

18 00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

VARIACIONES CIRCADIANAS EN DIFERENTES PARAMETROS DEL SISTEMA GLUTATION EN DOS ESPECIES DE ACOCIL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE DOCTORA EN CIENCIAS

Biología

P R E S E N T A :

MA. ELENA DURAN LIZARRAGA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN



DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. LUISA FANJUL PEÑA

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE, 2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de septiembre de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) Ma. Elena Durán Lizárraga, con número de cuenta 89552272 y número de expediente 3992005, con la tesis titulada: "Variaciones circadianas en diferentes parámetros del sistema glutatión en dos especies de acocil", bajo la dirección del (la) Dra. María Luisa Fanjul Peña.

Presidente:	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Vocal:	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Vocal:	Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia
Vocal:	Dra. Carolina Escobar Briones
Secretario:	Dra. María Luisa Fanjul Peña
Suplente:	Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero
Suplente:	Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de octubre de 2002


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias bajo la dirección de la Dra. María Luisa Fanjul Peña.

Este trabajo estuvo apoyado por:

CONACyT: Beca para estudios de doctorado 95801; y proyecto PM 31858-N.

Dirección General de Estudios de Posgrado: Beca complementaria y Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado Tesis Doctorales, proyecto 201306.

Quiero expresar mi agradecimiento a los miembros del jurado:

Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia

Dra. Carolina Escobar Briones

Dra. María Luisa Fanjul Peña

Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero

Dr. Mauricio Díaz Muñóz

A mis abuelos Elda María y Salvador
Por estar siempre a mi lado.
Por su ejemplo.
Por su amor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Maricha, a Paty Guzmán y a los chicos de su laboratorio, por el "asilo" y el apoyo recibido para realizar el trabajo experimental durante los meses de la huelga y de la remodelación, ¡gracias por su amistad!

Al ingeniero Moles, por hacernos un lugar dónde trabajar durante la huelga.

A la señorita Angelina, por ayudarme a cuidar a los acociles durante la huelga.

A la Dra. Chagoya y a Lucy, por las facilidades proporcionadas para montar la técnica de la GPx.

Al Dr. Adolfo Andrade y a todo el personal de las Cámaras de Ambientes Controlados por las facilidades proporcionadas para el mantenimiento de los animales.

A los miembros del jurado cuyos comentarios ayudaron a enriquecer este trabajo.

A mis papás, mis hermanos, y toda la familia por su cariño y apoyo constante que me han llevado hasta el final de esta empresa.

A Lupita, Carla, Arturo, Norma, Sebastián y a Illy, porque la amistad no conoce distancias ni fronteras...

A Fernando Delta Fox, Linda, Cinchi, Rosita, Concha, Claudia Janet!, muchas gracias!!!

A la Dra. Elsita que, encabezando a las chicas del laboratorio, brinda amistad y ayuda, es una gran amiga y un ejemplo de perseverancia.

A la Dra. Fanjul, por aceptarme dentro de su grupo de trabajo, por su ejemplo para ser mejor persona y mejor científica. Gracias por su confianza y amistad.

A Julio, además del apoyo técnico durante las largas horas de las determinaciones y los análisis matemáticos, por tu comprensión, paciencia y presencia. Por que eres mi amor, mi cómplice y todo...

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

	INDICE.....	1
	RESUMEN.....	2
	ABSTRACT.....	3
1	RITMOS	
	1.1 GENERALIDADES.....	4
	1.2 CLASIFICACIÓN.....	5
	1.3 RITMOS CIRCADIANOS.....	6
	1.4 SINCRONIZACIÓN.....	7
	1.5 EL RELOJ BIOLÓGICO.....	8
2	LOS ACOCILES <i>Procambarus clarkii</i> Y <i>Procambarus digueti</i>	
	2.1 GENERALIDADES.....	9
	2.2 RESPUESTA A LA LUZ.....	11
3	ESTRÉS	
	3.1 DEFINICIÓN.....	13
	3.2 ESTRÉS OXIDATIVO.....	14
	3.3 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO.....	16
	3.4 PAPEL BIOLÓGICO DE ROS.....	17
	3.5 EFECTOS DE LA LUZ.....	20
	3.6 EL SISTEMA GLUTATIÓN Y FUNCIONES METABÓLICAS.....	21
	3.7 PARTICIPACIÓN EN LA DESTOXIFICACIÓN.....	22
	3.8 EL SISTEMA GLUTATION EN CRUSTÁCEOS.....	23
4	PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	25
5	HIPÓTESIS.....	26
6	OBJETIVOS.....	26
7	METODOLOGÍA	
	7.1 ANIMALES.....	27
	7.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS LUMINOSOS.....	27
	7.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
	7.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL SISTEMA GLUTATIÓN.....	29
	7.5 ANÁLISIS DE DATOS.....	30
8	RESULTADOS	
	8.1 CAMBIOS CIRCADIANOS EN LOS PARÁMETROS DEL SISTEMA GLUTATIÓN EN <i>Procambarus clarkii</i>	33
	8.2 EFECTOS DEL INCREMENTO EN LA IRRADIANCIA Y FOTOPERIODO EN <i>Procambarus clarkii</i>	37
	8.3 CAMBIOS CIRCADIANOS EN LOS PARÁMETROS DEL SISTEMA GLUTATIÓN EN <i>Procambarus digueti</i>	42
	8.4 EFECTOS DEL INCREMENTO EN LA IRRADIANCIA Y FOTOPERIODO EN <i>Procambarus digueti</i>	45
	8.5 DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS.....	50
9	DISCUSIÓN.....	57
10	CONCLUSIONES.....	64
11	BIBLIOGRAFÍA.....	65
12	APÉNDICE. PUBLICACIÓN EN REVISTA INTERNACIONAL ARBITRADA.....	71

RESUMEN

Este trabajo fue realizado con el objetivo de estudiar el sistema antioxidativo circadiano de dos especies de acocil con origen latitudinal diferente. La capacidad de los ritmos circadianos de los animales para sincronizarse a los ciclos diarios generados por la alternancia luz-oscuridad (LO), depende en la sensibilidad del marcapaso circadiano ante los cambios diarios y estacionales que están relacionados tanto a las características ecológicas como a la distribución geográfica de las especies. Los cambios cíclicos en la protección antioxidativa pueden contribuir con esta capacidad de sincronización pues permite a los animales enfrentar la oxidación producto de las fluctuaciones en las condiciones lumínicas ambientales. *Procambarus digueti* es una especie de distribución tropical, mientras que *P. clarkii* presenta una amplia distribución latitudinal norte. En el presente trabajo se investigó la 1) si ambas especies presentan ritmos circadianos en parámetros del sistema glutatión, 2) y si los ritmos de ambas especies difieren en su capacidad de sincronizarse a ciclos de 24 h con diferente duración de la fotofase en alta y baja irradiancia (AI y BI, respectivamente). Se formaron dos grupos de organismos adultos de cada especie, divididos en 5 grupos de 30 animales cada uno que se pusieron en las siguientes condiciones experimentales 1) LO 12:12 BI; 2) LO 12:12 BI y después expuesto a oscuridad constante por 72 h; 3) LO 12:12 AI; 4) LO 20:4 BI; 5) LO 20:4 AI; todas se dejaron dos semanas. Al final del experimento se sacrificaron 5 animales de todos los grupos en intervalos de 4 h durante un ciclo de 24 h y se les extrajo la hemolinfa y el hepatopáncreas. Se determinó glutatión reducido y oxidado en ambos tejidos y en hepatopáncreas también se determinó la actividad enzimática de la glutatión reductasa y de la glutatión peroxidasa por métodos fluorométricos y espectrofotométricos. El análisis de datos por Cosinor simple y ANOVA revelaron diferencias entre ambas especies. *Procambarus clarkii* presentó ritmos circadianos robustos que se sincronizan con el encendido y apagado de la luz. En *P. digueti* se encontró un sistema circadiano en el ciclo del glutatión que no se sincroniza a la luz. En esta especie las condiciones LO 12:12 AI y LO 20:4 AI evidenciaron ritmos diarios que indican un sistema antioxidativo amortiguado, que incrementan su amplitud como respuesta a la luz. Esto sugiere que los mecanismos ritmicos antioxidativos de estas especies parecen estar relacionadas con sus características ecológicas. Se discute la posible relación entre los ritmos aquí descritos con otros descritos para el acocil.

ABSTRACT

This work was carried out to study the antioxidant circadian system of two species of crayfish with different latitude of origin. The animals circadian rhythms' ability to entrain to daily light–dark (LD) ratios depends on the pacemaker sensitivity to the seasonal daily changes, and therefore, it should be related both to the ecological and geographical distribution of the species. A circadian anti-oxidative protection system may provide an important contribution in order to deal with the oxidation produced by the daily fluctuation of the environmental lighting conditions. *Procambarus digueti* is a tropical species, while *P. clarkii* is a species with a wide latitudinal distribution. In the present work it was investigated 1) whether both species possess glutathione circadian rhythms, and 2) whether both species' rhythms differ in their ability to synchronize to 24 h cycles with two different LD ratios (photoperiod) of low and high irradiance. (LI and HI). Two batches of *P. clarkii* and *P. digueti* adult organisms, divided into 5 groups formed by 30 animals each, were kept in the following experimental conditions for two weeks 1) LD 12:12 LI; 2) LD 12:12 LI and then exposed to DD for 72 h; 3) LD 12:12 HI; 4) LD 20:4 LI; 5) LD 20:4 HI. At the end of the experiments all animals of each group were killed at 4 h intervals during a 24 h cycle and the hemolymph and midgut were removed. Reduced and oxidized glutathione as well as glutathione reductase and glutathione peroxidase were assayed by fluorometric and spectrophotometric methods. Cosinor and ANOVA revealed differences between both species. *Procambarus clarkii* showed robust antioxidant circadian rhythms that are able to entrain to all conditions resetting to lights on or off. However, the *P. digueti* weak circadian glutathione system did not entrain to the LD cycles showing a random distribution of phases. In this species, LD 12:12 and 20:4 HI evidenced significant daily rhythms indicating a damped circadian anti-oxidative system, that is enhanced by the effect of light. This suggests that each species' photoperiodic history determines the adaptive abilities of the circadian anti-oxidative mechanisms. The possible correlation between the glutathione rhythm and other behavioral and metabolic rhythms of crayfish are discussed.

1. RITMOS

1.1 GENERALIDADES

Un ritmo biológico se puede definir como la recurrencia de un fenómeno biológico a intervalos regulares de tiempo (Kalmus, 1935, citado en Aschoff, 1981). La cronobiología es la disciplina que estudia los procesos, mecanismos y alteraciones de las estructuras subyacentes a los procesos ritmicos de los diferentes organismos bajo diversas situaciones (Halberg et al., 1977).

Todos los animales, las plantas, microorganismos y probablemente todos los organismos muestran algún tipo de variación rítmica fisiológica (tasa metabólica, producción de calor, floración, etc.) que suele estar asociada con un cambio ambiental periódico (Pittendrigh y Minis, 1964; Reinberg y Smolensky, 1993). En todos los taxa de los organismos eucariontes así como algunos procariontes y hongos se han documentado diferentes ritmos con períodos cuyas velocidades fluctúan desde fracciones de segundo hasta años. Estos ritmos persisten en condiciones de laboratorio, aún sin señales temporales externas, es decir, son endógenos (Aschoff, 1981). Algunos parámetros de uso común en la caracterización y estudio de los ritmos biológicos son:

- *Período:* Se refiere al valor del intervalo de tiempo que pasa entre dos acontecimientos idénticos, es decir es el valor de la duración de un ciclo completo y es el inverso de la frecuencia de un evento. El período natural del oscilador se denomina τ (tau), y se expresa en condiciones constantes cuando no hay influencia de claves temporales externas. Este fenómeno se denomina en inglés "free running" y en español "oscilación espontánea" o "libre corrimiento". Al periodo de la oscilación externa o sincronizador se le denomina T. En una oscilación se conoce como α a la duración de la actividad máxima y como ρ a la duración de actividad mínima.
- *Amplitud:* Algunos autores (Brady, 1982; Granados-Fuentes et al., 1995); la definen como la diferencia entre el punto máximo y el mínimo de la oscilación. Cuando se trata de señales analizadas mediante un ajuste a una función coseno (Método de Cosinor) la amplitud se define como la diferencia entre el valor mesor y el valor

máximo que tiene la variable en un período (Aschoff, 1981, Vega, 1993; Golombek, 1997).

- *Mesor*. Es el valor medio de la variable ajustada a una función coseno. Cuando el intervalo de muestreo es constante, mesor es igual a la media aritmética de la oscilación rítmica (Vega, 1993).
- *Fase (ϕ)*: Es el valor instantáneo de una función periódica, es un parámetro que sirva de referencia para determinar cambios en la velocidad del ritmo de la oscilación, los puntos más usados son el inicio de actividad y la acrofase, ésta última corresponde al punto en el que se alcanza el valor máximo del ciclo (Aschoff, 1981, Vega, 1993; Golombek, 1997).
- *Ángulo de Fase (ψ)*: Corresponde a la diferencia de fase entre dos oscilaciones, usualmente la del sincronizador y la del oscilador (Aschoff, 1981, Vega, 1993; Golombek, 1997).

