos mensajeros se ha reportado como una vía de salida en la ritmicidad celular en el SCN en mamíferos, ya sea *in vivo* o *in vitro*. (O'Neill y Reddy, 2012). Una característica interesante, son los mecanismos intracelulares que inducen la transducción a partir de una señal de ajuste que modifica la expresión circadiana de los genes reloj. En 1998, Balsalobre y Damiola reportaron que un shock de suero induce oscilaciones circadianas de y control de genes reloj en fibroblastos de rata-1 (mutante). Esta respuesta al shock de suero probablemente mimetiza el efecto que realiza la luz en el núcleo supraquiasmático ya que ambos provocan una inducción aguda e inmediata de la expresión de mRNA de *per1*. En el año 2000, Zhua y LaRue demostraron la inducción del ciclaje de *per1* a base de un tratamiento de shock de suero y luz, en cultivos retinianos de *Xenopus laevis*. Desde estos importantes hallazgos, una variedad de tratamientos se han reportado con la característica de modificar los ritmos circadianos en células cultivadas. (Neill, et al, 2008). Dentro de los factores que modulan la transducción en las vías de señalización, se han visto involucrados niveles elevados de AMPc y/ o Ca²⁺ aunados a la activación transcripcional de CRE en el promotor de *per 1 y 2*. (O'Neill y Reddy, 2012). Ver figura 12.

Como se señaló anteriormente, la oscilación de la expresión de los genes reloj es el resultado de la interacción de los componentes de las asas de retroalimentación interrelacionadas en el reloj molecular. Se ha visto que la señal del AMPc constituye un auténtico componente de la red circadiana. En los mamíferos, se ha demostrado que la señalización de AMPc es rítmica, sosteniendo al asa transcripcional del núcleo supraquiasmático, determinando propiedades canónicas del marcapasos como es el periodo del ritmo (Neill, 2008). Masao (2010) menciona que los niveles intracelulares de AMPc influyen en las características circadianas de células del núcleo supraquiasmático. Estas cantidades de AMPc intracelulares provocan cambios en el periodo del ritmo de la actividad locomotora a través de ensayos que inhiben la

producción intracelular del AMPc en este marcapasos y teniendo incidencia directa en el ciclaje de genes reloj como es *per1*. (Neill, 2008).

2.9.2 Activadores de la adenilato ciclasa e inhibidores de la proteína cinasa A

La forskolina es una sustancia extraída de la planta *Coleus forskohlii*, la cual es capaz de inducir la expresión inmediata del mRNA de *per1* y disparar la expresión de los genes circadianos en fibroblastos de rata-1, (Yoshiki y Eisuke, 2003). Se ha propuesto que lo anterior se debe a la activación de la adenilato ciclasa, que incrementa los niveles intracelulares de AMPc, y la PKA. La inducción de la expresión transitoria del mRNA de *per1* es inhabilitada a través de un inhibidor de cinasas dependientes de AMPc. Por otra parte, tanto una PKA específica de un análogo de AMPc, como el incremento de calcio intracelular, pueden inducir la expresión rápida de *per1*, lo que sugiere la participación de la transducción de la señal de calcio en el ajuste del reloj circadiano. Diversos datos sugieren también que CREB actúa río arriba de los componentes principales del reloj. CREB fosforilado puede unir sitios de CRE en el promotor de *per1* e inducir directamente su transcripción, así como CREB puede ser fosforilado por múltiples proteínas cinasas incluyendo a la PKA. La cinasa dependiente de calmodulina y la vía de MAPK pueden ajustar también al reloj circadiano a través de la activación de CREB. (Yoshiki y Eisuke, 2003).

En diversos estudios se han encontrado alrededor de 65 compuestos que son inhibidores específicos de varias proteínas cinasas. Así como existen activadores de la maquinaria circadiana a nivel molecular, promoviendo el aumento de la expresión de diversos elementos reloj, existen inhibidores de algún elemento que interviene en la vía de señalización AMPc-CREB antes explicada. (Bain, et al., 2007). Tal es el caso del péptido inhibidor de la proteína cinasa A dependiente de AMPc, también conocido como PKI, el cual inhibe la fosforilación de proteínas blanco uniéndose al sitio del sustrato de la proteína de la subunidad catalítica de la PKA, (Beale y Deadman, 1977). Otro fármaco utilizado en diversos estudios, es el compuesto H89, el cual se ha reportado como un inhibidor selectivo de la PKA. (Bain, et al, 2007).

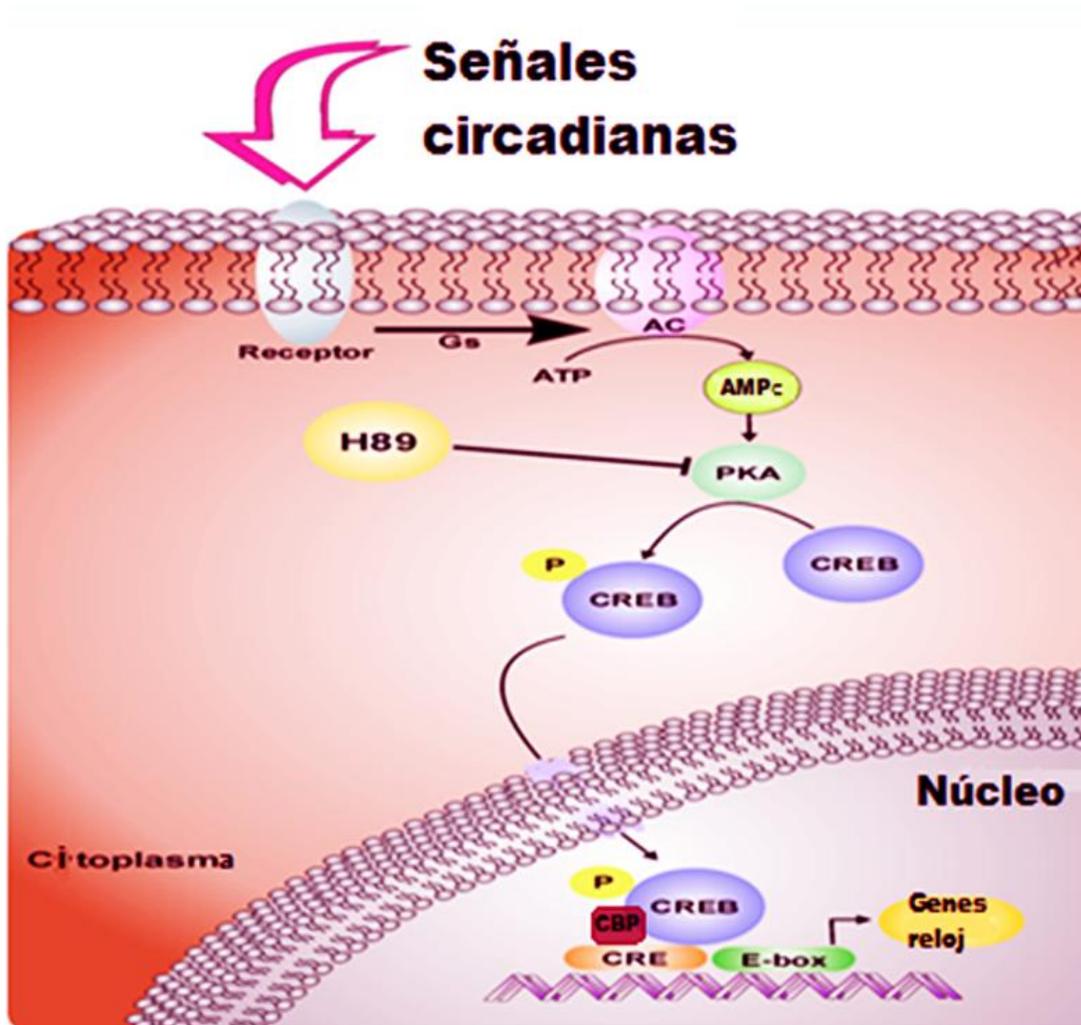


Figura 12. Modelo que explica una posible regulación transcripcional en los genes reloj a través de señales circadianas responsables de la expresión de la amplitud del ritmo ERG. La unión de una señal circadiana con su receptor, ya sea una molécula o una señal lumínica, provoca un incremento de la concentración intracelular de AMPc a través de la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC), la cual, activa a la proteína cinasa A (PKA). La activación de esta vía mediante la interacción de AC/PKA induce la respuesta inmediata de factores de transcripción, tal como CREB, el cual, ya fosforilado, con la proteína de enlace CBP, se une en el DNA a una secuencia específica (CRE) y a elementos promotores E-BOX, los cuales activan la transcripción de los genes reloj.

3. Planteamiento y justificación.

La proteína de unión al elemento en respuesta al AMPc (CREB, *cAMP response element binding protein*) actúa como un factor de transcripción uniéndose a ciertas secuencias de DNA llamados elementos de respuesta al AMPc, mediante los cuales se incrementa o reduce la transcripción de los genes reloj. Tanto estructural como funcionalmente, CREB está relacionado con el elemento de respuesta al AMPc, (CRE, *cAMP response element*). La interacción de CREB con CRE induce la expresión de genes reloj en los mamíferos particularmente del gen *per*. Se ha propuesto que tal inducción de la expresión génica a través de CREB (transactivación) de los genes reloj, presenta una interacción con el AMPc (monofosfato de adenosina cíclico), la cual es rítmica y mantiene al asa transcripcional del núcleo supraquiasmático, determinando propiedades canónicas del marcapaso como es el periodo del ritmo. Tanto *in vivo* como *in vitro* se ha demostrado que el AMPc / Ca⁺⁺ inducen la expresión de genes reloj propiciando la sincronización del reloj en la fase nocturna. Teniendo en cuenta los resultados en trabajos anteriores en mamíferos, en esta tesis se pretende comprobar el efecto del AMPc sobre la expresión del ritmo circadiano ERG, investigando la acción directa e indirecta de este compuesto en el ojo del cangrejo de río, tanto en animales íntegros como en tallos oculares aislados.

4. Hipótesis

En el cangrejo de río, El AMPc modula al periodo del ritmo circadiano del ERG mediante su acción sobre la PKA y la vía de señalización CREB-CRE.

5. Objetivos

Generales

Determinar si el efecto del AMPc sobre el ritmo ERG del cangrejo de río es debido a una posible vía de señalización de CREB.

Particulares

Evaluar el efecto del AMPc sobre el periodo del ritmo ERG en cangrejos de río adultos e íntegros.

Evaluar el efecto del AMPc en ojos aislados de dos géneros de cangrejos de río sobre el periodo del ritmo ERG.

Evaluar el efecto de un activador de la adenilato ciclasa en ojos aislados de dos géneros de cangrejos de río sobre el periodo del ritmo ERG.

Evaluar el efecto de un inhibidor de la proteína cinasa A (PKA) en ojos aislados de dos géneros de cangrejos de río sobre el periodo del ritmo ERG.

6. Métodos

Para todos los experimentos realizados que a continuación se explicarán, se utilizó una N total de 45 animales previamente aclimatados en condiciones de luz/oscuridad 12:12 de ambos géneros de cangrejos de río en intermuda, estos se colocaron en acuarios donde el agua se encontraba a una temperatura ambiente (16-21°C).