1.2 CLASIFICACIÓN

Enright (1981) clasificó a los ritmos biológicos en tres grupos de acuerdo con la frecuencia de su oscilación:

- *Ritmos Ultradianos*: ciclos que ocurren varias veces en un día, tienen períodos menores a 19 hr y pueden alcanzar velocidades de segundos o milisegundos, p.e. el ritmo respiratorio, el ritmo cardíaco, las ondas eléctricas cerebrales, etc.
- *Ritmos Circadianos*: ciclos cuyo período es cercano a las 24 horas, en el intervalo de 19 a 29 horas. Algunos ejemplos son los ciclos sueño vigilia, actividad reposo, secreción hormonal como el cortisol, la melatonina, la prolactina, etc.
- *Ritmos Infradianos*: su período es mayor a 29 horas, algunos ejemplos son: el ciclo menstrual de mamíferos, los ciclos lunares y los ciclos reproductivos anuales o bianuales, etc.

Por otra parte, Halberg en 1965 elaboró una clasificación (en Aschoff, 1981) de los ritmos de acuerdo con el valor del período y en relación con los ciclos geofísicos, estos son: el ciclo de rotación terrestre (ritmos diarios); los ciclos producidos por la interacción tierra-

luna que generan las mareas (ritmos mareales), la rotación de la luna que genera las fase lunares (ritmos lunares) y el movimiento de translación de la tierra alrededor del sol (ritmos estacionales y anuales). Debido a que el período (τ) de este ritmo, en condiciones constantes (luz, temperatura, etc.), es aproximado –pero no igual- al del ciclo ambiental con el que se sincroniza (T), Halberg introdujo el prefijo circa y se conocen como ritmos circadianos, circamareales, circalunares, y circaanuales, a los ritmos biológicos cuyo período es cercano al de estos ritmos geofísicos.

1.3 RITMOS CIRCADIANOS

Entre todos estos ritmos, los ritmos circadianos han sido los más estudiados. La plasticidad del valor de período de estos ritmos les permite sincronizar a los ciclos ambientales que posean un valor de periodo de 24 horas, como son los ciclos diarios de luz y de temperatura. Los ritmos circadianos, establecen una fase estable con estos ciclos externos alargando o acortando su valor de periodo e igualándolo al del ciclo ambiental. Estos ritmos están basados en mecanismos biológicos análogos a las propiedades cronométricas de un reloj, y poseen las siguientes características (Pittendrigh, 1981; Aschoff, 1981; Brady, 1982):

- a) Son endógenos, persisten sin la presencia de claves temporales; en condiciones constantes se presentan con una oscilación espontánea cuyo periodo es cercano pero no igual a las 24 horas.
- b) La longitud del periodo en oscilación espontánea se modifica ligeramente o nada al variar la temperatura, es decir, poseen mecanismos de compensación de temperatura.
- c) Son susceptibles de sincronizar a los ritmos ambientales que posean un valor de periodo de 24 horas o cercanos a él (dentro de ciertos límites), como los ciclos de luz y de temperatura. Esta sincronización únicamente se lleva a cabo dentro de ciertos límites para cada especie.
- d) La ritmicidad puede dejarse de expresar bajo ciertas condiciones ambientales como es la luz brillante o un cambio brusco en la temperatura.

- e) En oscilación libre o espontánea, generalmente el τ de las especies diurnas es mayor a las 24 h, en tanto que para especies nocturnas este valor es menor a las 24 h. El período τ depende de la intensidad de iluminación: En muchas especies diurnas τ se acorta cuando hay incrementos en la intensidad de luz y aumenta en especies nocturnas (Ley de Aschoff).

1.4 SINCRONIZACIÓN

Al cambio cíclico ambiental que es capaz de sincronizar un ritmo endógeno se le denomina "zeitgeber" (que significa "dador de tiempo") (Halberg, 1977). La sincronización es la capacidad de los ritmos biológicos para ajustar su período endógeno con el del sincronizador, de manera que $\tau = T$. Como consecuencia de la sincronización se establece y mantiene una relación de fase estable entre el sincronizador y el ritmo endógeno y se asegura la correspondencia del tiempo biológico con el geofísico (Aguilar-Roblero, 1993). El sincronizador más común y efectivo es la luz, aunque también funcionan como sincronizadores la temperatura, la disponibilidad de alimento y las interacciones sociales. La luz puede causar arritmia dependiendo de su intensidad. En general existe una relación inversamente proporcional entre la intensidad de la luz y la amplitud del ritmo: cuando los animales se colocan en condiciones de alta irradiancia el ritmo de actividad locomotora se vuelve arritmico, otros ritmos únicamente se amortiguan (Aschoff, 1981; Saunders, 1984). Cuando la luz alcanza intensidades altas y constantes el ritmo deja de expresarse, es decir el reloj biológico se detiene. Al volver a condiciones previas de obscuridad el reloj se reinstala (reajusta) reasumiéndose la ritmicidad (Sweeney, 1979). No sólo la intensidad de la luz produce cambios en los ritmos circadianos, lo hace también la longitud del fotoperíodo. Bajo condiciones de longitud extrema (20-24 h) algunos ritmos no son capaces de sincronizarse, pues requieren de una noche con una longitud mínima, en especial los ritmos de animales nocturnos.

En condiciones naturales el ciclo diario de iluminación sufre cambios estacionales, el fotoperíodo del ciclo se acorta o se alarga. Estos cambios se reflejan en las características de los ritmos circadianos. Al alargarse el fotoperíodo, la duración de la fase de actividad

del ritmo aumenta o disminuye de acuerdo con los hábitos y el nicho ecológico de los animales. Lo anterior es una evidencia del reconocimiento del fotoperiodo por el sistema circadiano. Esto se observa en procesos de inducción fotoperiodica en los que, de acuerdo conque una cierta fase del ritmo endógeno coincida con el período de luz del ciclo externo, un evento fotoquímico iniciará una secuencia de reacciones químicas que van a culminar con la inducción de algún proceso fisiológico (Bunning, 1960; Pittendrigh, 1981).

El fenómeno de inducción fotoperiodica permite a los animales de diferentes latitudes adecuarse a las condiciones óptimas del medio de acuerdo con los cambios estacionales del mismo.

1.5 EL RELOJ BIOLÓGICO

Puede definirse al reloj biológico como aquel sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en los procesos fisiológicos del organismo, oscila con un período regular y usa las oscilaciones externas como una referencia temporal interna (Pittendrigh y Daan, 1976; Aschoff, 1981; Halberg et al., 1977; Granados et al., 1995). Este concepto engloba dos tipos diferentes de osciladores, aquellos identificables como unidades físicas y diferenciables del resto del organismo, y aquellos que emergen como un epifenómeno resultante de la interacción de elementos interconectados en asas de retroalimentación. La interacción de ambos sistemas oscilatorios resulta en la adaptación de los organismos a las presiones ambientales cíclicas de su nicho temporal. Una de las funciones principales del reloj consiste en sincronizarse con los ciclos ambientales y transmitir esta información a sistemas efectores que expresan la ritmicidad y acoplan los diferentes los osciladores del organismo para lograr un funcionamiento coordinado (Granados et al., 1995).

Las características de los relojes biológicos son:

- a) Poseen mecanismos para medir el tiempo (cronometría).
- b) La medición se hace con relación a claves ambientales (pueden sincronizarse con claves ambientales, lo que les permite reconocer la hora local).

- c) Utilizan la información temporal para controlar procesos bioquímicos, fisiológicos y conductuales.
- d) Utilizan mecanismos humorales y neurales para la transmisión de la ritmicidad.
- e) Son capaces de detectar y traducir información medio ambiental de referencia temporal (luz, temperatura, etc.).

Se ha propuesto (Moore-Ede y Sulzman, 1984) que el sistema circadiano está compuesto por osciladores múltiples que poseen períodos independientes bajo condiciones de oscilación espontánea. Es decir, cuando se encuentran aislados de claves temporales externas, oscilan con valores de período diferente al encontrado en las condiciones en que están sincronizados al "zeitgeber", mediante un oscilador maestro que actúa como marcapaso. Se han encontrado osciladores en diversos órganos principalmente en órganos bilaterales, que pueden llegar a actuar de forma independiente. Esta es la manera en que el sistema circadiano puede ser sincronizado por diversas claves ambientales (Moore-Ede y Sulzman, 1984).

2. LOS ACOCILES *Procambarus clarkii* y *P. digueti*

2.1 GENERALIDADES

Los acociles forman una parte importante de los ecosistemas de agua dulce debido a que se encuentran en la parte superior de la pirámide alimentaria. Cuando estos organismos se encuentran en abundancia, llegan a ser considerados como una plaga, debido a sus efectos sobre la vegetación, la depredación sobre otros invertebrados y por las alteraciones que causan en el suelo, cuando se trata de especies constructoras de madrigueras (Momut et al., 1978).

Las especies de acocil estudiadas hasta el momento son predominantemente nocturnas, aunque suelen forrajear a lo largo del día. En especial durante la temporada reproductiva pueden estar expuestos a la luz del día (Huner, 1988). *Procambarus clarkii* vive en charcas fangosas y en fondos lodosos de arroyos lentos y es particularmente abundante en pantanos estacionales y aguas cenagosas; esta especie forma madrigueras y túneles

- c) Utilizan la información temporal para controlar procesos bioquímicos, fisiológicos y conductuales.
- d) Utilizan mecanismos humorales y neurales para la transmisión de la ritmicidad.
- e) Son capaces de detectar y traducir información medio ambiental de referencia temporal (luz, temperatura, etc.).

Se ha propuesto (Moore-Ede y Sulzman, 1984) que el sistema circadiano está compuesto por osciladores múltiples que poseen períodos independientes bajo condiciones de oscilación espontánea. Es decir, cuando se encuentran aislados de claves temporales externas, oscilan con valores de período diferente al encontrado en las condiciones en que están sincronizados al "zeitgeber", mediante un oscilador maestro que actúa como marcapaso. Se han encontrado osciladores en diversos órganos principalmente en órganos bilaterales, que pueden llegar a actuar de forma independiente. Esta es la manera en que el sistema circadiano puede ser sincronizado por diversas claves ambientales (Moore-Ede y Sulzman, 1984).

2. LOS ACOCILES *Procambarus clarkii* y *P. digueti*

2.1 GENERALIDADES

Los acociles forman una parte importante de los ecosistemas de agua dulce debido a que se encuentran en la parte superior de la pirámide alimentaria. Cuando estos organismos se encuentran en abundancia, llegan a ser considerados como una plaga, debido a sus efectos sobre la vegetación, la depredación sobre otros invertebrados y por las alteraciones que causan en el suelo, cuando se trata de especies constructoras de madrigueras (Momut et al., 1978).

Las especies de acocil estudiadas hasta el momento son predominantemente nocturnas, aunque suelen forrajear a lo largo del día. En especial durante la temporada reproductiva pueden estar expuestos a la luz del día (Huner, 1988). *Procambarus clarkii* vive en charcas fangosas y en fondos lodosos de arroyos lentos y es particularmente abundante en pantanos estacionales y aguas cenagosas; esta especie forma madrigueras y túneles

y normalmente se distribuye entre los 59° a 28° de latitud N. Los especímenes usados en la experimentación en nuestro laboratorio son colectados en Delicias, Chihuahua (2345 m de altura, y 27°45'N), donde la luminosidad a la que están sometidos varía entre los 0.039 Wm⁻² al amanecer y 3.68 Wm⁻² al mediodía. Esta es una especie invasora que ha ido ampliando su distribución geográfica, pues a principios de siglo no se encontraba en el territorio nacional y ahora se encuentra en el norte de Chihuahua. En algunos países es inclusive una especie que se ha declarado nociva por los efectos que tiene desplazando especies nativas (Egipto y España) donde soporta las condiciones de estío (Huner, 1988).

Procambarus digueti prefiere los charcos, los lagos y los arroyos con aguas abiertas con una profundidad de 0.5 a 1.5 m, en donde puede o no encontrarse vegetación en los bordes. En la localidad de colecta de *P. digueti* en Zamora, Michoacán (1575 m de altitud, latitud, 19°98'N) a diferentes horas del día, la intensidad fluctúa entre las 0.0411 Wm⁻² en las horas crepusculares y 3.2 Wm⁻² al mediodía (Fanjul-Moles et al., 1998), ésta es una especie endémica, posiblemente es la más primitiva del género y con menor afinidad con otros *Procambarus* (Villalobos, 1983). Las diferencias entre estas dos especies se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1.- Comparación entre *P. clarkii* y *P. digueti*.

	<i>Procambarus clarkii</i>	<i>Procambarus digueti</i>
Distribución latitudinal	59 a 29° latitud norte	18 a 20° latitud norte
Tipo de cuerpo acuático	Distribución latitudinal Pantanos estacionales, arroyos lentos.	Lagos y arroyos de aguas abiertas
Origen en México	Introducida a principios de 1900	Endémica, origen en el cretácico inferior
Forman madrigueras	Si	No
Disponibilidad de O ₂ ambiente	Soporta condiciones anaerobias	Aerobio
Dormancia	Si	No se ha descrito
Intensidad de luz	0.039 - 3.68 Wm ⁻²	0.04 - 3.2 Wm ⁻²
Asociación a vegetación	No	Si

2.2 RESPUESTA A LA LUZ

En 1880, Huxley reportó que los crustáceos no toleraban ni mucho calor ni mucha luz solar y que eran más activos durante el anochecer, en tanto que, durante el día permanecían escondidos en madrigueras. Sin embargo, estos animales presentan una respuesta fototáctica hacia la luz durante la noche, condición que era aprovechada por los pescadores para atraerlos hacia las trampas. (Huxley, 1800, citado en Huner y Lindqvist, 1995; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997). En *P. clarkii*, así como en otros crustáceos se ha observado un patrón bimodal de actividad en el ciclo de 24 h. El primer pico en la actividad se observa al anochecer, cuando los animales salen de sus madrigueras para alimentarse y el segundo pico aparece antes del amanecer y puede durar varias horas. (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997).