6.1 Registros electrorretinográficos

En todos los tallos oculares de los cangrejos de río, ya sean aislados o *in vivo*, se colocó un microelectrodo, implantándolo a través de la córnea, cerca de la membrana basal y midiendo la diferencia de potencial extracelular provocada por la luz en la retina, (ERG). Para ello se utilizó un fotoestimulador A Grass PS22, con una intensidad lumínica constante (50 lx) de luz blanca, disparando pulsos cada 15 minutos durante todo el tiempo de registro. Los ojos registrados se encontraban a una distancia de 10-15 cm de la fuente luminosa. El registro ERG provocado por el flash de luz se transmitió a un preamplificador DC (Grass 7P122), donde de manera continua se registró la respuesta ERG mediante un polígrafo (Grass mod. 79). Simultáneamente, la señal eléctrica se envió a una PC mediante una tarjeta de interface (PC Lab Card- PCL-812 Advantech), para posteriormente analizar los datos. Se realizaron las conversiones de unidades para obtener los valores de μV provocados por el fotoestimulador en los registros ERG los cuales se suavizaron promediando cada tres datos y se graficaron, colocando los valores de μV porcentualizados en el eje de las ordenadas y al tiempo externo en el eje de las abscisas, a partir de las primeras 24 hrs de cada registro.

6.2. Tratamiento de db-AMPC (dibutiril AMPC) en montajes de cangrejos de río para el registro del ritmo ERG.

Se utilizaron 10 cangrejos de río adultos de la especie *Procambarus clarkii*, sin distinción de sexo, para registrar el ritmo electrorretinográfico, colocándolos en un contenedor especial con agua a temperatura ambiente (16-20°C) con espacio

suficiente para no perturbar al animal en una cámara en oscuridad constante. El agua tuvo un nivel de modo que se permitiera la hidratación del animal. A los cangrejos de río se les colocó un sujetador para impedir su escape y fijarlos, de modo que se permitiera situar el electrodo en uno de los ojos, sujetándoles las quelas para evitar que se retiraran el microelectrodo. Posteriormente, se inyectó con una jeringa de insulina aproximadamente 10 μ l de db-AMPC a una concentración de 10 μ M al mismo tallo ocular del ojo al que se colocó el microelectrodo. En los diferentes registros, el tratamiento del db-AMPC se aplicó, ya sea al inicio del registro ERG (5 animales), o dejando registros como control sin el tratamiento y alrededor de 2-3 días/ciclos se le inyectó al animal el tratamiento (5 animales). Los animales permanecieron montados durante todo el tiempo de registro (de 5 a 10 días). Al inyectar el fármaco no se interrumpió el registro ni se alteraron las condiciones antes mencionadas.

6.3 Tratamientos experimentales para el registro ERG en tallos oculares aislados.

Se utilizaron cangrejos de río adultos, de sexo indistinto, de los géneros *Cambarellus montezumae* y *Procambarus clarkii*, los cuales se colocaron por 10 minutos en frío (4°C), ya que a bajas temperaturas la tasa cardíaca y la función neural son inhibidas parcialmente en estos animales, lo que confiere la posibilidad de disminuir en cierto grado la sensación de dolor, (Sun et al., 2012). Posteriormente, se realizó la extracción de los tallos oculares desinfectados externamente con etanol 96° para su montaje y registro *in vitro* del ritmo ERG. Ambos tallos oculares se colocaron por separado en cajas de Petri estériles, conteniendo 7 ml de medio Van Harreveld (solución fisiológica) estéril, donde se mantuvieron dentro de refrigeradores bajo oscuridad constante, a una temperatura entre 7-10°C para promover la conservación del tejido. Se hicieron dos grupos de tallos oculares por cada animal para el registro del ritmo ERG: controles y experimentales. A los tallos oculares experimentales, además de la solución fisiológica, se adicionaron desde el comienzo del registro ERG 71 μ l de forskolina (un activador de la enzima adenilato ciclasa), con el fin de que el

medio acuoso resultara a una concentración final de $7\mu\text{M}$ (10 animales). Se realizó el mismo procedimiento para agregar a uno de los tallos oculares experimentales de los animales un tratamiento de un análogo de AMPc (dibutiril AMPc) del cual se agregaron $80\ \mu\text{l}$ para obtener una concentración final de $10\mu\text{M}$ en la solución fisiológica (10 animales). Un último ensayo consistió en tratar a los tallos oculares experimentales con un inhibidor selectivo de la proteína cinasa A, para lo que se utilizó el fármaco H89; este se preparó en un stock para obtener una concentración final de $9\mu\text{M}$ en los 7 ml de solución fisiológica añadiendo $71\ \mu\text{l}$ del fármaco al medio (10 animales). Se desinfectó el lugar donde se colocaron las cajas de Petri con los tallos oculares en los respectivos tratamientos cada vez que se montó un nuevo experimento; esto mismo se realizó con los microelectrodos y tierras que se acomodaron en cada ojo en sus medios. Los diferentes tratamientos se agregaron desde el primer día de registro ERG, donde todos los ojos, tanto controles como experimentales, se registraron sin interrupciones manteniendo constantes las condiciones experimentales antes mencionadas por un tiempo de 4 a 8 días.

6.4. Preparación de los fármacos

Análogo de AMPc (db-AMPc).

El stock se preparó diluyendo el fármaco en agua destilada estéril. Se preparó una solución final de $10\ \mu\text{M}$ en inyección para animales íntegros a partir de $4.91\ \mu\text{g}$ del compuesto para disolver en 1 ml de agua destilada estéril. Para los ojos aislados, se preparó un stock añadiendo $16\ \mu\text{g}$ del compuesto para diluir en agua destilada estéril, para posteriormente agregar $80\ \mu\text{l}$ del stock a los ojos experimentales con el fin de obtener una solución final de $10\ \mu\text{M}$ en 7 ml de solución fisiológica de db-AMPc. El stock se mantuvo a una temperatura de 0°C para su conservación. (Ver en apéndice detalles del fabricante).

Forskolina

Se preparó un stock de forskolina disuelto en DMSO (dimetil sulfoxido) a partir de 8.25 μg de forskolina para diluirlo en 1 ml de DMSO. Del stock se agregaron 71 μl a la solución fisiológica con el ojo aislado experimental para lograr una concentración final de 7 μM en 7 ml de solución fisiológica HEPES. Esto se realizó en ojos aislados de ambos géneros de cangrejo de río para el posterior registro ERG. Para la preparación del stock se utilizó DMSO, ya que se ha reportado que solventes como el etanol inhiben la actividad de la forskolina sobre la adenilato ciclasa. El stock se mantuvo a una temperatura de 0°C para su conservación en la aplicación de futuros experimentos. (Ver en apéndice detalles del fabricante).

H89

Se preparó un stock con 18 μg de H89, diluyéndolos en 1 ml de DMSO, para agregar 71 μl del stock obteniendo una solución final 9.62 μM en 7 ml de solución fisiológica para el registro ERG en tallos oculares aislados de ambos géneros de cangrejos de río. El stock se mantuvo a una temperatura de 0°C para su conservación en la aplicación de futuros experimentos. (Ver en apéndice detalles del fabricante).

Solución fisiológica Van Harreveld

Se preparó la solución Van Harreveld según Mitsuhashi, 2002. La solución se almacenó a una temperatura de 10°C, para ser utilizadas en las preparaciones de ojos aislados. (Ver en apéndice más detalles).

6.5. Análisis estadístico de los datos

Periodogramas χ^2 de los datos provenientes de los registros ERG.

Se realizaron las conversiones de unidades para obtener los valores de μV provocados por el fotoestimulador en los registros ERG, se suavizaron promediando cada tres. A estos datos se les realizó un análisis de periodogramas de χ^2 , utilizando el programa de cómputo TAU (Minimitter, Co. Inc.) con el fin de calcular e identificar picos significativos en los periodos de los diferentes ritmos exhibidos en base a las condiciones experimentales antes mencionadas (basado en el análisis de Sokolove y Wayne, 1978). Los periodogramas se construyeron a partir del análisis de series de datos obtenidos de los registros ERG, resultado del análisis de χ^2 donde se identificaron los diferentes periodos con un nivel de significancia de 0.01. Los periodogramas se graficaron colocando a los valores Qp (ver definición en apéndice) en el eje de las ordenadas y a los periodos alcanzados en horas en el eje de las abscisas con sus respectivas líneas de significancia que el programa TAU arrojó según los valores de cada registro analizado. Para más detalles del fundamento del periodograma de χ^2 ver en Sokolove y Wayne, (1978).

Prueba de t de Student.

Se tomaron en cuenta los valores de los periodos significativos obtenidos en los periodogramas de χ^2 en todos los registros ERG: tanto en animales íntegros, como en ojos aislados de ambos géneros de cangrejos de río. Para el grupo de registros ERG de animales íntegros, se realizó una prueba de t de Student para muestras independientes con el objeto de comparar las medias de los periodos obtenidos entre registros control y experimentales. Esto mismo se realizó en el grupo de ojos aislados en ambos géneros de cangrejo de río, donde además de realizar el análisis entre controles y experimentales, se hizo la prueba estadística entre los registros control de *Cambarellus montezumae* y *Procambarus clarkii* para analizar si existen diferencias significativas en el valor de los periodos alcanzados en los ritmos ERG exhibidos de ambos géneros de cangrejos de río.

7. Resultados

En todos los registros ERG que a continuación se mostrarán, se graficó en el eje de las ordenadas el porcentaje de μV provocados por el ritmo ERG, mientras que en el eje de las abscisas se muestran las horas en tiempo externo, a partir de las primeras 24 hrs de los registros. En todos los periodogramas mostrados se graficó el Qp (ver apéndice) en el eje de las ordenas, mientras que las horas de los periodos significativos alcanzados por los registros ERG se muestran en el eje de las abscisas.

En las figuras 13 y 14 se muestran algunos registros representativos del ritmo ERG obtenido en los animales íntegros de la especie *P. clarkii*.

7.1 Registros ERG de *Procamabrus clarkii* íntegros con db-AMPc

7.1.1. Registro ERG de *Procambarus clarkii* con su periodograma de χ^2 adjunto en cada parte control y experimental de los registros.

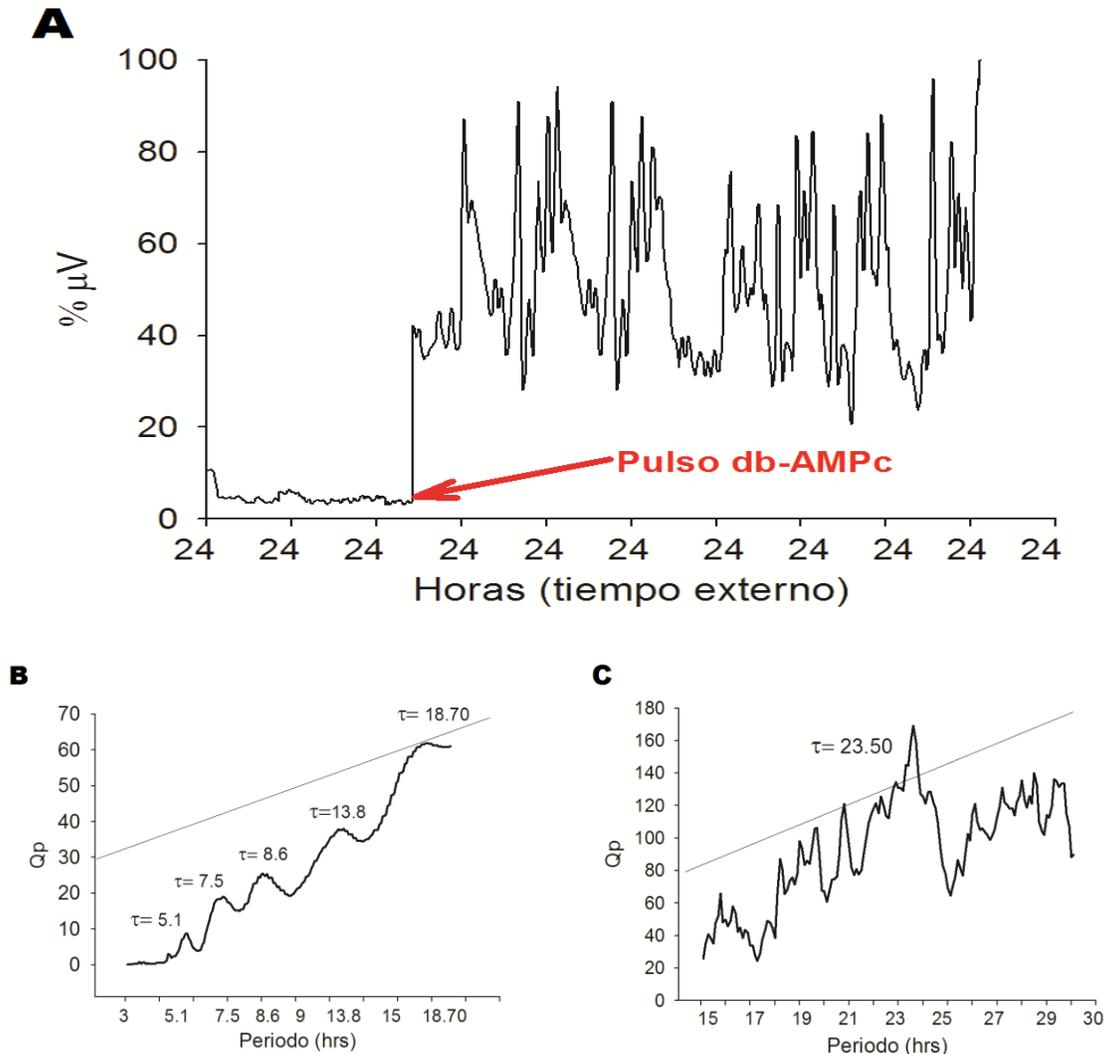


Fig.13. A. Registro ERG en cangrejo de río *Procambarus clarkii* adulto. Se dejó oscilar por dos días y medio. No se exhibe un ritmo significativo u oscilación marcada; se aplicó, luego de esos dos días y medio, un pulso de db-AMPc ($10\mu\text{M}$) en el tallo óptico del animal. Se observa que luego del pulso del fármaco existe una mejora del ritmo haciendo evidentes oscilaciones constantes en el ritmo ERG. B. Periodograma de χ^2 del animal (dos días y medio) del registro ERG, se puede observar que no hay ningún ritmo significativo. C. Periodograma de χ^2 a partir del momento en que se aplicó el

pulso de db-AMPC ($10\mu\text{M}$). Se observa un pico significativo cercano a 24 hrs. (23.50 hrs). Nótese que durante los primeros días de registro no hay un ritmo claro. La figura 13. A muestra los dos primeros días de registro en el que no se observa un ritmo evidente. Al aplicar el db-AMPC el ritmo emerge como se muestra en la figura 13.C.

7.1.2. Registro ERG de *Procambarus clarkii* con su periodograma de χ^2 adjunto en cada parte control y experimental de los registros.

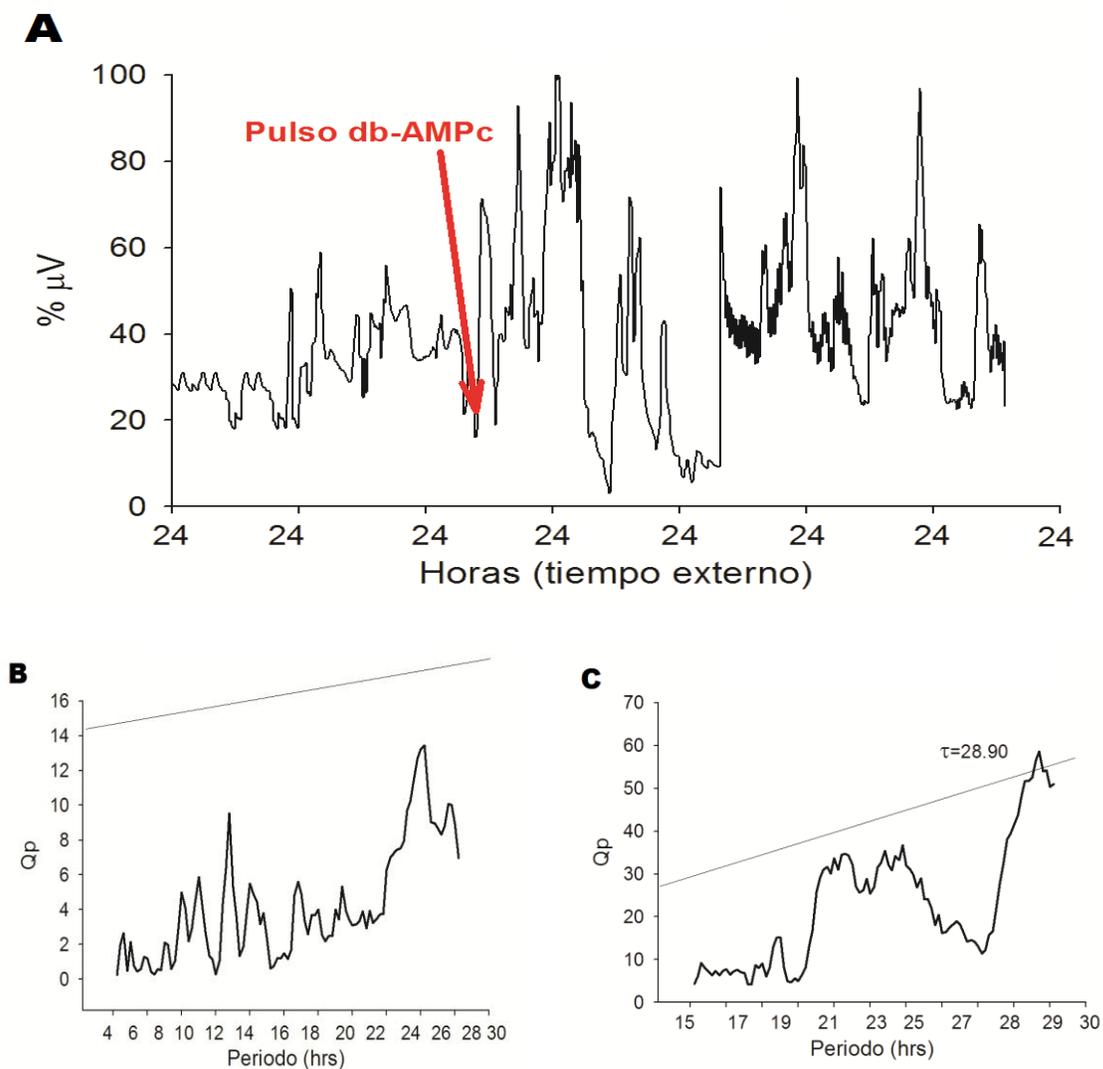


Fig.14. A: Registro ERG en cangrejo de río *Procambarus clarkii* adulto. Se dejó oscilar por dos días y medio. Las oscilaciones del ritmo son irregulares, luego de éste tiempo,

se aplicó un pulso de db-AMPC ($10\mu\text{M}$) en el tallo óptico del animal. El registro ERG se muestra más regular y emergente comparándolo con los días de registro antes de la aplicación del fármaco. B: Periodograma de χ^2 del tiempo en que se dejó oscilar al animal (control). Se muestra que no hay ningún ritmo significativo. C: Periodograma de χ^2 a partir del segundo día del registro ERG, donde se aplicó el pulso de db-AMPC ($10\mu\text{M}$). Se observa un pico significativo cercano a 30 hrs.

7.2 Registro ERG en Ojos aislados de cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) con el tratamiento de db-AMPC (concentración final de 10 μ M)

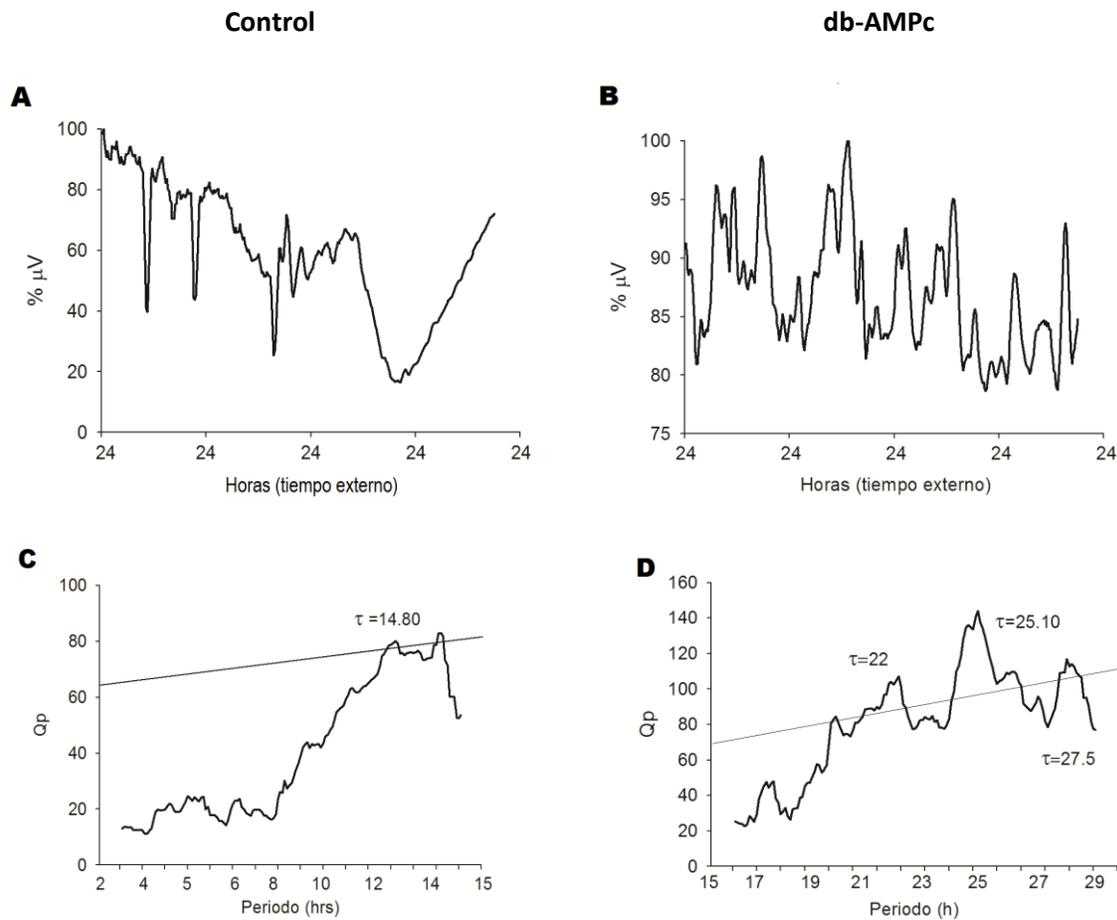


Fig.15. A y B: Registros ERG en ojos aislados de *Procambarus clarkii* (mismo animal). A. Ojo aislado control con solución fisiológica: se muestra un ritmo con oscilaciones poco marcadas. B. Ojo aislado experimental (concentración final de 10 μ M db-AMPC en la solución fisiológica): se muestra un ritmo con oscilaciones mucho más acentuadas a comparación del ojo control. C: Periodograma de χ^2 en el ojo control con un pico ultradiano apenas significativo de 14.80 horas. D: Periodograma de χ^2 del ojo experimental donde se observan tres picos significativos con periodos de 22, 25.10 y 27.5 hrs, mayores que en el periodo mostrado en el ojo control. (La escala en el eje de las abscisas del periodograma C se escaló hasta 15 horas al no presentarse periodos significativos superiores a 14.80 horas en el análisis que arrojó TAU).