El nivel de la respuesta a la luz varía en el ciclo de 24 h. El umbral es menor durante la noche que durante el día y la latencia de la respuesta es menor del anochecer a media noche, cuando es mayor el nivel de actividad locomotora (Aréchiga et al., 1993).

En relación a la respuesta a la luz, en estos organismos se observan cambios circadianos en la posición de los pigmentos accesorios de la retina (Fingerman y Lowe, 1957), y en la actividad eléctrica de los fotorreceptores visuales y extrarretinianos (Aréchiga et al., 1973; Fanjul-Moles et al., 1987; Prieto-Sagredo y Fanjul-Moles et al., 2001).

Otros estudios han demostrado que la luz es un factor determinante tanto en el proceso de muda en estos organismos como en la maduración gonadal (Castañón-Cervantes et al., 1995; Fanjul-Moles et al., 2001).

Las condiciones de iluminación también son uno de los factores que influencia de manera determinante la tasa de consumo de oxígeno en diferentes especies de acocil (Fingerman 1955; Rice y Armitage, 1974, Fanjul-Moles et al., 1998). Existen datos de que, como parte de su respuesta a la luz, *P. clarkii* puede modificar su metabolismo, cambiando la ruta de obtención de energía de aerobia a anaerobia por lo que se le considera un organismo anaerobio facultativo que puede entrar en condiciones semejantes a la dormancia (hibernación y estivación). Esta capacidad metabólica y conductual se ha reportado en *P. díqueti*, en condiciones de laboratorio. Se ha propuesto que éstas diferencias

conductuales interespecíficas indican capacidades diferentes para adaptarse al estrés luminoso (Fanjul-Moles et al., 1998).

Lo anterior coincide con lo reportado para otros animales de las regiones polares y tropicales que se encuentran en condiciones constantes de temperatura y no sufren cambios en la aclimatización. Los animales de latitudes intermedias experimentan mayores cambios de temperatura, de tal forma que muchas especies poseen capacidad adaptativa que les permite compensar los cambios en temperatura (Prosser, 1957).

Así mismo, se ha reportado que la luz afecta a las estructuras neurales y endócrinas responsables de los cambios conductuales y metabólicos y que en diversos crustáceos la exposición a la luz brillante causa daño estructural y funcional de los fotorreceptores, este daño está asociado a la foto oxidación de ácidos grasos no saturados posiblemente como resultado de reacciones de fotosensibilización (Kashiwagi et al., 1997).

Cuando acociles de estas especies se someten a condiciones experimentales crónicas de alta intensidad de luz o fotoperiodos de 20 h, se producen una disminución en el consumo de oxígeno e incremento de la concentración de lactato; lo anterior va apareado con un aumento en la concentración de glutatión reducido (GSH) en hemolinfa (Fanjul-Moles, et al, 1998; Prieto-Sagredo, et al., 2000).

Por lo anterior, parece que en el acocil la luz es un agente estresor que participa en la elección del hábitat como se ha reportado para especies que han evolucionado en ambientes con latitudes diferentes (Prosser, 1957). Por otra parte, se ha demostrado que en las reacciones de fotosensibilización, cuando ciertas moléculas son iluminadas con la longitud de onda adecuada, la absorben y pueden transferir esta energía a una molécula de oxígeno molecular generando así el oxígeno en singulete (1O_2), también se forman aniones superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilos (HO^{\cdot}) (Halliwell y Gutteridge, 1998, Hansberg, 1999). Entre estas moléculas se cuentan la bilirrubina, las porfirinas, el retinal, las flavinas y los citocromos, estos dos últimos son muy abundantes en los acociles.

Procambarus clarkii es un organismo en el que se han demostrado ritmos circadianos y estacionales que le permiten adaptarse a los cambios diarios y estacionales de la luz. Entre los ritmos más estudiados se encuentran el ritmo de actividad (Fanjul-Moles, 1998)

y el de consumo de oxígeno (Fingerman 1955; Rice y Armitage, 1974). Ambos ritmos circadianos pueden producir variaciones en el estado oxidativo interno con fluctuaciones en los mecanismos antioxidativos.

3. ESTRÉS

3.1 DEFINICIÓN

Estrés es un término muy general usado en la vida diaria para describir situaciones en las que una persona está en dificultades o no puede sobrellevar las demandas del medio y que pueden tener como resultado ciertos desórdenes físicos y neurológicos. En la investigación biológica y psicológica se ha usado en diferentes sentidos. Posiblemente el más simple es una analogía de la influencia física de cierta carga colocada sobre una pieza de metal lo que crea una deformación o tensión sobre el metal, esta tensión puede ser cuantificada ("strain" en inglés) (Archer, 1979).

Un uso más específico surgió de los estudios dirigidos por Hans Selye, investigador que utilizó el término estrés para describir la respuesta ante cierta fuerza externa a la que Selye denominó estresor. Selye consideraba al estrés como una reacción, un síndrome específico de respuestas adaptativas de varios sistemas, entre los que se encuentran la corteza suprarrenal, el timo y el aparato digestivo. Este investigador denominó a estos cambios bajo el nombre de "síndrome general de adaptación" (Selye, 1950, citado en Archer, 1979).

Al considerar los efectos de los estresores físicos, en la respuesta del cuerpo hay una movilización de energía que se puede considerar como la preparación para enfrentar o reparar alteraciones, producto de una situación de peligro o de daño físico.

Cuando el concepto de estrés se transfiere al contexto fisiológico, se debe tener en cuenta que hay muchas situaciones que no necesariamente se presentan como potencialmente peligrosas y que, sin embargo, evocan diferentes aspectos de la respuesta al estrés. Nuevas investigaciones han revelado la importancia del componente psicológico, en el que participa la forma en la que el cerebro interpreta una tal o cual situación (Archer, 1979). Todas las respuestas conductuales o fisiológicas se pueden considerar como adaptativas

y el de consumo de oxígeno (Fingerman 1955; Rice y Armitage, 1974). Ambos ritmos circadianos pueden producir variaciones en el estado oxidativo interno con fluctuaciones en los mecanismos antioxidativos.

3. ESTRÉS

3.1 DEFINICIÓN

Estrés es un término muy general usado en la vida diaria para describir situaciones en las que una persona está en dificultades o no puede sobrellevar las demandas del medio y que pueden tener como resultado ciertos desórdenes físicos y neurológicos. En la investigación biológica y psicológica se ha usado en diferentes sentidos. Posiblemente el más simple es una analogía de la influencia física de cierta carga colocada sobre una pieza de metal lo que crea una deformación o tensión sobre el metal, esta tensión puede ser cuantificada ("strain" en inglés) (Archer, 1979).

Un uso más específico surgió de los estudios dirigidos por Hans Selye, investigador que utilizó el término estrés para describir la respuesta ante cierta fuerza externa a la que Selye denominó estresor. Selye consideraba al estrés como una reacción, un síndrome específico de respuestas adaptativas de varios sistemas, entre los que se encuentran la corteza suprarrenal, el timo y el aparato digestivo. Este investigador denominó a estos cambios bajo el nombre de "síndrome general de adaptación" (Selye, 1950, citado en Archer, 1979).

Al considerar los efectos de los estresores físicos, en la respuesta del cuerpo hay una movilización de energía que se puede considerar como la preparación para enfrentar o reparar alteraciones, producto de una situación de peligro o de daño físico.

Cuando el concepto de estrés se transfiere al contexto fisiológico, se debe tener en cuenta que hay muchas situaciones que no necesariamente se presentan como potencialmente peligrosas y que, sin embargo, evocan diferentes aspectos de la respuesta al estrés. Nuevas investigaciones han revelado la importancia del componente psicológico, en el que participa la forma en la que el cerebro interpreta una tal o cual situación (Archer, 1979). Todas las respuestas conductuales o fisiológicas se pueden considerar como adaptativas

en tanto tienden a minimizar o ayudar a liberar al animal de una fuente de posible peligro, mediante mecanismos de retroalimentación negativa. De lo anterior surge una definición operativa en la que se propone al estrés como la incapacidad prolongada de los organismo para evitar un daño potencial, lo cual conduce a la activación de los sistemas fisiológicos por encima de su eficiencia máxima (Archer, 1979).

3.2 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es la situación en la que la presencia de radicales libres o de especies reactivas de oxígeno (ROS), nitrógeno o de metales de transición, producen cambios funcionales y estructurales en el organismo. Estos pueden originar procesos patológicos al producir desbalance en el estado redox en el organismo (Halliwell y Gutteridge, 1998). El estrés oxidativo se ha definido como el resultado del daño a biomoléculas producido por radicales libres o especies reactivas. Un radical libre es cualquier especie química capaz de existir con uno o más electrones desapareados, y el término ROS agrupa tanto a los radicales libre y a las especies no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. La reactividad varía de una especie a otra, las hay oxidantes y reductoras y todas ellas inician reacciones en cadena. En el caso de la oxidación de lípidos se forma un carbono central -C- lo que provoca cambios estructurales además de generar aldehídos citotóxicos (Halliwell, 1991).

Halliwell y Gutteridge (1998), definieron a los antioxidantes como: "Aquella sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones e inhibe o retarda significativamente la oxidación de un sustrato que se encuentra en mucha mayor concentración". A partir de esta definición se considera que las defensas antioxidativas incluyen:

- a) Los agentes que remueven catalíticamente las especies reactivas,
- b) Las proteínas que minimizan la disponibilidad de prooxidantes como iones de hierro o cobre,
- c) Las proteínas que protegen biomoléculas mediante otros mecanismos, como son las proteínas del choque térmico (heat shock proteins),
- d) Los agentes de bajo peso molecular que reducen las especies reactivas.

La importancia antioxidante de estas biomoléculas depende de la especie reactiva sobre la que actúan, donde y como se genera, así como del daño que produce. Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción (Gutteridge y Halliwell, 1999).

Entre los antioxidantes sintetizados en las células animales se encuentran enzimas y agentes de bajo peso molecular. Entre las enzimas se cuentan:

- a) La familia de las superóxido dismutasas (SOD). Esta familia está constituida por metaloenzimas que convierten el $O_2^{\cdot -}$ a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y se encuentran virtualmente en todos los organismos aerobios. Se conocen cuatro tipos de enzimas: CuZnSOD, CuSOD, FeSOD y MnSOD.
- b) Las catalasas y las peroxidasas transforman el H_2O_2 a agua y están ampliamente distribuidas en bacterias aerobias, plantas y animales. La glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión transferasa (GT) participan en la detoxificación de peróxidos y xenobióticos como herbicidas, y usan el glutatión reducido (GSH) como sustrato. La glutatión reductasa (GR) es la enzima que reduce el glutatión oxidado (GSSG), y requiere NADPH+H para llevar a cabo esta función. También se han encontrado peroxidasas no específicas en plantas y bacterias. Estas enzimas pueden utilizar una amplia gama de sustratos. (Spector, 1991; Halliwell y Gutteridge, 1998; Gamaley y Klyubin, 1999).

Entre los agentes de bajo peso molecular de mayor importancia se encuentran:

- a) El GSH, es el antioxidante que se encuentra en las mayores concentraciones intracelulares. Actúa como cofactor de la GPx para detoxificar H_2O_2 . Además puede detoxificar radicales libres por vías no enzimáticas (Spector, 1991; Taylor et al., 1996; Halliwell y Gutteridge, 1998; Dalton et al., 1999; Gamaley y Klyubin, 1999).
- b) La bilirubina y el ácido úrico se han propuesto como antioxidantes al unirse a metales e impedir reacciones tipo Fenton. El ácido úrico también es eficiente protegiendo en contra del ozono (O_3) y del dióxido de nitrógeno ($NO_2^{\cdot -}$).

- c) Los aminoácidos que tienen la capacidad de secuestrar iones metálicos y son susceptibles de oxidarse tanto en presencia de H_2O_2 como en concentraciones fisiológicas de bicarbonato (Stadtman y Berlett, 1991).
- d) La melatonina se considera actualmente como un importante antioxidante pues además de atrapar al radical OH^\cdot , estimula enzimas antioxidativas importantes (SOD, GPx y GR). Esta hormona en dosis farmacológicas es efectiva para reducir el daño ocasionado por agentes tóxicos y en paradigmas experimentales que inducen el estrés oxidativo (Reiter et al., 1997).

3.3 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Un radical libre es cualquier especie química capaz de existir en forma independiente y que contiene uno o más electrones desapareados como el oxígeno en singulete (1O_2), los radicales Superoxido (O_2^\cdot), Hidroxilo (OH^\cdot), Peroxilo (RO_2^\cdot), Alcoxilo (RO^\cdot), Hidroperoxilo (HO_2^\cdot), y los Óxidos de Nitrógeno: óxido nítrico (NO), y dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot)(Gutteridge y Halliwell, 1999).