7.3 ERG en Ojos asilados de cangrejo de río (*Cambarellus montezumae*) con el tratamiento de db-AMPc (concentración final de 10 μ M)

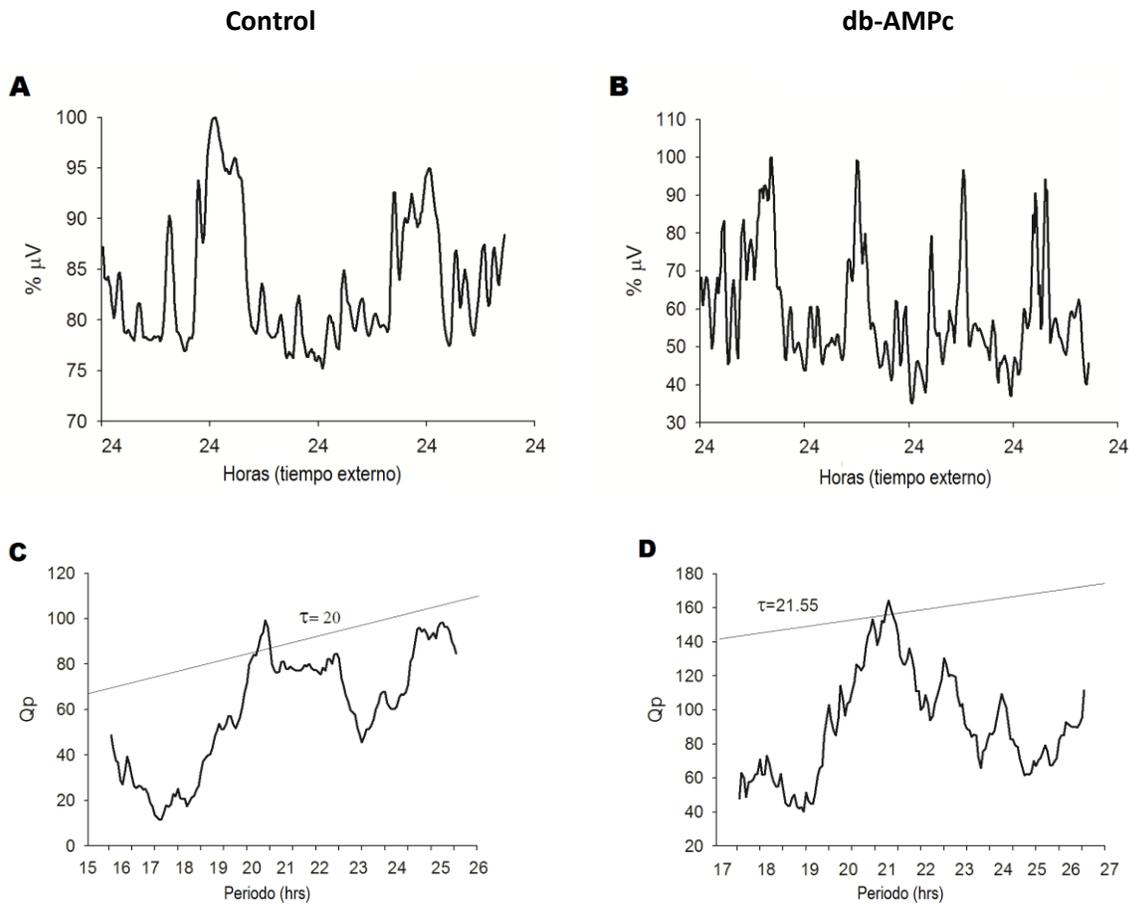


Fig.16. A y B: Registros ERG en ojos aislados de *Cambarellus montezumae* (mismo animal). A. Ojo aislado control con solución fisiológica. El ritmo ERG muestra una frecuencia de oscilación baja. B. Ojo aislado experimental (concentración final de 10 μ M db-AMPc en la solución fisiológica). El ritmo ERG muestra oscilaciones con una frecuencia mayor que en el ojo control, además de una oscilación más acentuada. C: Periodograma de χ^2 en el ojo control con un pico de 20 horas significativo. D: Periodograma de χ^2 del ojo experimental donde se observa un pico significativo de 21.55.

7.4 Registro ERG en Ojos asilados de cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) con el tratamiento de forskolina (concentración final de 7 μ M)

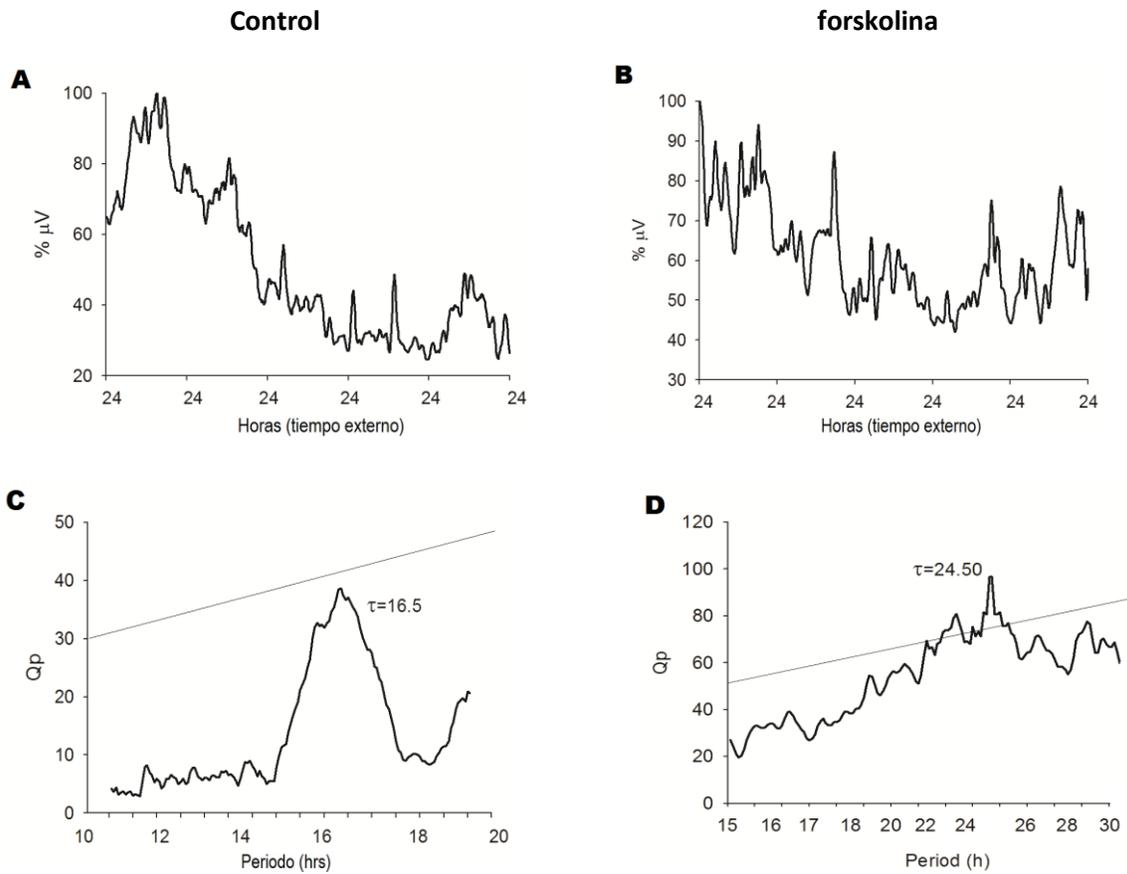


Fig.17. A y B: Registros ERG en ojos aislados de *Procambarus clarkii* (mismo animal). A. Ojo aislado control con solución fisiológica, no se observan oscilaciones claras en el ritmo ERG, además de que este decae con el transcurso de tiempo de registro. B. Ojo aislado experimental (concentración final de 7 μ M de forskolina en la solución fisiológica). Se observan oscilaciones a comparación del ojo control donde no se observan. El ritmo se mantiene constante. C: Periodograma de χ^2 en el ojo control donde no muestra periodos significativos. D: Periodograma de χ^2 del ojo experimental donde se observa un pico significativo con un periodo de 24.50 horas. . (La escala en el eje de las abscisas del periodograma C se escaló hasta 20 horas al no presentarse periodos significativos superiores en el análisis que arrojó TAU).

7.5 Registro ERG en Ojos asilados de cangrejo de río (*Cambarellus montezumae*) con el tratamiento de forskolina (concentración final de 7 μ M)