"Especies reactivas" es el término en que se agrupa a los radicales y algunas especies no radicales como el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), el Ácido Hipocloroso (HOCl), el Ozono (O_3) y el Peroxinitrito (ONOO). (Gutteridge y Halliwell, 1999).

Las fuentes exógenas generadoras de ROS en los organismos pueden ser antibióticos, fármacos (p.e. paracetamol); contaminantes (p.e. NO_2 , O_3 , humo de cigarrillo), la quimioterapia y la exposición a radiación ultravioleta e ionizante (Finkel y Holbrook, 2000). Las fuentes endógenas son principalmente: reacciones enzimáticas (xantina oxidasa, las NADPH/NADH oxidasas, la acil CoA oxidasa y los citocromos P-450); pequeñas moléculas autooxidables como las catecolaminas y las quinonas (Dalton et al., 1999; Gamaley y Kluybin, 1999); además elementos del sistema inmunológico de los organismos, en especial las células fagocíticas. Aunque las células no fagocíticas también generan H_2O_2 su tasa de generación es apenas el 1% del generado por las células fagocíticas (Gamaley y Kluybin, 1999).

En el plasma sanguíneo y en los tejidos oculares de los mamíferos se está generando H_2O_2 continuamente a partir de la oxidación del GSH y/o del ascorbato (Spector, 1991; Halliwell et al., 2000; Long y Halliwell, 2000). Por otra parte, durante la fosforilación oxidativa se estima que del 2-4% del O_2 no se reduce a agua por la citocromo C oxidasa sino se forma el anión semiquinona el cual puede transferir uno o dos electrones al oxígeno molecular con la subsecuente formación del $O_2^{\cdot-}$. Este, a su vez, puede generar otras ROS; que en exceso reaccionan con toda clase de macromoléculas y pueden causar anomalías conductuales, citotoxicidad y daño mutagénico (Gutteridge y Halliwell, 1999; Dalton et al 1999, Finkel y Holbrook, 2000).

3.4 PAPEL BIOLÓGICO DE ROS

La generación de ROS dentro de ciertos límites es necesaria para mantener la homeostasis del organismo (Finkel and Holbrook, 2000). En los animales, en especial en mamíferos, los macrófagos son las células de alarma del cuerpo que sintetizan y excretan materiales altamente reactivos como el anión $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 , el NO y algunas enzimas proteolíticas entre otras. Estos materiales biológicamente activos son importantes para inactivar a las bacterias y a las células tumorales; así mismo, su producción es un factor importante para desencadenar una variedad de funciones celulares (Gamaley y Klyubin, 1999). La sobreactivación de los macrófagos y la producción excesiva de productos inmunosupresores pueden contribuir a la alteración morfofuncional de órganos y sistemas durante el estrés severo, o en lesiones presentes en el estado de choque (Anderson y Meister, 1980).

En algunas respuestas ante oxidantes puede llegar a producirse una sobre-estimulación de las vías de señalización reguladas por ROS. Los cambios asociados con el daño oxidativo y el reestablecimiento de la homeostasis celular frecuentemente llevan a la activación o inactivación de genes, de factores de transcripción, de enzimas de defensa antioxidativa y de proteínas estructurales (Halliwell y Gutteridge, 1998; Gamaley y Klyubin, 1999).

La especie reactiva considerada como la más importante en la señalización celular en los mamíferos es el H_2O_2 , que puede actuar como segundo mensajero. En concentraciones de 1-50 μM , el H_2O_2 posee una citotoxicidad limitada y puede ser utilizado como una molécula de señalización intra y extracelular. En las zonas de inflamación, el H_2O_2 que generan los fagocitos modula el proceso inflamatorio regulando la expresión de moléculas de adhesión, y controlando tanto la proliferación celular y la apoptosis, como la agregación plaquetaria (Halliwell, et al., 2000).

El H_2O_2 actúa como segundo mensajero en las células eucariontes, mediante la activación de las vías de señalización de estrés. Estas vías producen una respuesta genética común (Gamaley y Kluybin, 1999; Finkel y Holbrook, 2000).

Las especies reactivas son también agentes mitogénicos y regulan cascadas de señalización de los factores de crecimiento. Se ha demostrado que estas moléculas pueden inducir señales iónicas similares a las mediadas por receptores de membrana, como la hiperpolarización de la membrana y cambios en el pH intracelular (Gamaley y Kluybin, 1999).

En la mitocondria y en el citosol, las ROS determinan el estado redox de residuos de grupos sulfhidrilos. Estos residuos son críticos para el establecimiento de interacciones proteína-proteína. Los factores de transcripción contienen residuos de cisteína, por lo que el estado redox de los tioles regula la unión al DNA de factores como las proteínas Fos y Jun, modulando la actividad de transcripción (Taylor et al., 1996; Dalton et al., 1999; González-Flecha y Dempley, 1999).

Son interesante los mecanismos de adaptación que presentan los diversos animales ante los cambios de ROS producidos por las alteraciones entre la ventilación y la reperfusión. En el riñón y en el corazón de rata se ha reportado una disminución de las defensas antioxidativas durante la reperfusión (Ruuge et al, 1991). Lo anterior es contrario a lo que se observa en los organismos que en condiciones naturales se enfrentan a periodos hipometabólicos o hipóxicos. Durante estas circunstancias se eleva la actividad de las enzimas antioxidates (Tabla 2). Esto se ha interpretado como una respuesta anticipatoria a posibles incrementos de ROS debido a la hiperventilación producida durante la salida

del estado hipometabólico, por lo que se ha sugerido que esta respuesta es esencial para la adaptación (Hermes-Lima et al., 1998). Hay organismos que se enfrentan continua o cíclicamente a niveles cambiantes de oxígeno debido a sus características ecológicas. Para adaptarse estos cambios siguen en general dos estrategias (Grundy, y Storey, 1998; Hermes-Lima et al., 2001):

- a) Aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes para prepararse al aumento cíclico de la presión parcial de oxígeno. Esta es la estrategia que adoptan especies susceptibles a enfrentar situaciones de estrés oxidativo como *Helix aspersa* (Hermes-Lima et al., 1998).
- b) Mantener los niveles de antioxidantes elevados. Este es el caso de *Trachemys scripta elegans* cuya estrategia principal es mantener los niveles de enzimas y productos antioxidantes en niveles muy por encima de los de otras especies ectotérmicas.

Existen algunos reportes sobre la estacionalidad de la actividad de las enzimas antioxidantes en invertebrados, (Power y Sheehan, 1996). Estos autores hicieron estudios mensuales en *Mytilus edulis*, encontrando que los antioxidantes y las enzimas se encuentran en una menor concentración durante los meses de invierno, cuando existe una acumulación máxima de los productos de lipoperoxidación.

Sin embargo, en otras especies, diversos autores señalan que, en las circunstancias señaladas en la Tabla 2, se encuentran diferencias en la concentración de antioxidantes pero no hay daño lipoperoxidativo en los diferentes tejidos estudiados (Ramos 1999; Hermes-Lima et al., 2001).

Tabla 2.- Cambios en las defensas antioxidativas de diversos animales sometidos a cambios ambientales.

ESPECIE	SISTEMA ANTIOXIDANTE
CONGELACION	
<i>Thamnophis sirtalis</i>	GPx, catalasa
<i>Rana sylvatica</i>	GPx
ANOXIA/HIPOXIA	
<i>Thamnophis sirtalis</i>	SOD, GSH
<i>Rana pipiens</i>	GPx, GST, catalasa
<i>Cyprinus carpio</i>	SOD
ESTIVACION	
<i>Otala lactea</i>	
Pie	SOD, GST, catalasa
Hepatopáncreas	SOD, GPx
<i>Helix aspersa maxima</i>	SOD

Los resultados de esta tabla se han interpretado bien cómo que no hay formación de ROS, o como que estos animales poseen defensas antioxidantes suficientes para sobreponerse a cualquier incremento súbito de ROS durante la reperfusión de oxígeno.

3.5 EFECTOS DE LA LUZ

A la producción de ROS o especies reactivas como resultado de la acción de la luz se le ha denominado estrés fotooxidativo. La donación de electrones al oxígeno puede ser resultado tanto de la actividad fotosintética como de la exposición la foto oxidación de tejidos ricos en pigmentos que pueden llevar a cabo reacciones redox (Foyer et al., 1994). La radiación luminosa activa una cascada de respuestas genéticas al estrés, probablemente detonando señales de transducción (proteincinasas y fosfatasas) y vías redox (glutación-peroxidasa y glutación-reductasa) (Papaconstantinou, 1994).

Entre los compuestos biológicos que pueden participar en las reacciones de fotosensibilización se encuentran la riboflavina, la bilirrubina, el retinal, las clorofilas a y b, y las porfirinas. Cuando estas moléculas son iluminadas con luz de cierta longitud de onda la absorben, y la molécula pasa a un nivel de excitación durante el cual puede

transferir la energía a una molécula cercana de O_2 y pueden generar 1O_2 , O_2^- , y H_2O_2 . A veces se causa daños a la propia molécula fotosensible. (Halliwell y Gutteridge, 1999).

3.6 EL SISTEMA GLUTATION Y SUS FUNCIONES METABÓLICAS

El glutatión reducido (GSH, glutamil-cisteinil-glicina) es la molécula contenedora de tioles más abundante en todas las células animales. Su participación en la función celular incluye la detoxificación, el metabolismo peroxidativo y el transporte de aminoácidos (Kosower y Kosower, 1978, Anderson y Meister, 1980).

El GSH se sintetiza a partir del L-glutamato, L-cisteína y glicina en dos pasos consecutivos, catalizados por la γ -glutamyl-cisteina sintetasa y la glutatión sintetasa. Las reacciones redox son catalizadas por las enzimas GR y GPx, y la formación de tioésteres se lleva a cabo a partir de la GT. Una vez sintetizado, el GSH puede ser objeto de transporte a través de membranas biológicas y formar parte de una complicada red de transporte interórganos. El GSH sintetizado en hígado se exporta al sistema circulatorio para abastecer otros tejidos, también el GSSG es liberado en productos como la bilis (Anderson y Meister, 1980; Anderson, 1989).

Son varios los reportes que apoyan el papel protector del GSH ante la radiación electromagnética, y en especial la radiación UV y la ionizante, la que como es bien sabido ocasiona la formación de O_2^- (Revesz y Malaise, 1983). Aunque el efecto de la radiación visible en esta respuesta protectora ha sido poco explorada, hay reportes que indican cambios en la responsividad de este tiol ante la radiación luminosa (James et al., 1994; Rywkin et al., 1995; Savoure et al., 1996).

La producción del GSH y de las enzimas involucradas en su ciclo redox, la GR y la GPx; constituye uno de los mecanismos más importantes y eficientes de defensa antioxidativa de las células. El GSH actúa como un donador de hidrógeno y contribuye en forma directa e indirecta a la reducción del H_2O_2 y a la peroxidación lipídica, reacciones que son catalizadas por la GPx (Jones et al., 1981; Sies, 1985; Wefers y Sies, 1983).

La actividad de GPx se mide indirectamente por medio de una reacción acoplada con la GR. El producto de la actividad de ambas enzimas se presenta así:



Cada molécula que es oxidada por la GR corresponde a una molécula de hidroperóxido (ROOH) reducido por la GPx. Por lo tanto se puede determinar la actividad de esta enzima midiendo la disminución de la absorbancia del NADPH a 340 nm. La GR cataliza la reducción del GSSG por NADPH. El papel de la GR es aumentar la disponibilidad de GSH para su reacción con radicales libres y peróxidos (Bompart et al., 1990).

Como se dijo anteriormente, el GSH juega un papel importante en la transducción de señales, en la expresión génica y en la apoptosis. Puede detoxificar radicales libres por vías no enzimáticas, p.e. participa en la detoxificación de drogas con grupos funcionales que reducen parcialmente al oxígeno molecular. La medición del GSSG es uno de los mejores marcadores de la generación de oxiradicales de forma droga-dependiente. El GSH está involucrado en otros procesos metabólicos, como el mantenimiento de comunicación intercelular, el transporte intracelular del cobre y es un cofactor de enzimas en diversas vías metabólicas. Participa en la regulación del estado redox de los disulfuros en las proteínas al igual que otros tioles como la tioredoxina y glutaredoxina. El GSH está sujeto a control hormonal, y a su vez puede modular la expresión hormonal, al regular el estado redox de receptores hormonales en la membrana, que contienen grupos tioles o disulfuros (Spector, 1991; Taylor et al., 1996; Halliwell y Gutteridge, 1998; Dalton et al., 1999; Gamaley y Klyubin, 1999).

3.7 PARTICIPACIÓN EN LA DESTOXIFICACIÓN

Tanto el GSH como su maquinaria enzimática se encuentran localizados en el compartimento celular de los animales. Sin embargo, hay evidencias de que GSH puede actuar en el compartimento extracelular. En los mamíferos se han detectado concentraciones bajas pero significativas en plasma de GSH (Anderson y Meister, 1980; Leus et al., 1997). Este GSH podría funcionar manteniendo el estado redox en los tioles

de las proteínas plasmáticas, así como en la protección contra los radicales libres en los sitios de inflamación en órganos y sistemas. El órgano principal de exportación de GSH hacia el plasma es el hígado, en tanto que el riñón se encarga de eliminar este tiol de la circulación participando en el recambio interórgano. Sin embargo, durante el estrés oxidativo varios órganos, además del hígado, exhiben un aumento en la liberación de GSH. Entre estos órganos se encuentran el pulmón, el corazón y el sistema hematopoyético (Anderson y Meister, 1980; Leus et al., 1997).

El sistema glutatión suele ser la primera línea de defensa contra el daño tisular generado por electrófilos metabólicos o administrados. La alquilación de los metabolitos electrófilos o la reducción de ROS se han considerado como los mecanismos principales de acción del GSH. La alquilación va seguida de la excreción de los conjugados, cuando la excreción de GSH supera su producción, hay un daño tisular.

En la oxidación de GSH a GSSG por efecto de fármacos con grupos funcionales, que vía reacciones enzimáticas pueden transferir 1 ó 2 electrones al oxígeno molecular, se llega a generar gran cantidad de ROS en tejidos, aún cuando las reductasas continúan activas. La velocidad de generación de oxirradicales se estima por los cambios en la velocidad de flujo del GSSG. (Ziegler, 1991).

La glutatión transferasa es la enzima más importante en la actividad de reducción de nitratos orgánicos en el hígado. Los nitratos producen glutatión sulfenil nitrito que reacciona con otra molécula de GSH para formar $GSSG + NO_2 + H^+$ (Ziegler, 1991).

El aumento en la tasa de liberación de GSH hepático contribuye a la función de protección al estrés oxidativo en los sitios extrahepáticos. En la rata, al inicio del ejercicio físico hay un aumento de GSH plasmático en forma simultánea a una disminución de GSH hepático (Lew et al., 1985). Lo anterior sugiere un abastecimiento de GSH al músculo en estado de estrés (Lew et al., 1985; Kim, et al., 1996). La disminución de GSH suele corresponder con aumentos de concentración de GSSG, lo que hace que cambie la relación entre ambas formas de glutatión, esta relación se ha considerado como un marcador de estrés oxidativo en diversas especies (Halliwell y Gutteridge, 1998).

3.8 EL GSH EN LOS CRUSTACEOS

Poco es el trabajo que se ha realizado con crustáceos, aunque los primeros reportes datan de 1936 (Monier, 1936). Este autor encontró pequeñas concentraciones de GSH y GSSG en la hemolinfa de la langosta. Recientemente se han observado cambios en las concentraciones de GSH del hepatopáncreas de *P. clarkii* expuesto a estrés tóxico (Almar et al., 1987; Blat et al., 1988; Nies et al., 1991; Almar et al. 1998). La dinámica de este sistema debe ser un buen indicador de los mecanismos que permiten a este grupo lidiar con un entorno cambiante.

En nuestro laboratorio, se han documentado diferencias en las concentraciones de GSH y GSSG en la hemolinfa en respuesta a las condiciones luminosas tanto en esta especie de acocil como en la especie *P. digueti* (Prieto-Sagredo, et al., 2000). Lo anterior demuestra que los acociles son capaces de desarrollar mecanismos antioxidativos como respuesta a la oxidación producida por luz. Se ha demostrado que la composición de ácidos grasos en las membranas de las células fotorreceptoras de *P. clarkii* varía durante los períodos de estrés térmico o fótico, y existe un incremento de lípidos peroxidados durante la exposición a luz brillante (Kashiwagi et al., 1997).

En el acocil *P. clarkii* se ha demostrado un ritmo endógeno de melatonina en el tallo ocular (Agapito et al., 1995). El ritmo endógeno de melatonina en el pollo parece modular ritmos diarios de GPx y GR. (Pablos et al., 1998). Esta hormona aumenta la actividad de la GPx en diversos tejidos del pollo. Estos autores reportaron la desaparición de estos ritmos después de la exposición de los organismos a luz constante durante varios días. Ya hace tiempo, un grupo mexicano había reportado cambios rítmicos diarios en componentes del sistema glutatión en la corteza cerebral de rata (Díaz-Muñoz et al., 1985). Otros grupos han documentado ritmos circadianos en las defensas antioxidativas en vertebrados (Kolossova et al., 1983; Bridges et al., 1992; Hodoglugil, 1995; Li et al., 1997), particularmente en el estado de GSH y actividad de SOD en plasma de ratones y ratas. Sin embargo, y a pesar de su posible correlación con los ritmos endógenos de melatonina, en el acocil no se han investigado ritmos endógenos en el sistema glutatión.

4. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Los organismos recurren a la información fotoperiódica (duración de la fotofase en un ciclo de 24 h) para el control estacional del desarrollo y la reproducción (Saunders, 1984). Las respuestas fotoperiódicas de los animales (fotoperiodicidad) son resultado de la interacción entre el sistema circadiano y los cambios en la duración del día debidos al movimiento de translación terrestre; este fenómeno es más evidente en las especies templadas, mientras que en las ecuatoriales la fotoperiodicidad está amortiguada (Pittendrigh y Minis, 1964; Saunders, 1984; Thomas y Vince-Prue, 1997). Estos cambios cíclicos en la cantidad de luz, someten a los organismos a estrés fotooxidativo en forma periodica produciendo cambios en el estado antioxidante de los mismos (Thomas y Vince-Prue, 1997). La duración de la fotofase se ha considerado como una presión de selección (Pittendrigh, et al., 1991). Se han reportado cambios estacionales en la concentración de melatonina, una hormona clave en la respuesta fotoperiódica de los organismos, y que actúa también como antioxidante y como modulador de la actividad de las enzimas del sistema glutatión (Hardeland et al., 1995; Pablos et al., 1998).

En el acocil, un animal nocturno, se ha documentado la existencia de ritmos circadianos que pueden producir alteraciones en el estado oxidativo interno, originando fluctuaciones endógenas en los sistemas de defensa antioxidativa (Fingerman 1955; Rice y Armitage, 1974, Fanjul-Moles et al., 1998). En las especies de acocil *P. clarkii* y *P. digueti* se han demostrado cambios interespecíficos en el estado del sistema glutatión relacionados con la irradiancia y longitud de la fotofase de los ciclos luz -oscuridad. Estos cambios parecen estar relacionados con las características ecológicas de cada especie y su tolerancia a la luz (Prieto-Sagredo et a., 2002). *Procambarus clarkii* es una especie que enfrenta cambios extremos en la longitud del fotoperiodo (5-22 h) durante el año. En cambio, *P. digueti* es una especie cuya distribución ecuatorial, lo somete tan sólo a cambios anuales de 1 h de diferencia en el fotoperiodo a lo largo del año (Huner, 1988; Fanjul-Moles et al., 1998). Si ambas especies poseen ritmos circadianos en el ciclo glutatión, probablemente las características de los parámetros de los ritmos, así como su capacidad de sincronización presentaran diferencias interespecíficas.

5. HIPÓTESIS

1.- Las especies de acocil *P. clarkii* y *P. digueti* presentarán ritmos circadianos en las enzimas y productos del sistema glutatión.

2.- Debido a las diferencias ecológicas y latitudinales de ambas especies, la manifestación y sincronización de los ritmos serán distintas. En condiciones de ciclos LO 12:12 que imitan una fotofase ecuatorial, las dos especies se sincronizarán tanto en baja como en alta irradiancia. En condición experimental LO 20:4 que imita una fotofase latitudinal, únicamente *P. clarkii* presentará ritmos capaces de sincronizarse. La alta irradiancia producirá un amortiguamiento en la amplitud de los ritmos.

3.- Las condiciones de alta irradiancia y fotofase larga producirán una mayor foto-oxidación, por lo que se espera que se incremente la actividad de las enzimas y cambios de las concentraciones de los sustratos/productos. Esto se reflejará en cambios en el mesor y en la amplitud de los ritmos de los parámetros del sistema glutatión.

6. OBJETIVOS

General:

Caracterizar los ritmos circadianos en el sistema glutatión de dos especies de acocil con diferente distribución latitudinal.

Particulares:

Describir los ritmos endógenos en la actividad enzimática de la GPx y de la GR en el hepatopáncreas, así como en la concentración de GSH y GSSG en el hepatopáncreas y en la hemolinfa en cada especie.

Caracterizar, para cada especie, la capacidad de sincronización de estos ritmos en dos condiciones de ciclos LO con distinta duración de la fotofase y diferente irradiancia.

Analizar las diferencias interespecíficas en los ritmos.

5. HIPÓTESIS

1.- Las especies de acocil *P. clarkii* y *P. digueti* presentarán ritmos circadianos en las enzimas y productos del sistema glutatión.

2.- Debido a las diferencias ecológicas y latitudinales de ambas especies, la manifestación y sincronización de los ritmos serán distintas. En condiciones de ciclos LO 12:12 que imitan una fotofase ecuatorial, las dos especies se sincronizarán tanto en baja como en alta irradiancia. En condición experimental LO 20:4 que imita una fotofase latitudinal, únicamente *P. clarkii* presentará ritmos capaces de sincronizarse. La alta irradiancia producirá un amortiguamiento en la amplitud de los ritmos.

3.- Las condiciones de alta irradiancia y fotofase larga producirán una mayor foto-oxidación, por lo que se espera que se incremente la actividad de las enzimas y cambios de las concentraciones de los sustratos/productos. Esto se reflejará en cambios en el mesor y en la amplitud de los ritmos de los parámetros del sistema glutatión.

6. OBJETIVOS

General:

Caracterizar los ritmos circadianos en el sistema glutatión de dos especies de acocil con diferente distribución latitudinal.

Particulares:

Describir los ritmos endógenos en la actividad enzimática de la GPx y de la GR en el hepatopáncreas, así como en la concentración de GSH y GSSG en el hepatopáncreas y en la hemolinfa en cada especie.

Caracterizar, para cada especie, la capacidad de sincronización de estos ritmos en dos condiciones de ciclos LO con distinta duración de la fotofase y diferente irradiancia.

Analizar las diferencias interespecíficas en los ritmos.

7. METODOLOGÍA

7.1 ANIMALES

Se utilizaron 150 acociles de la especie *Procambarus clarkii* y 150 de *Procambarus digueti*, procedentes de Chihuahua (Latitud 27°45' N) y Zamora, Michoacán (Latitud 19°98' N) respectivamente. Los animales, de ambos sexos, se encontraban en intermuda y eran de peso y talla homogénea.

Todos se aclimataron a las condiciones de laboratorio por lo menos durante dos semanas y se mantuvieron en ciclos de 24 h en 12:12 de baja irradiancia, (7:00 h encendido de la luz), con una temperatura de 20-22°C. Los animales estuvieron en acuarios con filtro biológico durante dos semanas antes de ser colocados en las condiciones experimentales.

7.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS LUMINOSOS

En las condiciones experimentales, la duración de la fotofase se fijó en 12 y 20 h. Lo anterior es el resultado de la siguiente consideración: que la fotofase del verano natural en la parte central de México es de 13 h y en Chihuahua es de 16 h, las 20 h de luz constituyen un fotoperiodo extremo de verano para ambas especies (Fanjul-Moles et al., 1998). Para cada fotofase se fijaron 2 diferentes valores de irradiancia: alta irradiancia de 2.826 Wm^{-2} que es un valor cercano al máximo observado para ambas especies al medio día, al que se le llamó alta irradiancia (AI) y baja irradiancia (BI) de 0.043 Wm^{-2} semejante al de las horas crepusculares. La condición LO 12:12 BI se consideró como control.

Se utilizaron lámparas de neón controladas por un "timer" con el encendido de luz a las 0700, la irradiancia se calibró con un fotoradiómetro con un sensor esférico submarino (Licor Models, Li 189, LI 193SA, Lincoln, Nebraska).

7.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se formaron 5 lotes experimentales de 30 animales de cada especie que se sometieron a las diferentes combinaciones de fotoperiodo e irradiancia durante 14 días (Tabla 3).

- 1) LO 12:12 (0.043 Wm⁻²) BI; condición control
- 2) LO 12:12 BI y después expuesto a oscuridad constante por 72 h;
- 3) LO 12:12 (2.8 Wm⁻²) AI;
- 4) LO 20:4 BI;
- 5) LO 20:4 AI.

Tabla 3. Diseño experimental de fotoperiodo e irradiancia.

<i>P. clarkii</i> (n)	<i>P. digueti</i> (n)	FOTOPERIODO	IRRADIANCIA
30	30	12:12	BI
30	30	0:24	OO
30	30	12:12	AI
30	30	20:4	BI
30	30	20:4	AI

En el día 15 se sacrificaron 5 animales cada 4 h, durante un ciclo de 24 h (0, 4, 8, 12, 16 y 20 h). Se extrajeron 100 µl de hemolinfa y el hepatopáncreas completo. La hemolinfa se colocó en ácido tricloroacético (TCA) al 10%, el hepatopáncreas se dividió en mitades colocando una mitad en 1 ml de buffer de fosfatos con EDTA, pH 8, y la otra mitad en 1 ml de TCA 10%, ambas partes se homogenizaron inmediatamente. Todas las muestras se congelaron de inmediato hasta el momento en que se realizaron los ensayos bioquímicos. La influencia de la foto oxidación sobre el sistema glutatión se evaluó relacionando los cambios en el valor de actividad promedio de las enzimas a lo largo del día, o bien en el valor de concentración de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG con las condiciones de luz.

7.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL SISTEMA GLUTATIÓN.

CONCENTRACIÓN DE GSH Y DE GSSG (Hissin y Hilf, 1976).