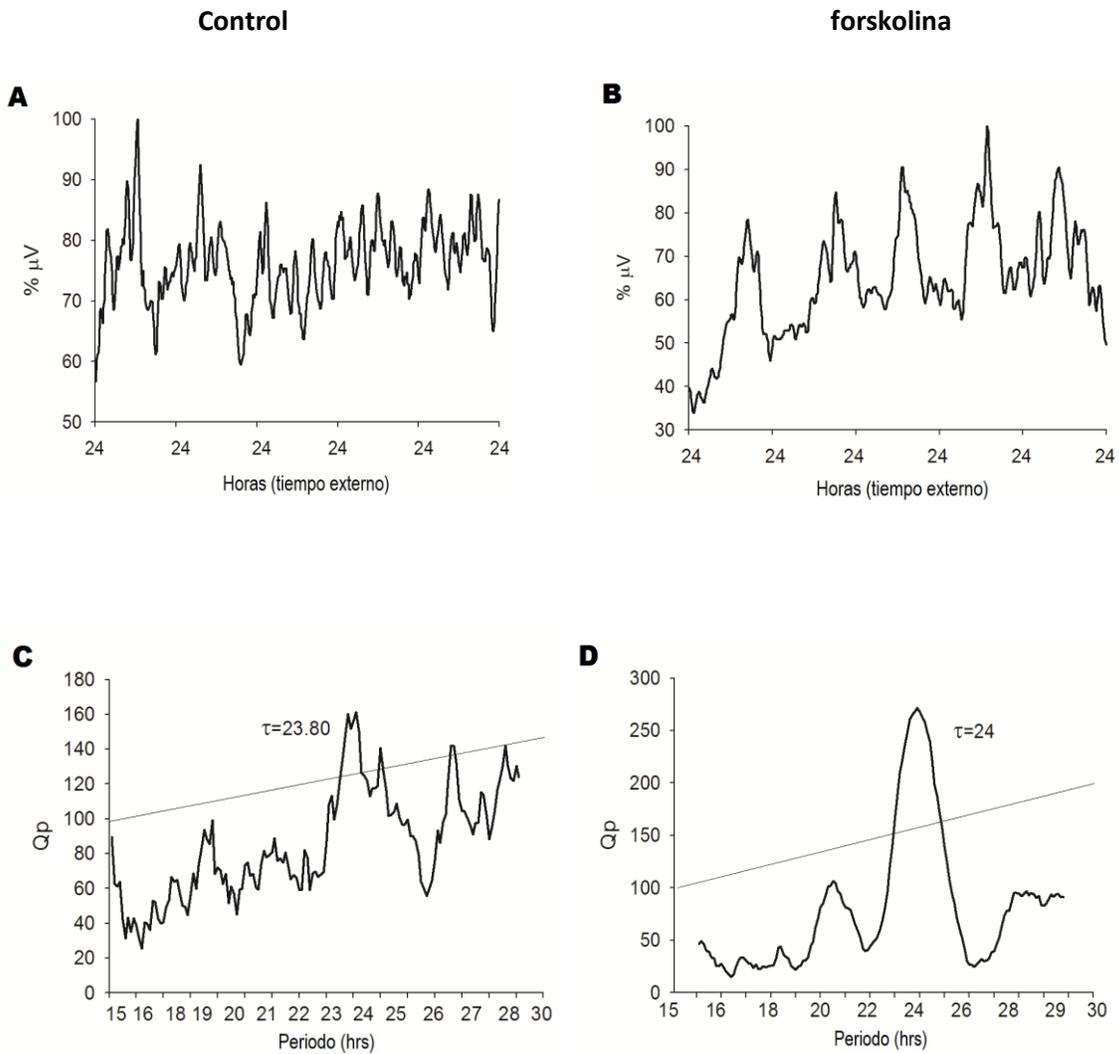


Fig.18. A y B: Registros ERG en ojos aislados de *Cambarellus montezumae* (mismo animal). A. Ojo aislado control con solución fisiológica, se observa un ritmo con oscilaciones poco claras. B. Ojo aislado experimental (concentración final de 7 μ M de forskolina en la solución fisiológica). El ritmo es muestra, a comparación del ojo control con oscilaciones muy marcadas y constantes. C: Periodograma de χ^2 en el ojo control con un periodo de 23.80 horas significativo. D: Periodograma de χ^2 del ojo experimental donde se observa un periodo significativo de 24 horas.

7.6 Registro ERG en Ojos asilados de cangrejo de río (*Procambarus clarkii*) con el tratamiento de H89 (concentración final de 9 μ M)

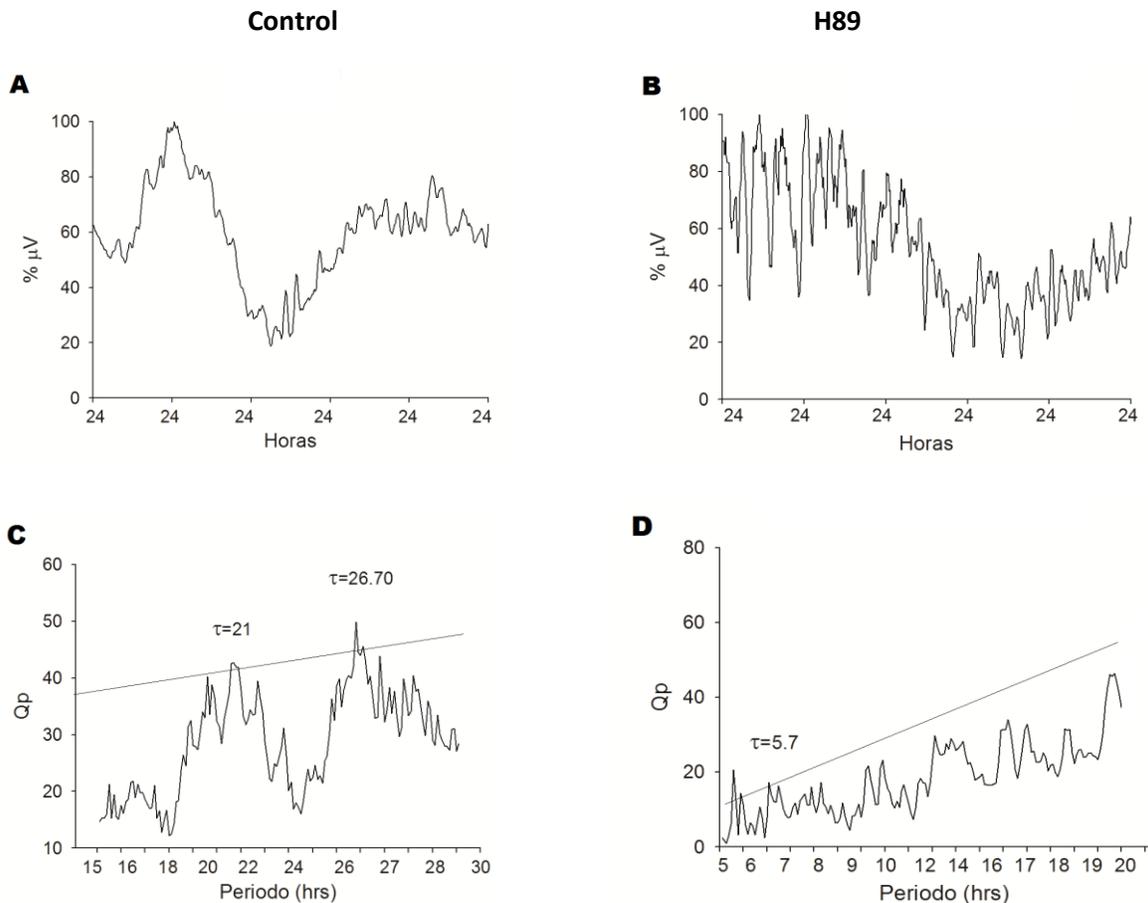


Fig.19. A y B: Registros ERG en ojos aislados de *Procambarus clarkii* (mismo animal). A. Ojo aislado control con solución fisiológica. El ritmo muestra oscilaciones tenues, donde luego de 4 días se ve que decae progresivamente. B. Ojo aislado experimental (concentración final de 9 μ M H89 en la solución fisiológica). El ritmo se torna ultradiano al aplicar el fármaco, a comparación del ojo control. C: Periodograma de χ^2 en el ojo control con dos picos significativos: un periodo de 21 horas y otro de 26.70 horas. D: Periodograma de χ^2 del ojo experimental donde se observa un periodo significativo con modalidad ultradiana de 5.7 horas. (La escala en el eje de las abscisas del periodograma D se escaló hasta 20 horas al no presentarse periodos significativos superiores a 5.7 horas en el análisis que arrojó el programa TAU).

7.7 Registro ERG en Ojos aislados de cangrejo de río (*Cambarellus montezumae*) con el tratamiento de H89 (concentración final de 9 μM)

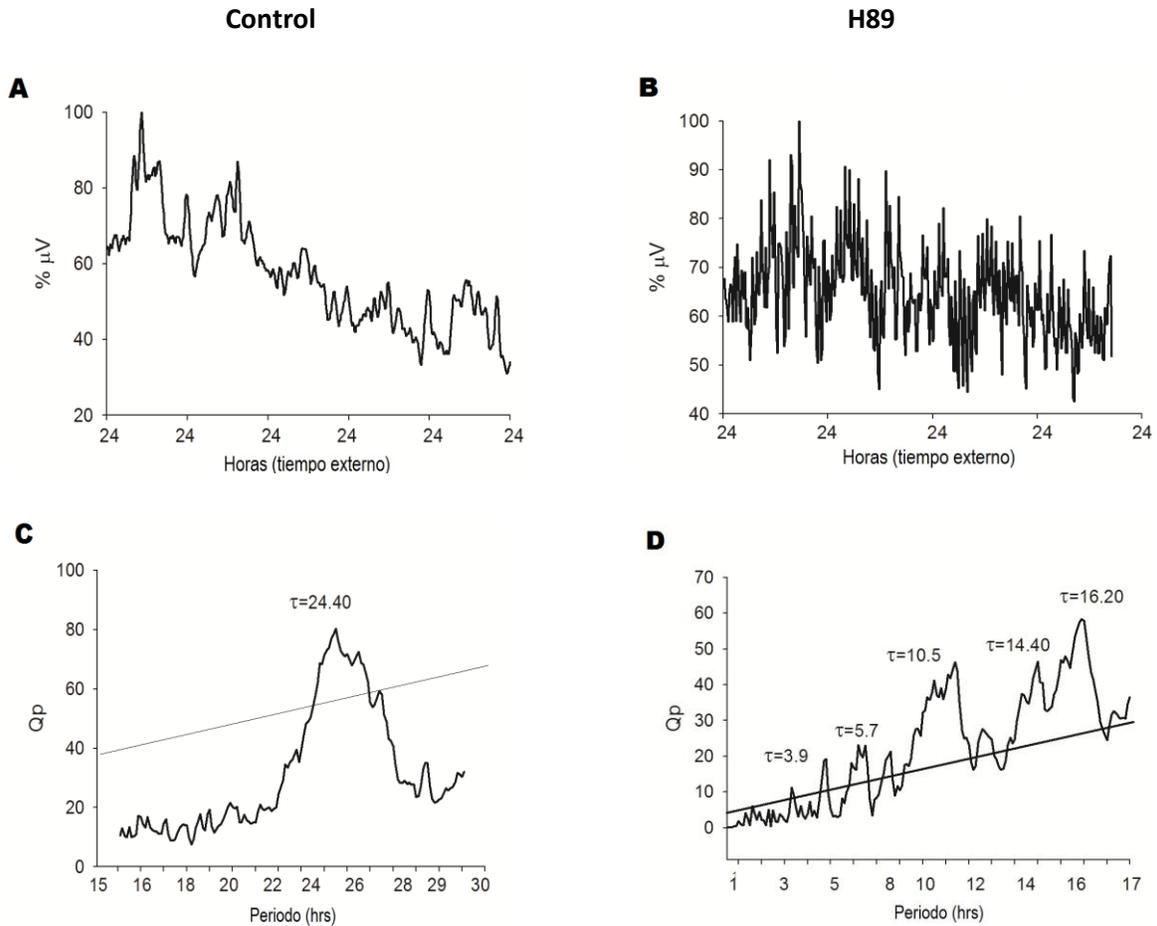


Fig.20. A y B: Registros ERG en ojos aislados de *Cambarellus montezumae* (mismo animal). A. Ojo aislado control con solución fisiológica. Se muestra una oscilación poco marcada que va decayendo de acuerdo al avance de días de registro. B. Ojo aislado experimental (concentración final de 9 μM H89 en la solución fisiológica). El registro ERG se muestra alterado con oscilaciones irregulares y a simple vista con carácter ultradiano. C: Periodograma de χ^2 en el ojo control con un periodo de 24.40 horas significativo. D: Periodograma de χ^2 del ojo experimental donde se observan periodos ultradianos significativos, (3.9, 5.7, 10.5, 14.40 y 16.20 horas). (La escala en el eje de las abscisas del periodograma D se escaló hasta 17 horas al no presentarse periodos significativos superiores a 16.20 horas en el análisis que arrojó el programa TAU).