La determinación confiable de glutatión en muestras biológicas depende en gran medida del tratamiento apropiado para la muestra. Generalmente la concentración de GSSG es muy baja comparada a la de GSH. Para prevenir la oxidación artificial del GSH durante la manipulación de muestras se usan agentes como la N-etilmaleimida (NEM), 2-vinylpiridina (2-VP) o ácido iodoacético (IAA). Se prefiere al NEM debido a su velocidad de reacción (1 min. vs 20 a 60 del 2-VP o 15 min. del IAA).

El ácido tricloroacético (TCA), metafosfórico, sulfoacilico, pícrico y perclórico se utilizan en la precipitación de proteínas. La precipitación de proteínas por tratamiento con TCA y el atrapamiento del GSH con NEM se hizo en forma simultánea, truncando el metabolismo del GSSG y la autooxidación del GSH instantáneamente.

Las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 3 mil rpm durante 10 min a 4°C y se realizó la determinación respectiva.

Para la determinación de GSH se tomaron 50 µl de muestra, se añadió 100 µl OPT (preparada el día del ensayo) el volumen se llevó a 2 ml con buffer de fosfatos con EDTA pH 8, se incubó durante 15 min en oscuridad y se leyó en un fluorómetro calibrado previamente con una curva control de GSH elaborada el mismo día.

Para la determinación de GSSG se tomaron 50 µl de muestra a los que se añadió 20 µl de NEM (solución preparada el día del ensayo), y se incubó durante 30 min en oscuridad, después se añadió 100 µl OPT y el volumen se llevó a 2 ml con NaOH 0.1 M, se incubó durante 15 min en oscuridad y se leyó en un fluorómetro calibrado previamente con una curva control de GSSG elaborada el mismo día.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GR Y GPx (Bompert et al., 1990; Paglia y Valentine, 1969).

Glutación Reductasa: Se tomaron 30 μ l del de hepatopáncreas, se adicionaron 150 μ l de agua desionizada, como agente de trabajo 900 μ l de GSSG 0.44 mmol/l en buffer de fosfatos dipotásico 0.1 pH 7.0 EDTA 3 mmol/l y como agente de inicio 20 μ l NADPH 3.6 mmol/l en buffer de fosfatos dipotásico 0.1 pH 7.0 EDTA 3 mmol. Los agentes de trabajo y de inicio se prepararon siempre el mismo día del ensayo.

Glutación Peroxidasa: Se tomaron 30 μ l del hepatopáncreas, 3 ml de buffer de fosfatos dipotásico pH 7.4, 50 mmol/l; NaN_3 , 1 mM, y EDTA 1 mM y KCN, GSH 1mM; NADPH 0.2 mM y GR, 1u/ml unidades (10 mg/ml). Como agente de inicio se utilizaron 30 μ l perhidrol 0.25 mM.

Ambos ensayos se leyeron a 340 nm y la actividad de las dos enzimas se expresó como μ mol NADPH oxidado por gramo de proteína por minuto usando el coeficiente de extinción del NADPH de $6.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La concentración de proteínas se determinó de acuerdo al método de Bradford (1976).

7.5 ANÁLISIS DE DATOS

Con el objeto observar las variaciones temporales de la concentración de GSH, de GSSG y de la actividad enzimática en un ciclo de 24 h, se elaboraron cronogramas contruidos a partir del valor promedio de los 5 animales sacrificados por hora \pm error estándar.

Para estimar el ritmo circadiano se realizó un análisis de cosinor simple (Halberg et al, 1977; Nelson et al., 1979) con el programa DISPAC (Digital Analysis Applied to Chronobiology) desarrollado en el Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (Aguilar-Roblero, et al., 1997) y el programa COSENA (Ana Amelia Benedito Silva, version 3.1 1996). Usando un período de prueba (τ), el análisis de Cosinor ajusta los datos a una onda cosinusoidal y proporciona un dato objetivo al respecto de que la amplitud del ritmo es diferente de cero, además de proporcionar otros estimadores como son la acrofase, el mesor la amplitud y el porcentaje de ritmo (PR). La acrofase es el tiempo en el que se alcanza la cresta de la función de la curva que mejor ajusta. El mesor

(M) es el valor alrededor el cuál oscilan los datos, cuando el intervalo de muestreo es constante, M es igual a la media aritmética de la oscilación rítmica. La definición formal de M es la media ajustada del ritmo. El período es la duración de un ciclo completo de la oscilación y se expresa en unidades de tiempo y la amplitud (A) es igual a la mitad de la diferencia entre los valores máximos y mínimos de la oscilación; PR es el porcentaje de los datos incluidos en el límite de confianza de 95% de la función coseno con mejor ajuste (Reinberg and Smolensky, 1983). Se probaron diferentes períodos para el análisis temporal de las variable medidas.

Con el objetivo de comparar crestas y valles de las oscilaciones que no fueron significativas para Cosinor, se realizó la prueba de t de Student. En la descripción de resultados sólo se mencionan aquellos análisis que resultaron significativos con esta prueba.

Se computaron análisis de varianza de una y dos vías para determinar posibles diferencias estadísticas intra e interespecíficas entre los parámetros del ritmo (mesor).

Para determinar las características de sincronización de los ritmos para cada especie se utilizó estadística circular, la prueba de Rayleigh y la prueba de V. Estas pruebas arrojan evidencia significativa del agrupamiento de las fases hacia una dirección predeterminada (Batschelet, 1983). A partir de las acrofases (o momentos dados en un fenómeno cíclico) se calcula un vector medio (r) cuyo tamaño da una indicación de unidireccionalidad. Para muestras de una distribución uniforme, r es pequeña. Si r es suficientemente grande la hipótesis de que hay una distribución aleatoria puede ser rechazada a favor de una dirección de preferencia (prueba de Rayleigh). Cuando se espera que exista una dirección preferida (en este caso el encendido o apagado de la luz), se compara esta con r de los datos. Cuando los ángulos observados y los esperados son semejantes, u es cercana a 1, si son diferentes u será mucho menor a 1 (prueba de V).

En la figura 1 se resume el diseño experimental, el procesamiento de muestras y el análisis estadístico de los datos.

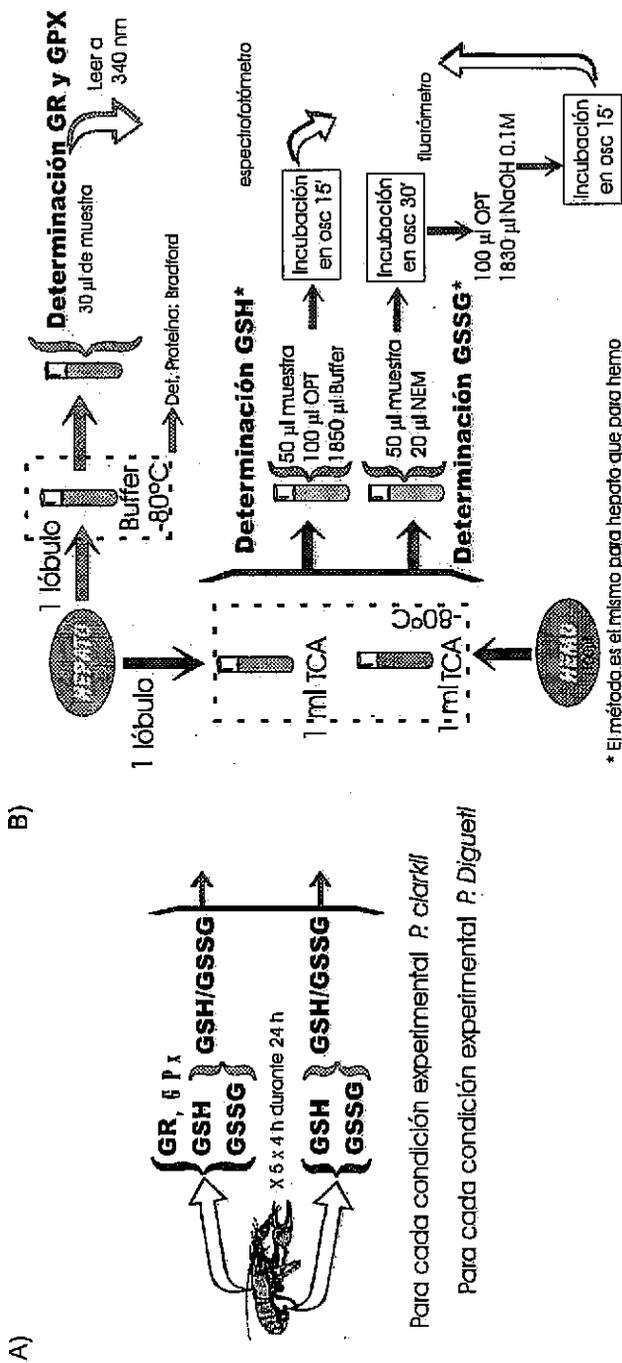


Figura 1.- A) Se sacrificaron 5 animales en 6 puntos temporales en un ciclo de 24 h en las condiciones control y las 4 condiciones experimentales en cada especie. B) Se extrajo el hepatopáncreas (hepato) y la hemolinfa (hemo). Se determinó actividad de GR y GPX en hepatopáncreas y en ambos tejidos se midió la concentración de GSH y de GSSG (ver texto). Se elaboraron cronogramas y se aplicó un análisis de Cosinor simple y t de Student. Una vez determinadas las acrofases se aplicaron pruebas de estadística circular para obtener evidencia estadística de que se agruparan alrededor de un ángulo determinado.

8. RESULTADOS

8.1 CAMBIOS CIRCADIANOS EN LOS PARÁMETROS DEL SISTEMA GLUTATIÓN DE *Procambarus clarkii*

Los cronogramas resultantes de los cambios temporales diarios de la actividad enzimática de la GR y de la GPx, así como el de las concentraciones de GSH y de GSSG y la relación GSH/GSSG en el hepatopáncreas en condiciones LO 12:12 con BI (control) y después de 72 h en oscuridad constante (OO) se muestran en la figura 2. En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis de Cosinor simple. En la condición control la actividad máxima de ambas enzimas se presentó durante la escotofase (GR, 00 h; GPx, 0400 h) (Fig. 2A). La GR osciló con un ritmo bimodal, mostrando un segundo pico a las 1200 h, en la fotofase; en tanto que la GPx osciló con un ritmo unimodal. El análisis de Cosinor reveló que las oscilaciones de ambas enzimas tuvieron ritmos significativos en LO (GR $\tau = 12$ h; GPx $\tau = 24$ h). Después de que los organismos se mantuvieron en 72 h en OO, el ritmo bimodal de GR persistió mostrando un aumento de actividad que se reflejó en el pico de las 1200 h y aumentó 1.7% por encima del valor encontrado en LO (Fig. 2D). El carácter circadiano de este ritmo se hizo evidente debido al cambio de fase del pico de las 00 h, que mostró un avance de fase de 4 h y cuyo valor aumentó 20% por encima del valor de LO. En estas condiciones se incrementó también el mesor del ritmo de la GPx aunque su oscilación se mostró amortiguada. Ambas tuvieron ritmos en OO que se ajustaron a $\tau = 24$ h, únicamente el ritmo de actividad de la GR fue significativo.

En LO las concentraciones de GSH y de GSSG mostraron oscilaciones amortiguadas, en las que el pico máximo de GSH a las 0800 ($1012.1 \pm 333.5 \mu\text{M}$) precedió al de GSSG a las 1600 ($347.1 \pm 33.83 \mu\text{M}$) (Fig. 2B). Sin embargo, después de 72 h en OO (Fig. 2E), el patrón rítmico cambió y las oscilaciones se hicieron más evidentes mostrando una relación en espejo. El zenit de la oscilación de la concentración de GSH a las 00 h coincidió con el nadir de la oscilación del GSSG. El análisis de Cosinor sugirió que el ritmo de GSH calculado para los animales en LO presentó un ritmo diario con $\tau = 24$ h (PR 40.3%, acrofase a las 18.31 h), mientras que los animales en oscuridad constante presentaron un ritmo bimodal con $\tau = 12$ h (PR 43.7%, acrofase a las 2.61 h).