7.8 Análisis estadístico con prueba de t de Student

7.8.1 Comparación estadística entre los datos controles y experimentales en los ritmos ERG de *Procambarus clarkii*.

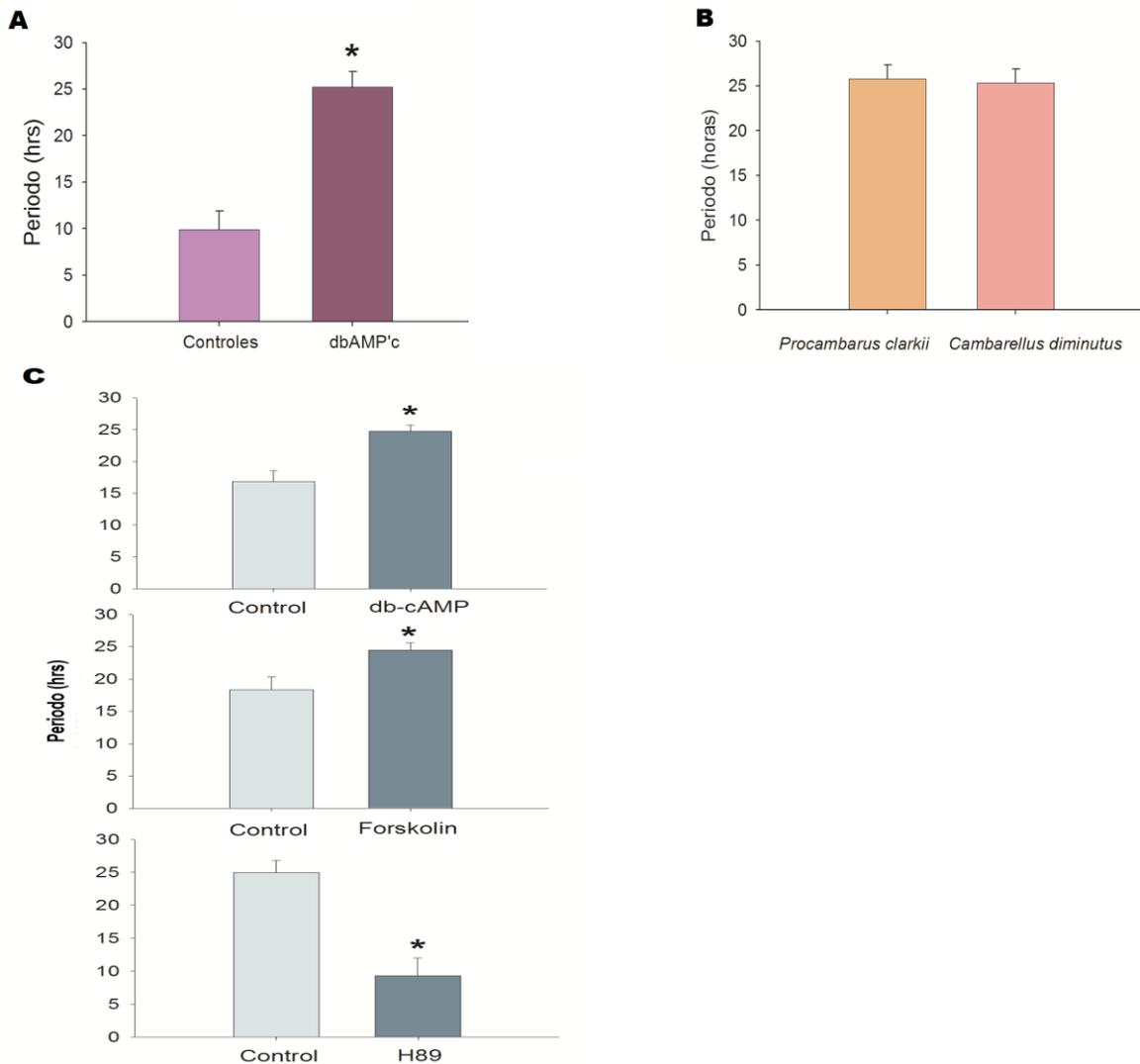


Fig. 21. A: Diferencias de las medias de los periodos entre los datos control y experimental (db-AMPc) de los registros ERG de animales íntegros *Procambarus clarkii*. * $P < 0.001$. El análisis mostró diferencias significativas en los periodos exhibidos entre controles y experimentales. B: Análisis estadístico con prueba de t para muestras independientes donde se muestra que no hubieron diferencias

significativas en los periodos exhibidos entre ambos géneros de cangrejo de río en ojo aislado, (los valores del análisis se observan en la Tabla 1), C: Análisis estadístico con prueba de t en cada grupo experimental en ojos aislados de ambos géneros de cangrejo de río. En los tres tratamientos, se presentaron diferencias significativas entre los periodos exhibidos de controles y experimentales. *P< 0.01. Se observa un efecto contrario en el tratamiento de H89 comparándolo con los otros fármacos (forskolina y db-AMPC).

Género	Media horas	Desv.Est	Error
<i>Procambarus clarkii</i>	25.82	6.37 h	1.54 h
<i>Cambarellus montezumae</i>	25.34	8.47 h	1.52 h

Tabla 1.

8. Discusión

En este trabajo, se analizó el efecto del AMPc sobre los ritmos ERG de dos géneros de cangrejos de río en diferentes condiciones experimentales. La hipótesis que sostendría los efectos del AMPc sobre el ritmo ERG, apuntaría a la posible participación de la vía de señalización AMPc-PKA-CREB-CRE.

En los resultados obtenidos de los registros ERG, tanto en cangrejos de río *Procambarus clarkii* íntegros, como en ojos aislados del mismo género y de *Cambarellus montezumae*, se mostró una relación entre el periodo obtenido y el tratamiento con db-AMPc y/o forskolina; el valor del periodo siempre aumentó, mostrando diferencias significativas entre las partes control y experimental. Tal como se muestra en los experimentos de Masao, (2010) y Neill, (2008), los resultados que aquí se presentan sugieren lo mismo que en mamíferos en el núcleo supraquiasmático, donde los niveles intracelulares de AMPc influyen en parámetros como el periodo. La estructura que aquí actuaría como marcapasos en base a estos cambios intracelulares de AMPc sería el tallo ocular de los cangrejos de río. Lo anterior, es el resultado de la maquinaria que participa en esta estructura tal como son la retina, la acción circadiana de los fotorreceptores y de los pigmentos proximales y distales, dando como resultado la respuesta del ERG.

Además de los resultados obtenidos en este trabajo, que muestran cambios en los periodos de los ritmos ERG, aparentemente, también se presentaron cambios en la amplitud, como muestran trabajos que estudiaron el efecto de varios tratamientos farmacológicos (Fuentes-Pardo y Verdugo, 1985; Fuentes Pardo y Moreno, 1987). Sin embargo, este parámetro no fue cuantificado. Se consideró analizar únicamente el periodo de los ritmos exhibidos del ERG, ya que es la propiedad canónica de los ritmos que define características centrales de estos, como son las modalidades circadianas, ultradianas e infradianas. El periodo, es la propiedad de los ritmos que más se ha analizado en diversos experimentos circadianos de mamíferos y otros modelos animales donde se analizan los efectos del AMPc.

Como se puede ver en la figura 21. A, el valor del periodo exhibido en promedio en los controles de *P.clarkii* (íntegros) tiene una modalidad ultradiana (+-10 hrs), presentándose posteriormente un alargamiento del periodo al momento de la aplicación del AMPc, obteniendo valores cercanos a 24 hrs en los periodos (modalidad circadiana). Es posible que los periodos ultradianos mostrados en los controles se deban a que los animales, a pesar de su aclimatación previa, se encontraban arrítmicos. Lo anterior podría ser debido a la época en que se colectaron los animales. Algunos cangrejos de río pudieron haber presentado una edad que no se refleja físicamente, ya que fueron colectados desconociendo la fecha de su eclosión, por lo que fue probable el uso de animales juveniles, que aparentaron ser adultos. Lo anterior, influye directamente en la calidad del ritmo ERG, como hace referencia Fanjul y Prieto (1996), donde se analizó el ritmo ERG de cangrejos de río *Procambarus clarkii* en estadios juveniles. Este estudio mostró, que en etapas juveniles de los cangrejos de río, se presentan ritmicidades ultradianas o arritmias, mientras que los animales con mayor madurez presentan ritmos cercanos a 24 horas. Lo anterior se podría atribuir al grado de desarrollo del sistema circadiano y los osciladores que intervienen en la respuesta ERG en distintas etapas del ciclo de vida en estos animales. En *C. montezumae* no se realizaron registros ERG en animales íntegros por el hecho de que este género, por ser el más pequeño, presenta un área más pequeña en los tallos oculares, lo que provocaría, al momento de inyectar el fármaco, un daño total o parcial del pedúnculo ocular. No se contó con un instrumento adecuado para administrar una dosis en relación al tamaño y cantidad de hemolinfa de *C. montezumae*, ya que si se le hubiese inyectado la misma cantidad de a *P. clarkii*, probablemente se provocaría la muerte al animal por una sobredosis del fármaco. En *P. clarkii* se utilizaron jeringas de insulina por presentar un tamaño superior a *C. montezumae*, donde se les pudo administrar el fármaco (db-AMPc) sin dificultad en el tallo ocular, mostrando gran resistencia a los montajes por periodos de tiempo prolongados.

En cuanto a las diferencias entre los controles de cada grupo experimental en ojos aislados cabe mencionar que el análisis se realizó mezclando los valores de ambos géneros de cangrejos de río debido a que no se mostraron diferencias

significativas entre los valores de los periodos exhibidos entre controles de ambas especies (ver tabla 1).

En la figura 21.C, se muestra el análisis con el tratamiento de H89 con valores de los periodos de los controles de +-5 horas de diferencia respecto al resto de los controles de los otros tratamientos (db-AMPC y forskolina). Tales valores de los periodos de los controles del grupo experimental de H89 (cerca de 25 horas) coinciden con los estándares de los controles de ambas especies (figura 21. C). Las diferencias antes indicadas probablemente se deban a la época del año en que se realizaron los diferentes ensayos, ya que como mencionan Fanjul y Prieto (1996), la temperatura influye sobre parámetros del ritmo ERG del cangrejo de río, principalmente sobre el periodo. Los cambios estacionales que modifican las temperaturas influyen también en estas sutiles diferencias de periodos en los controles ya señalados entre los diferentes tratamientos experimentales.

Comparando las características entre los registros ERG de animales íntegros y ojos aislados, se puede observar un notable cambio: en los registros en ojos aislados, al momento de aplicar el pulso de db-AMPC, a diferencia de los registros ERG en animales completos, no se presenta un aumento aparente de amplitud en la respuesta del ritmo. Sin embargo, en ambas condiciones experimentales se observaron cambios del periodo entre controles y experimentales. Las diferencias aparentes de la amplitud del ritmo entre los registros ERG íntegros y los ojos aislados se podría deber a la maquinaria neuroendócrina que interviene en ambos casos. Por un lado, se propondría que en los animales íntegros, al estar completa la maquinaria circadiana, actuando probablemente como principal oscilador el cerebro, module y produzca en conjunto con la retina una mejor respuesta en los ojos de los animales íntegros. Los ojos aislados, a pesar de que muestran una oscilación con la aplicación de db-AMPC y forskolina, esta no es tan clara como en los registros de animales íntegros con db-AMPC. Aunque no se mostraron todos los registros obtenidos, la figura 13 A muestra un ritmo aparentemente más conspicuo en el animal íntegro a diferencia de los ojos aislados. Esto podría ser debido a un incremento de la permeabilidad celular al db-AMPC o a la distribución vía circulación del compuesto. El hecho de que los animales

íntegros presenten un mejor ritmo ERG que los ojos aislados se podría deber a que al aislar los ojos existe una falta de interacción con osciladores externos al tallo ocular, funcionando únicamente la retina y el sistema del órgano X –glándula sinusal como moduladores de la respuesta neuroendócrina y la dispersión de los pigmentos distales y proximales que se refleja en el ritmo ERG.

El ritmo circadiano del ERG de los ojos aislados de ambos géneros de cangrejo de río utilizados en este estudio, presentaron una oscilación espontánea como en los experimentos que realizaron otros autores ya mencionados en diversos trabajos (Aréchiga y Rodríguez, 1998; Fuentes y Verdugo, 1985), mostrando que los ojos aislados de estos animales son capaces de presentar oscilaciones circadianas. Así mismo, en otros trabajos se han probado diversos tratamientos sobre el ritmo ERG en ojos aislados de cangrejos de río como *Procambarus bouvieri* que muestran, bajo diferentes condiciones experimentales presentando cambios en el periodo del ritmo en respuesta a señales externas tales como la luz, temperatura, variaciones en las concentraciones de diversas sustancias o fármacos contenidos en el medio, (Fuentes y Verdugo, 1985; Fuentes y Moreno, 1987). Algunos tratamientos interfieren con el metabolismo, inhibiendo los ritmos circadianos, y otros afectando los mecanismos de sincronización. (Sachs et al., 1959; Strum-Wasser, 1965; Eskin y Corrent, 1977; Woolum y Strumwasser, 1983). En este trabajo se analizó el efecto de tres diferentes fármacos clave que intervienen en la vía de señalización CREB-CRE basada en aumentos intracelulares de AMPc o del bloqueo de la PKA, midiendo su efecto en uno de los parámetros del ritmo ERG: el periodo. La solución Van Harreveld estéril para las preparaciones *in vitro* mostró una eficiencia no reportada en trabajos anteriores, pues en las preparaciones de esta tesis, los ojos aislados, en promedio, exhibieron una clara ritmicidad hasta por 8 días, lo cual indicaría que esta estructura es un marcapaso autónomo como se ha propuesto previamente (Aréchiga y Rodríguez, 1998). En algunos ojos aislados de *Procambarus clarkii* la oscilación exhibida fue de 3-4 días; posteriormente decaía el ritmo a pasar de la aplicación de db-AMPc o de forskolina, lo que coincide con reportes hechos con *Procambarus bouvieri*, mostrando que las preparaciones de ojo aislado no duran más de 3 días de oscilación consecutivos

(Sánchez y Fuentes, 1977), sin embargo, en los resultados mostrados en *Cambarellus montezumae*, los periodos de oscilación no decayeron por lo menos en 5 días en promedio. El valor del periodo entre ambos géneros no mostró diferencias significativas, aunque, como se muestra en los resultados, sí se observaron diferencias aparentes de amplitud (no analizadas). Lo anterior podría deberse a las características latitudinales de cada género que probablemente influyen en la fisiología del reloj circadiano del animal. Por otra parte, se deben tener en cuenta los requerimientos metabólicos que presente el ojo aislado en relación al tamaño del animal en cada género de cangrejo de río. *P. clarkii* muestra un mayor tamaño de ojos en comparación con *C. montezumae* donde el área de tejido ocular es menor. Existen muy pocos reportes acerca de la conducta de *C. montezumae* para poder concluir en qué grado los hábitos del animal influyen en el reloj circadiano. En contraste, existen gran variedad de trabajos de *P. clarkii*: se sabe que mantiene una conducta agresiva presentando mayor actividad locomotora en la noche, lo cual es acompañado por la actividad del sistema de osciladores del animal a nivel neuroendócrino y sobre el reloj molecular.

Se demostró que no hubieron diferencias significativas entre los periodos exhibidos de los ritmos ERG control en ambos géneros de cangrejo de río. Lo anterior se probó con el análisis de los resultados obtenidos en la muestra utilizada en este estudio. Ambos géneros de cangrejos de río tuvieron una duración de la ritmicidad de 4 a 8 días en los tallos oculares aislados.

Para poder dilucidar mejor el efecto de los fármacos utilizados en este trabajo y comprobar que, efectivamente el AMPc actúa como un elemento clave que produce cambios en el ritmo ERG a través de la vía de señalización de CRE-CREB, será necesario hacer un análisis posterior que demuestre no solo la presencia de la proteína CREB y su interacción con PER, sino también sus cambios durante la sincronización del ritmo ERG. En esta tesis se propone realizar experimentos a futuro que evalúen, tanto curvas de respuesta de fase en animales íntegros, así como en tallos oculares aislados, aunado a un método que permita analizar la expresión de la interacción de CREB-CRE de manera cíclica en base a la aplicación de los fármacos

utilizados en este estudio. Lo anterior dependería hipotéticamente de los niveles intracelulares de AMPc y del papel de la PKA. Todo esto se realizaría aplicando los fármacos a diferentes horas circadianas. Otro de los horizontes experimentales en base a este estudio además de lo anterior, sería la aplicación de AMPc y/o forskolina simultáneamente con el inhibidor de la PKA (H89) en tallos oculares aislados para hacer un análisis más profundo de la interacción de los niveles intracelulares de AMPc, permitiendo así puntualizar si el aumento de este compuesto efectivamente repercute indirectamente sobre los genes reloj del cangrejo de río a través de la PKA, o si existen otras vías involucradas sobre el periodo del ritmo ERG. En este trabajo se analizaron únicamente cambios del periodo de los ritmos exhibidos con los diferentes tratamientos. El H89 alteró significativamente los periodos de los ritmos ERG respecto a los controles tornándolos a ultradianos o arrítmicos; esto sugiere que al bloquear indirectamente el efecto del AMPc intracelularmente a través de la PKA se altera la oscilación del gen *per*. En cuanto a horizontes futuros de experimentos en animales íntegros, analizar la amplitud del ritmo ERG luego de la aplicación de AMPc sería un complemento para ver la relación que tiene este compuesto con tal parámetro y cuantificarlo. En esta tesis no se aplicó forskolina o H89 a los animales completos, ya que provocarían la muerte del animal debido a que estos fármacos deben ser disueltos en DMSO. Tanto en los experimentos de ojos aislados como en animales completos, es probable que participen otras vías de señalización que actúen paralelamente a la vía que se propone (AMPc-PKA-CREB-CRE), como son las MAPK. En el trabajo de Fuentes y Verdugo (1985) se analiza la intervención de la aplicación extracelular de calcio cambiando diversos parámetros del ritmo ERG de acuerdo a diferentes concentraciones en preparaciones de ojos aislados de cangrejo de río.

Existe la posibilidad de que los efectos del AMPc sobre el ritmo del ERG, como se presentan en este estudio, se deban también a una ruta metabólica donde a través del aumento del AMPc se induzca la participación del ATP que ocasione una mejora y aumento del periodo del ritmo. Se ha probado la activación de una vía permeable al ATP a través del AMPc en miocitos cardiacos neonatales en rata, (Lander, et al., 2000), así como en células cultivadas de glándulas rectales de tiburón (Cantiello et al., 1997),

donde el AMPc incrementa al ATP, provocando un aumento en la conductancia celular. Así mismo, se ha demostrado que el ATP extracelular presenta un ritmo de oscilación con periodos cercanos a 23 horas en células del núcleo supraquiasmático y cultivos de astrocitos, (Womac, 2009). Aún, con tales estudios, no hay hasta el momento investigaciones que prueben que la inducción de ATP a través del AMPc provoque cambios en parámetros circadianos como el periodo. Para comprobar lo anterior sería necesario realizar un estudio para investigar si la vía que proponen Lander et al, (2009) y Cantiello et al., (1997), también está involucrada en la maquinaria circadiana del tallo ocular del cangrejo de río y que por lo tanto, repercuta en el periodo del ritmo ERG.

9. Conclusiones

- 1.- No se encontraron diferencias significativas entre los valores del periodo circadiano del ritmo ERG de las especies estudiadas.
- 2.- Sin embargo se encontraron diferencias significativas entre las características circadianas del ritmo ERG obtenido *in vivo* e *in vitro*.
- 3.- Tanto el análogo del AMPc como la forskolina producen un aumento en el valor de periodo. El valor ultradiano cambia a circadiano.
- 4.- En la preparación *in vitro*, el H89 induce arritmia o un cambio en el valor de periodo modificándolo a valores ultradianos.

10. Apéndice

10.1. Fundamento del Periodograma de χ^2

El periodograma de χ^2 se realizó con el programa de cómputo TAU que funcionó en base la siguiente fórmula matemática, definiendo como:

N = número total de datos por hora

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

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

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

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

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

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

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

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

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

donde:

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

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

A_p^2 es un estimado de la varianza de las medias de P $(\bar{X}_1, \dots, \bar{X}_p)$ de K ítems dibujados a partir de una población de N valores (X_1, \dots, X_N) . Si estos valores presentan una distribución normal con una varianza σ_X^2 , entonces la varianza de la media será:

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

y la proporción:

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

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

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

10.2. Especificaciones de los fármacos utilizados.

Análogo de AMPc.

Sigma Aldrich. D-0627 3' 5' -Monofosfato cíclico N6, 2' - O. Dibutiril Adenosina (Bucladesina; Dibutiril cíclico AMP) C₁₈H₂₃N₅O₈PNa. Pureza de 98% (HPLC). Contiene <0.5% de AMP cíclico y más de 3% de derivados de monobutiril.

Forskolina

Sigma- Aldrich. F-6886. 10mg, C₂₂H₃₄, O₇, extraído de *Coleus forskohlii*, pureza ≥98% (HPLC). Solubilidad: DMSO 5mg/ml, etanol, cloroformo. Se utilizó DMSO (dimetil sulfoxido), ya que se ha reportado que solventes como el etanol inhiben la actividad de la forskolina sobre la adenilato ciclasa.

H89

Sigma-Aldrich-B1427-5mg, H89 hidrato dihidrocloridrato, C₂₀H₂₀BrN₃O₂S. 2HCL- xH₂O. Solubilidad en H₂O: ≥ 10 mg/mL. Todos los stocks antes especificados se mantuvieron en refrigeración a -0°C

Solución fisiológica Van Harreveld

Para su preparación se tomó en cuenta la proporción g/1000 ml de solución. Se disolvieron los siguientes compuestos en agua destilada estéril con un pH final de 7.4: 12 g NaCl, 15 g CaCl₂*, 0.4 g KCl, 0.25 g MgCl₂, NaHCO₂, 0.25 g MgCl₂. (Mitsubishi, 2002). La solución se almacenó a una temperatura de 10°C. (*Disolver aparte antes de incorporar).

11. Referencias

- Adams S. y Jones R. L. (2010). *Cambarellus diminutus*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 3.1. International Union for Conservation of Nature.
- Aréchiga, H., Bañuelos, E., Frixione, E., Picones, A. and Rodríguez S. L. (1990). *Modulation of crayfish retinal sensitivity by 5-hydroxytryptamine*. J. Exp. Biol. 150, 123–143.
- Aréchiga H. and Rodriguez S. L. (1998). *Circadian clock function in isolated eyestalk of crayfish*. Proc Biol Sci. 265(1408):1819-23.
- Balsalobre A., Damiola F. and Schibler U. (1998). *A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells*. Cell. 93(6):929-37.
- Bain J, et al. (2007). *The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update*. Biochem J. 408: 297–315.
- Barne y Levy. (2009). *Fisiología*. Elsevier, Sexta edición, España. pp. 834.
- Blaustein D. N., Derby C. D., Simmons R. B. and Beall A. C. (1988). *Structure of the brain and medulla terminalis of the spiny lobster Panulirus argus and the crayfish Procambarus clarkii, with an emphasis on olfactory centers*. J Crust Biol 8, 43-51.
- Boyoung L., Aiqing L., Katelin F. Hansen, Ruifeng C., Jae H. Y. and Karl O. (2010). *CREB Influences Timing and Entrainment of the SCN Circadian Clock*. Journal of Biological Rhythms. 25: 410.
- Campbell M. K. y Farrell S. O. (2004). *Bioquímica*. Editorial Thompson, cuarta edición, México. pp. 720.
- Cantiello H. F., Jackson G. R., Prat A. G., Gazley J. L., Forrest J. N. and Ausiello D.A. (1997). *cAMP activates an ATP-conductive pathway in cultured shark rectal gland cells*. J. Physiol. 272(1):C466-75.
- Cardinali D. P, et al. (1994). *Introducción a la Cronobiología*. Fisiología de los Ritmos Biológicos. Universidad de Cantabria. Madrid, pp. 159.
- Castañón C., O., Escamilla C. E. G. y García-Rivera C. C. (1996). *El cultivo del acocil*. Ciencia y Desarrollo. 130:76-80.
- Cebada J. and García U. (2007). *Histamine operates Cl-gated channels in crayfish neurosecretory cells*. The Journal of Experimental Biology. 210:3962-3969.