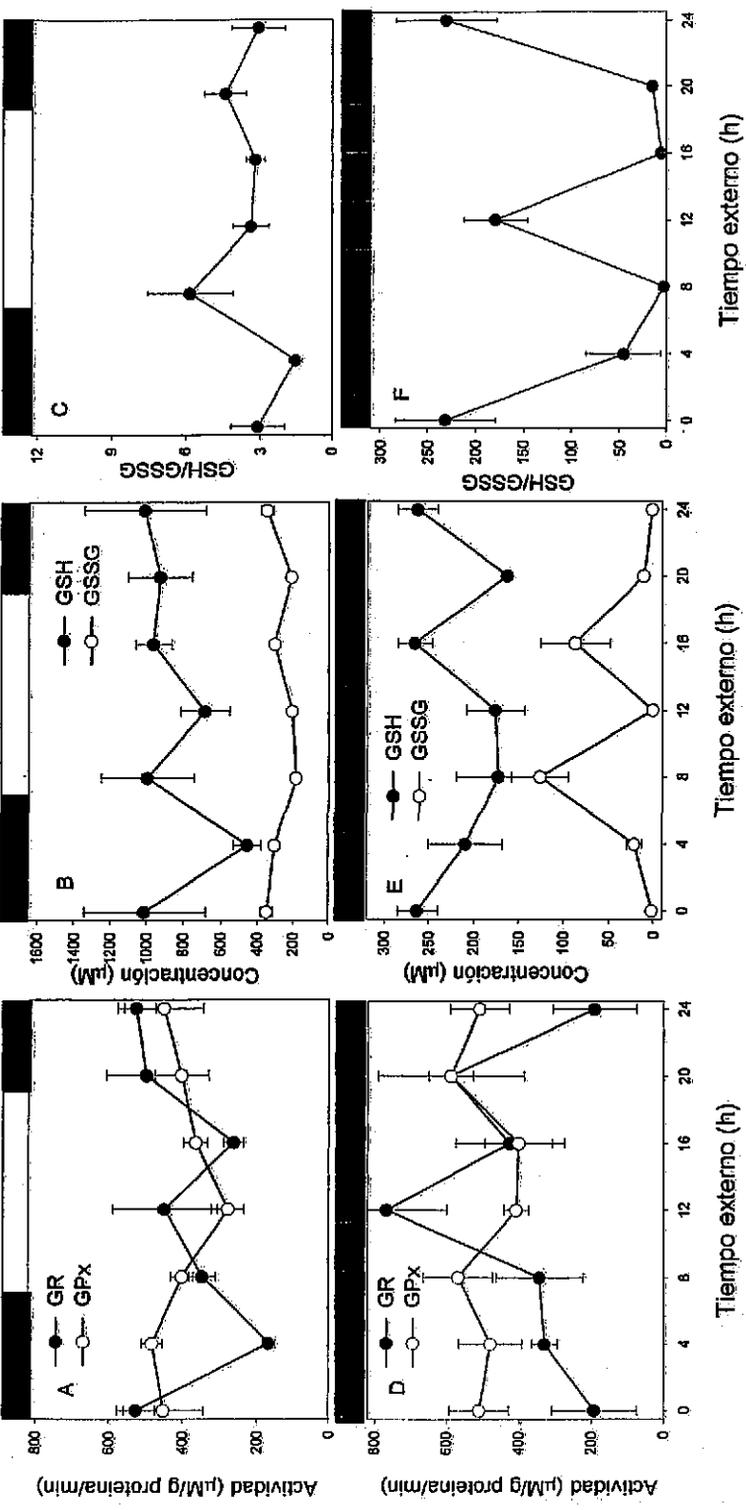


Figura 2.- Hepatopáncreas de *P. clarkii*. Cronogramas de la (A) actividad de las enzimas GR y GPx, (B) concentración de GSH y GSSG y (C) la relación GSH/GSSG (C) en LO 12:12 con BI y después de 72 h en OO (D-F).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Por el contrario, las oscilaciones de GSSG presentaron ritmos bimodales tanto en LO como en OO (PR 47.6%, acrofase en 2.4 h; PR 38.5%, acrofase 6.47 h, respectivamente). La relación GSH/GSSG osciló con $\tau = 12$ h tanto en LO como en OO (PR 69.5%, acrofase a las 8.7 h; PR 64.3%, acrofase a las 0.02 h, respectivamente) enfatizando la oscilación bimodal de estos parámetros (Fig. 2C y F). Las oscilaciones de la relación GSH/GSSG se encontraron significativas para el Cosinor.

En la figura 3 se presentan los cronogramas de la concentración de GSH y de GSSG y la relación GSH/GSSG en la hemolinfa. En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis de Cosinor simple. Estas variables fluctuaron con oscilaciones bimodales diarias tanto en LO como en OO. Los cronogramas de la concentración de GSH y de GSSG (Fig. 3A y C) muestran la relación temporal de estas oscilaciones en ambas condiciones experimentales. El análisis de Cosinor sugirió que la concentración de GSH posee ritmos con $\tau = 12$ h en LO y en OO (PR 66.4%, acrofase a las 3.03 h, PR 40.7%, acrofase a las 7.2 h respectivamente), en tanto que para la concentración de GSSG, en LO se encontró que $\tau = 24$ h y en OO $\tau = 12$ h (PR 58.5%, acrofase a las 5.24 h, PR 37.5%, acrofase a las 6.9 h, respectivamente).

En condiciones de luz-oscuridad, la relación GSH/GSSG osciló de forma amortiguada, mientras que en condición de oscilación espontánea mostró una oscilación robusta con un patrón unimodal (Fig. 3B y D). El análisis de Cosinor sugirió para la relación GSH/GSSG en LO una $\tau = 12$ h y para OO una $\tau = 24$ h (PR 40.2%, acrofase a la 1.79 h, PR 97.5%, acrofase a las 2.9 h, respectivamente).

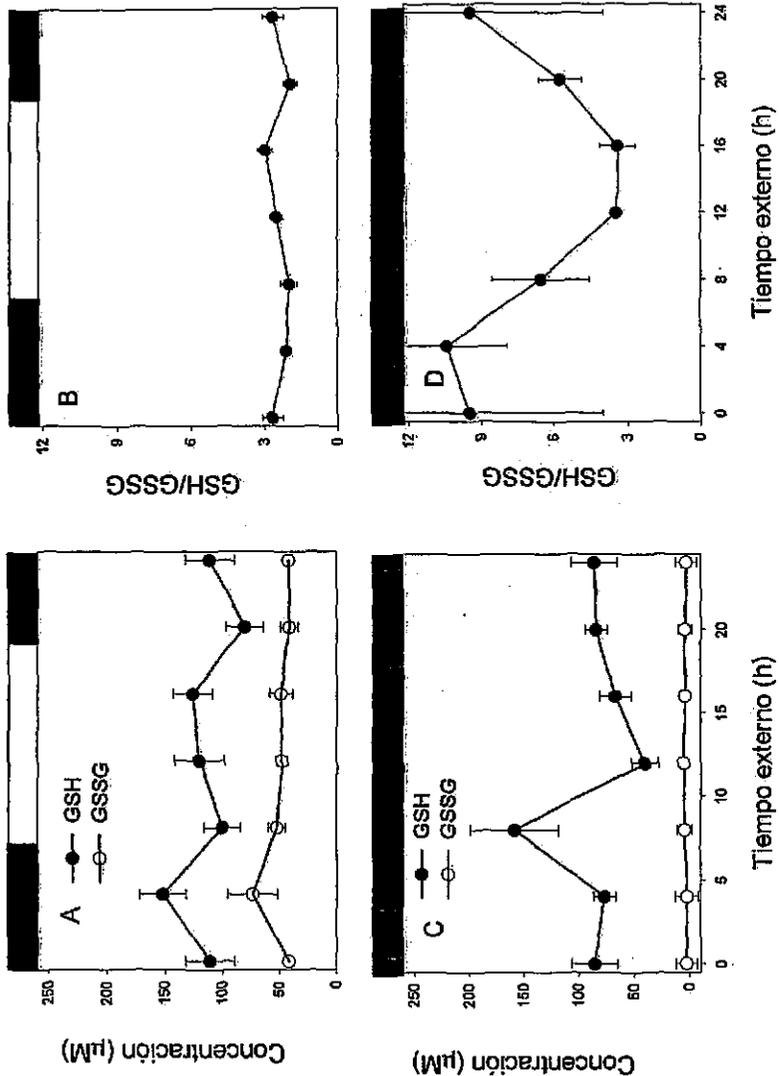


Figura 3. Hemolinfa de *P. clarkii*. Cronogramas de (A) la concentración de GSH y GSSG, y (B) la relación GSH/GSSG en LO 12:12 con BI, y después de 72 h OO (C-D)

8.2. EFECTOS DEL INCREMENTO EN LA IRRADIANCIA Y FOTOPERIODO SOBRE LOS RITMOS EN *Procambarus clarkii*.

Hepatopáncreas. En LO 12:12 con AI, ambas enzimas presentaron ritmos unimodales y en fase (Fig. 4A). Cosinor reveló un ritmo significativo de actividad de GR (Tabla 1). En el fotoperiodo de 20 h, este ritmo se mantuvo unimodal en tanto que el de actividad de la GPx se mostró bimodal. Estos ritmos, no fueron significativos en el análisis de Cosinor (Fig. 4D); sin embargo, la prueba de t de Student encontró diferencias significativas entre la cresta y valle del ritmo en la actividad de ambas enzimas (GR $t = 5.9$, $P < 0.05$ y GPx $t = 3.3$, $P < 0.05$). En el fotoperiodo de 20 h con AI, ambas enzimas presentaron ritmos bimodales y en fase (Fig. 4G). La primera cresta se presentó en el escotoperiodo a las 0400 h y la segunda a las 2000 h, 12 h después del encendido de la luz. El análisis de Cosinor no reveló ritmos significativos, pero la prueba de t de Student mostró diferencias significativas entre la cresta y valle del ritmo de actividad de la GPx ($t = 2.41$, $P < 0.05$). El ritmo de la concentración del GSH se mantuvo unimodal con cambios en el mesor, y la concentración del GSSG presentó una oscilación amortiguado con valores de mesor y de amplitud semejantes a la condición control (Fig. 4B, E y H). El fotoperiodo de 20 h con BI y AI produjo adelantos en la acrofase del GSH, mientras que el GSSG la mantuvo cerca de las 0400 h. El análisis de Cosinor reveló que la oscilación de la concentración de GSH en estas condiciones fue significativa con $\tau = 24$ h (PR 89.8%, 79% y 90.5%). La prueba de t de Student mostró diferencias significativas entre la cresta y valle del ritmo de la concentración de GSSG ($t = 3.9$, $P < 0.05$).

La relación GSH/GSSG presentó un ritmo unimodal en las condiciones experimentales (Fig. 4C, F e I). El análisis de Cosinor mostró que la oscilación en LO 20:4 con AI fue significativa ($\tau = 24$ h, PR 79.7% acrofase a las 16.16 h) (Tabla 1). La prueba de t de Student reveló diferencias significativas entre la cresta y valle del ritmo de la relación GSH/GSSG ($t = 2.75$, $P < 0.05$) en LO 20:4 con BI.

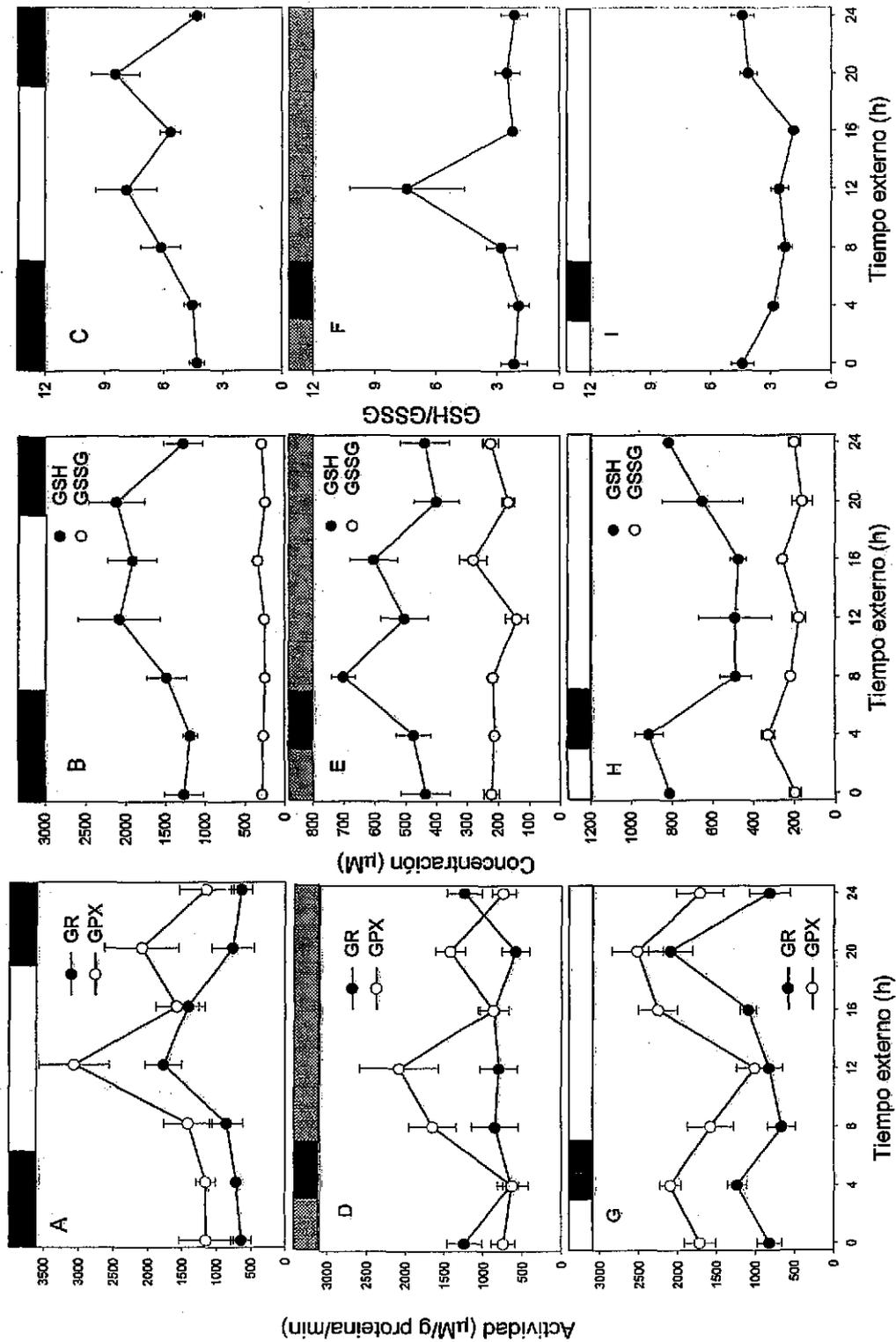


Figura 4.- Hepatopáncreas de *P. clarkii*. Cronogramas de la actividad de las enzimas GR y GPX, concentración de GSH y GSSG y relación GSH/GSSG en los ciclos LO 12:12 con AI (A-C), 20:4 con BI (D-E) y 20:4 con AI (G-I).