Dvorkin, Cardinali y Lermoli. (2010). *Bases fisiológicas de la práctica médica*. Editorial Panamericana. España. pp. 1125.

Dunlap J. C. (1999). *Molecular bases for circadian clocks*. Cell, 96. 271–290.

Beale E. G. and Dedman J. R. (1977). *Isolation and Regulation of the Protein Kinase Inhibitor and the Calcium-Dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Regulator in the Sertoli Cell-Enriched Testis*. Endocrinology.101: 1621-1634

Escamilla C. E. G. y Fanjul M. M. L. (2007). *Daily and circadian expression of cryptochrome during the ontogeny of crayfish*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 151(3):461-70.

Eskin A. and Corrent G. (1977) *Effects of divalent cations and metabolic poisons on the circadian rhythm from the Aplysia eye*. J. comp. Physiol. 117:1-21.

Fanjul M. M. L. and Aguilar R. R. (2008). *Comparative Aspects of Circadian Rhythms*. Research Signpost.

Fanjul M. L y Hiriart M. (2009). *Biología funcional de los animales II*. Siglo XXI editores. México, pp. 327.

Fanjul M. M. L. and Prieto S. J. (2003). *The Circadian System of Crayfish: A Developmental Approach*. Microscopy research and technique. 60:291–301.

Fanjul M. M. L. and Prieto S. J. (1996).Effect of the temperature upon ultradian and circadian ERG amplitude rhythms during ontogeny of crayfish *Procambarus clarkii*. Bol. Estud. Med. Biol. 44(1-4):11-8.

Foster J. and Slater F. (1995). *A global review of crayfish predation with observations on the possible loss of Austropotamobius pallipes in the Welsh Wye due to crayfish plague*. Louisiana State University Printing Office, Baton Rouge. pp. 589.

Fuentes P. B. and Moreno S. E. (1987). *Action of deuterium oxide upon the ERG circadian rhythm in crayfish, Procambarus bouvieri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 90(3): 435–440.

Fuentes P. B., Verdugo D. L. and Inclán R. V. (1985). *Effect of external level of calcium on ERG circadian rhythm in isolated eyestalk of crayfish*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. DOI:10.1016/0300-9629(85)90872-2.

Gaus G. y Stieve H. (1992). *The effect of neuropeptides on the ERG of the crayfish Orconectes limosus*. Z. Naturforsch. C47(3-4): 300-303.

- Gi H. S, Sooyoung C. and Kyungjin K. (2011). *The adrenal peripheral clock: Glucocorticoid and the circadian timing system*. Front Neuroendocrinol. 32(4):451-65.
- Golden S., Johnson, C. H. and Kondo T. (1998). *Circadian system: A clock apart*. Curr. Opin. Microbiol. 693-697.
- Harzsch S., Dircksen H. and Beltz B. (2009). *Development of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the American lobster: homology to the insect circadian pacemaker system?*. Cell Tissue Res. 335:417-429.
- H. Ko C. y S. Takahashi T. (2006). *Molecular components of the mammalian circadian clock*. Human Molecular Genetics, Vol. 15, Review Issue No. 2.
- Hill R. W. (2007). *Fisiología animal comparada*. Editorial Reverté. New York. pp. 854.
- Hobbs, H.H., Jr. (1974). *Synopsis of the families and genera of crayfishes (Crustacea: Decapoda)*. Smithsonian Contributions to Zoology. 164:1-32.
- Holdich DM y Lowery RS. Huner JV. (1988). *Procambarus in North America and elsewhere*. In: (ed.) Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation. Timber Press: Portland. 239-261.
- Kleinholz L. H., H. Jonson E. C. and Kimball F. (1962). *Neurosecretion and crustacean retinal pigment hormone: assay and properties of light adapting hormone*. Biol Bull. 123:317-319.
- Lader A. S., Xiao Y. F., O'Riordan C.R., Prat A.G., Jackson G.R. and Cantiello H.F. (2000). *cAMP activates an ATP-permeable pathway in neonatal rat cardiac myocytes*. J. Cell Physiol. 279(1):C173-87.
- Lee A. C. H. (2003). *Conservation of the cyanobacterial circadian clock: comparative studies in nostoc sp. strain PCC 9709, a cyanobacterium isolated from the lichen peltigera membranacea*. Microbiology and Immunology.
- Li Y. et al. (2005). *Population Genetic Structure and Post-Establishment Dispersal Patterns of the Red Swamp Crayfish Procambarus Clarkii in China*. Chin Agri Sci Bul. 21:156-159.
- Lodge, D. M. and J. G. Lorman. (1987). *Reduction in submerged macrophyte biomass and species richness by the crayfish Orconectes rusticus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 44:591-597.

Mangerich S., R. Keller and H. Dirksen (1986). *Immunocytochemical identification of structures containing putative red pigment concentrating hormone in two species of decapod crustaceans*. Cell Tissue Res. 245: 377-386.

Masao D., Atsushi M., Akiko S., Miho K., Rie Y., Fumiyoshi K., Ikuo T., Soken K., Hiroshi S., Kazuyuki Y., Yoshiaki M., Masahiro F., Jean - M. T., Rina S., Yasuko - Y., Hiroyuki T., Yukari A., Michihiro N., Kazuki A., Shinichi K., Masaki O., Karl T., Gozoh O. and Hitoshi O. (2010). *Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus*. Nature Communicatons. 2:327.

Mendoza V. L, Solís C. H, Benítez K. G. and Fuentes P. B. (2009). *MT2-like melatonin receptor modulates amplitude receptor potential in visual cells of crayfish during a 24-hour cycle*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 154(4):486-92

Mitsubishi J. (2002). *Invertebrate Tissue culture Methods*. Springer Lab Manual. Tokyo University of Agriculture. Tokyo. pp 451.

Müller C. H. G., Sombke A. and Rosenberg J. (2000). *The fine structure of the eyes of some bristly millipedes (Penicillata, Diplopoda): Additional support for the homology of mandibulate ommatidia*. Arthropod structure & development. 36(4): 463-476.

Murphy B. A. (2010). *Chronobiology and the horse: Recent revelations and future directions*. The Veterinary Journal. 185:105–114

National Biological Information Infrastructure (NBII) & IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG). «Global Invasive Species Database, 2005. *Procambarus clarkii*». Consultado: 18 de agosto de 2012.

Nystrom, P., C. Bronmark and Graneli W. (1996). *Patterns in benthic food webs: a role for omnivorous crayfish?*. Freshwater Biology. 36: 631-646.

O'Neill J. S, Maywood E. S., Chesham J. E., Takahashi J. S. and Hastings M. H. (2008). *cAMP-Dependent Signaling as a Core Component of the Mammalian Circadian Pacemaker*. Science: Vol. 320 no. 5878 pp. 949-953.

O'Neill J. S. and Reddy A. (2012). *The essential role of cAMP/Ca²⁺ signalling in mammalian circadian timekeeping*. Biochem. Soc. Trans. 40(1): 44–50.

Richter S. (2002). *The Tetraconata concept: hexapod-crustacean relationships and the phylogeny of Crustacea*. Org Div Evol. 217-237

Rodriguez S. L., Calderón R. G., Porrás V. M. G, Mendoza Z. E. and Anaya G. V. (2006). *Serotonin modulation of caudal photoreceptor in crayfish*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 142(3-4):220-30.

Rojas Y. (2003). *Revisión taxonómica de las especies de Cambarellus (Cambarellus) (Crustacea: Decapoda: Astacidae: Cambaridae): Análisis morfológico*. Tesis Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 179.

Sachs R. M., Brets C. and Lang A. (1959) *Cell division y Gibberelic acid*. *Exp. Cell. Bees.* 18:231-244.

Sanchez J. A. and Fuentes P. B. (1977). *Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish*. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 56(4): 601-605

Sehgal A. (2004). *Molecular Biology of Circadian Rhythms*. Willey Liss, a John Wiley & Sons, Inc. Publication. Inc. ISBN 0-471-41824-2.

Sokolove P. G. and Bushell W. J. (1978). *The Chi Square Periodogram: Its Utility for Analysis of Circadian Rhythms*. *J. Theor. Biol.* 72:131-160.

Solís C. H., Mendoza V. L., Fuentes P. B. (2008). *Melatonin modulates the ERG circadian rhythm in crayfish*. *Comp Biochem Physiol A Mol. Integr. Physiol.* 149(4):373-9.

Soriano C. M. , Guillazo B. G., Redolar R. D. A., Torras G. M. y Vale M. A. (2007). *Fundamentos de Neurociencia*. Editorial UOC. España. pp. 436.

Strauss J. and Dirksen H. (2010). *Circadian clocks in crustaceans: identified neuronal and cellular systems*. *Front Biosci.* 15:1040-74.

Sullivan J. M, Genco M. C., Marlow E. D., Benton J. L., Beltz B. S., and Sandeman D. S. (2009). *Photoreceptor pathways contributing to circadian rhythmicity in crayfish*. 26(6): 1136-1168.

Sun C. Y., Cooper M. R., Graff J. and Cooper L. R. (2012). *The acute and chronic effect of low temperature on survival, heart rate and neural function in crayfish (Procambarus clarkii) and prawn (Macrobrachium rosenbergii) species*. *OJMIP.* 2(3).

Turek F. W. and Takahashi J. S. (2001). *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol 12. New York, pp. 770.

Vollmers C. and Gill S. (2009). *Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(50):21453-8.

Weaver R. F. (1999). *Molecular Biology*. McGraw-Hill, New York. pp. 669.

Womac A. D., Burkeen J. F., Neuendorff N., Earnest D.J. and Zoran M. J. (2009). *Circadian rhythms of extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus cells and cultured astrocytes*. Eur. J. Neurosci. 30(5):869-76

Woolom J. C. and Strumwasser F. (1983) *Is the period of the circadian oscillator in the eye of Aplysia directly homeostatically regulated?* J. comp. Physiol. 151:253-259.

Yoshiki T. and Nishida E. (2003). *Cultured Cells as a Model System of Peripheral Circadian Clocks*. JB. Special Review-Circadian Clock Systems in Vertebrates J. Biochem. 134(6):785-790.

Zhua H., LaRue S., Whiteley A., Steeves T. D., Takahashi J. S. and Green C. B. (2000). *The Xenopus Clock gene is constitutively expressed in retinal photoreceptors*. Brain Res. 75(2):303-8.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias, UNAM, con el apoyo de:

PAPIIT IN218811.

Gracias a la Dra. María Luisa Fanjul Peña, al M. en C. Julio Prieto Sagredo, a los sinodales y a los compañeros del laboratorio.

Gracias a los cangrejos de río que hicieron posible la realización del trabajo experimental de esta tesis.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, a los profesores y compañeros de la Facultad de Ciencias.