*Hemolinf*a. En el LO 12:12 con AI las concentraciones del GSH y del GSSG mantuvieron ritmos bimodales significativos, incrementándose el PR de estos ritmos (GSH $\tau = 12$ h, PR 58.9%, $F = 19.9$, $P < 0.05$; GSSG $\tau = 12$ h, PR 50.8%, $F = 25.19$, $P < 0.05$) (Fig. 5A). Esta condición afectó al ritmo de la relación GSH/GSSG, el cuál se encontró amortiguado con decremento del mesor y de la amplitud (Fig. 5B)(Tabla 1).

En la condición LO 20:4 con BI la concentración de GSH y de GSSG presentaron ritmos significativos unimodales y bimodales (Fig. 5C) (GSH $\tau = 24$ h, PR 82.2%, $F = 48.47$, $P < 0.05$; GSSG $\tau = 12$ h, PR 79%, $F = 39.46$, $P < 0.05$). La relación GSH/GSSG osciló con un ritmo unimodal (Fig. 5D), no significativo para el Cosinor, pero sí para la prueba de *t* de Student que reveló diferencias significativas entre la cresta y valle del ritmo ($t = 3.8$, $P < 0.05$).

En la condición LO 20:4 con AI las concentraciones del GSH y del GSSG mostraron ritmos bimodales y unimodales, en antifase (Fig. 5E), mientras que la relación GSH/GSSG mostró un ritmo bimodal estadísticamente significativo (Fig. 5F). La prueba de *t* de Student mostró diferencias significativas entre la cresta y valle de los ritmos de la concentración del GSH ($t = 2.63$, $P < 0.05$) y del GSSG ($t = 2.3$, $P < 0.05$).

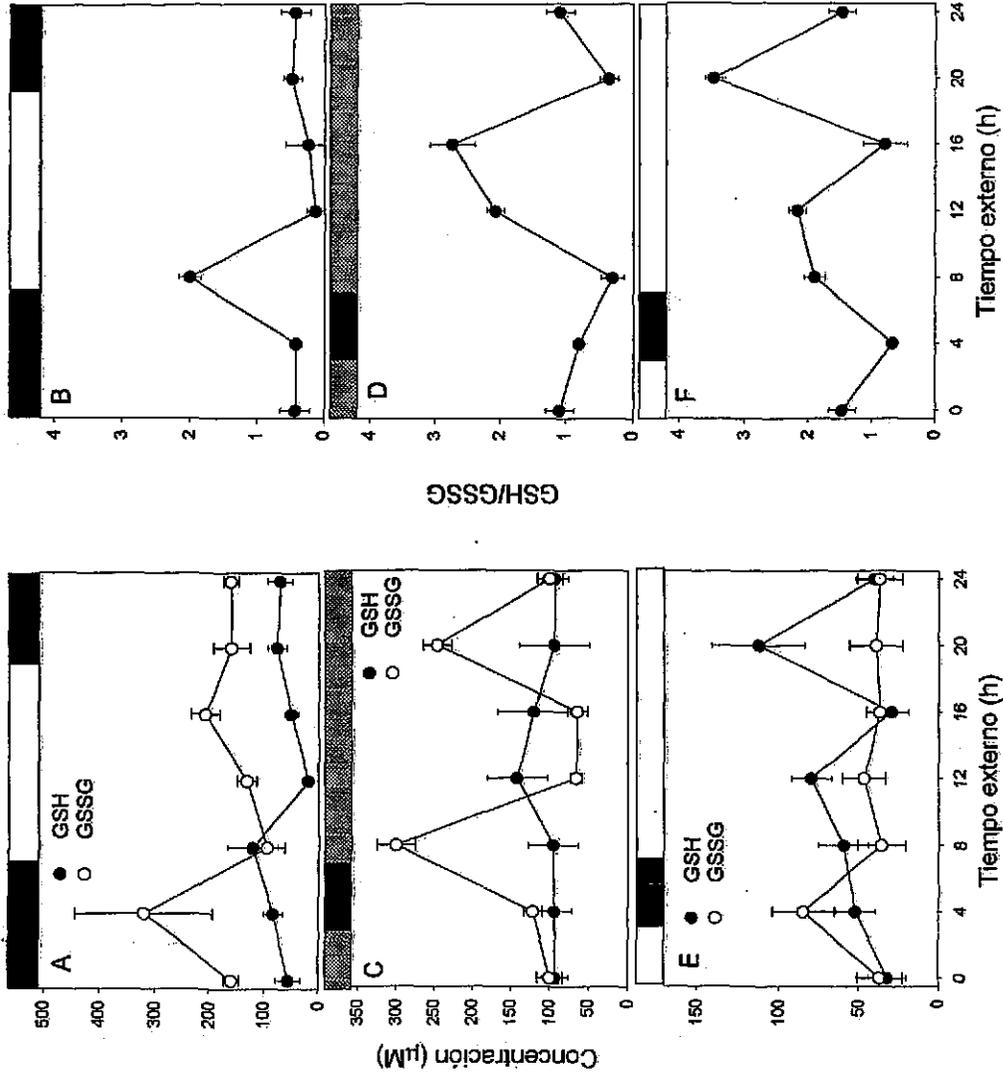


Figura 5.- Hemolinfa de *P. clarkii*. Cronogramas de la concentración de GSH y GSSG y relación GSH/GSSG en los ciclos LO (A-B) 12:12 con AI, (C-D) 20:4 con BI y (E-F) 20:4 con AI.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TABLA 1. Resultados del análisis de Cosinor simple de los cronogramas de la actividad de GR and GPx y de concentración de GSH, GSSG y relación de GSH/GSSG en hepatopáncreas y hemolinfa de *P. clarkii* bajo las condiciones control y experimentales.

	Variable	Periodo (h)	Mesor (mM)	Amplitud (mM)	Acrofase (h)	PR (%)		
H E P A T O P A N C R E A S	12:12 BI	GR*	12	375.4 ± 13.11	118.9	10.58 ± 0.4	66.2	
		GPx†	24	405.89 ± 13	70.3	3.3 ± 0.76	84.4	
		GSH	24	841.3 ± 27.29	145.23	18.31 ± 0.42	40.3	
		GSSG	12	269.21 ± 7.87	48.58	2.4 ± 0.34	47.6	
		GSH/GSSG**	12	3.55 ± 0.118	1.1	8.7 ± 0.5	69.5	
		72 h OO	GR***	24	441.93 ± 17.78	182.61	13.79 ± 0.29	71.5
			GPx	24	0.49 ± 0.03	59.3	8 ± 0.76	57
			GSH	12	210.64 ± 39.97	30.59	2.61 ± 0.23	43.7
			GSSG	12	40.73 ± 6.27	34.18	6.47 ± 0.5	38.5
			GSH/GSSG ††	12	68.1 ± 9.38	81.67	0.02 ± 0.43	64.3
C R E A S	12:12 AI	GR ‡	24	1.03 ± 0.22	516	12.88 ± 0.3	88	
		GPx	24	1.74 ± 0.36	625	13.67 ± 0.63	64.0	
		GSH††	24	1639.64 ± 207.03	446.47	15.44 ± 0.28	89.8	
		GSSG	12	271.08 ± 17.8	21.36	2.9 ± 0.5	41.2	
		GSH/GSSG	24	6.16 ± 1.73	0.63	15.52 ± 0.49	51.0	
		20:4 LI	GR	12	0.813 ± 0.11	117	0.13 ± 0.51	39.3
			GPx	24	1.208 ± 0.23	437	11.84 ± 0.76	54.6
			GSH §	24.5	515.70 ± 56.23	94.9	7.87 ± 0.58	79
			GSSG	12	201.35 ± 24.18	27.39	4.35 ± 0.76	39.8
			GSH/GSSG	24	3.17 ± 1.05	1.71	12.12 ± 0.39	62.5
H E M O L I N F A	20:4 HI	GR	24	1.08 ± 0.2	377	20.22 ± 0.76	54	
		GPx	24	1.86 ± 0.24	429	21.03 ± 0.71	57.1	
		GSH	24	633.18 ± 94.52	204.55	3.5 ± 0.26	90.5	
		GSSG	12	216.45 ± 30.18	48.19	4.14 ± 0.31	63.5	
		GSH/GSSG ¶	24	2.98 ± 0.51	1.03	16.14 ± 0.25	79.7	
		12:12 BI	GSH::	12	114.37 ± 2.11	19.21	3.03 ± 0.4	66.4
			GSSG	24	50.83 ± 1.26	9.69	5.24 ± 0.39	58.5
			GSH/GSSG	12	2.35 ± 0.05	0.24	1.79 ± 0.42	40.2
		72 h OO	GSH	12	85.5 ± 4.42	28.6	7.2 ± 0.3	40.7
			GSSG	12	14.12 ± 0.57	2.8	6.9 ± 0.33	37.5
		GSH/GSSG:::	24	6.4 ± 9.38	3.8	2.4 ± 0.41	97.5	
N I N F A	12:12 HI	GSH†*	12	69.92 ± 15	34.15	6.47 ± 0.45	58.9	
		GSSG ‡*	12	178.63 ± 35	83.66	3.88 ± 0.33	50.8	
		GSH/GSSG	24	0.62 ± 0.47	0.47	6.77 ± 0.55	48.4	
		20:4 LI	GSH §*	24	106.27 ± 17	21.37	13.3 ± 0.38	82.2
			GSSG ¶*	12	149.51 ± 37	84.57	7.87 ± 0.21	79
			GSH/GSSG	24	1.22 ± 0.34	0.76	14.92 ± 0.43	57.5
		20:4 HI	GSH	12	62.27 ± 12	18.76	8.8 ± 0.46	44.8
			GSSG	24	46.72 ± 8	15.3	4.3 ± 0.76	54.4
			GSH/GSSG ¶*	11.5	1.75 ± 0.46	0.964	9.7 ± 0.18	64.7

Los valores son medias ± ES. Los símbolos marcan cuando la amplitud difiere significativamente de cero ($P < 0.05$): * F = 20.57; † F = 20.57; ** F = 23.93; *** F = 26.37; †† F = 23.93; ‡ F = 77.21; ††† F = 92.76; § F = 99.17; ¶ F = 99.07; ¶¶ F = 41.11; :: F = 20.73; ::: F = 409.28; †* F = 19.9; ‡* F = 25.19; §* F = 48.47; ||* F = 39.56; ¶* F = 23.49.

8.3 CAMBIOS CIRCADIANOS EN LOS PARÁMETROS DEL SISTEMA GLUTATIÓN DE *Procambarus digueti*

En la figura 6 se presentan los cronogramas resultantes de los cambios temporales diarios en la actividad enzimática de la GR, GPx, la concentración de GSH, del GSSG y la relación GSH/GSSG, en hepatopáncreas.

En la condición LO 12:12 con BI (control) la actividad máxima de ambas enzimas se presentó en el escotoperiodo (GR 0400 h; GPx 0000 h) (Fig. 6A). La actividad de la GR osciló de manera bimodal con una segunda cresta a las 1200 h, en cambio la de la GPx muestra una oscilación unimodal. Después de permanecer durante 72 h en OO, la actividad de la GR se presenta unimodal, con la cresta a las 1600 h, un valor del doble del encontrado en LO. La actividad de la GPx presentó un evidente ritmo unimodal con el zenit a las 1200 h y el nadir a las 2400 h; en este caso, el mesor de la oscilación se duplicó (Fig. 6D).

Las concentraciones del GSH y del GSSG presentaron oscilaciones bimodales en LO con los picos a las 0400 y 2000 h (Fig. 6B). En OO la concentración del GSH mostró un ritmo unimodal con el valor máximo a las 0400 h y la del GSSG mantuvo el carácter bimodal con los picos máximos a las 0400 y 2000 h. (Fig. 6E). Esto originó que la relación GSH/GSSG se mostrara bimodal en LO y OO (Fig. 6C y F) con los picos a las 1200 y 2000 en LO y 12-1600 y 0000 h en OO.

En la figura 7 se presentan los cronogramas resultantes de los cambios temporales en la concentración de GSH, de GSSG y de la relación GSH/GSSG en la hemolinfa. El GSH presentó oscilaciones bimodales en LO y en OO con los picos a las 0400 y 2000 h (Fig. 7A y C) duplicando el valor de mesor y triplicando la amplitud. La concentración del GSSG mostró un ritmo con carácter bimodal en LO y OO, con los máximos en LO a las 1200 y 2000 h; y en OO a las 00 y 1600 h. La relación GSH/GSSG se presentó unimodal en LO con la acrofase en la escotofase (0400 h) y bimodal en OO con máximos a las 0800 y 1600 h. También en este ritmo se incrementa el mesor.

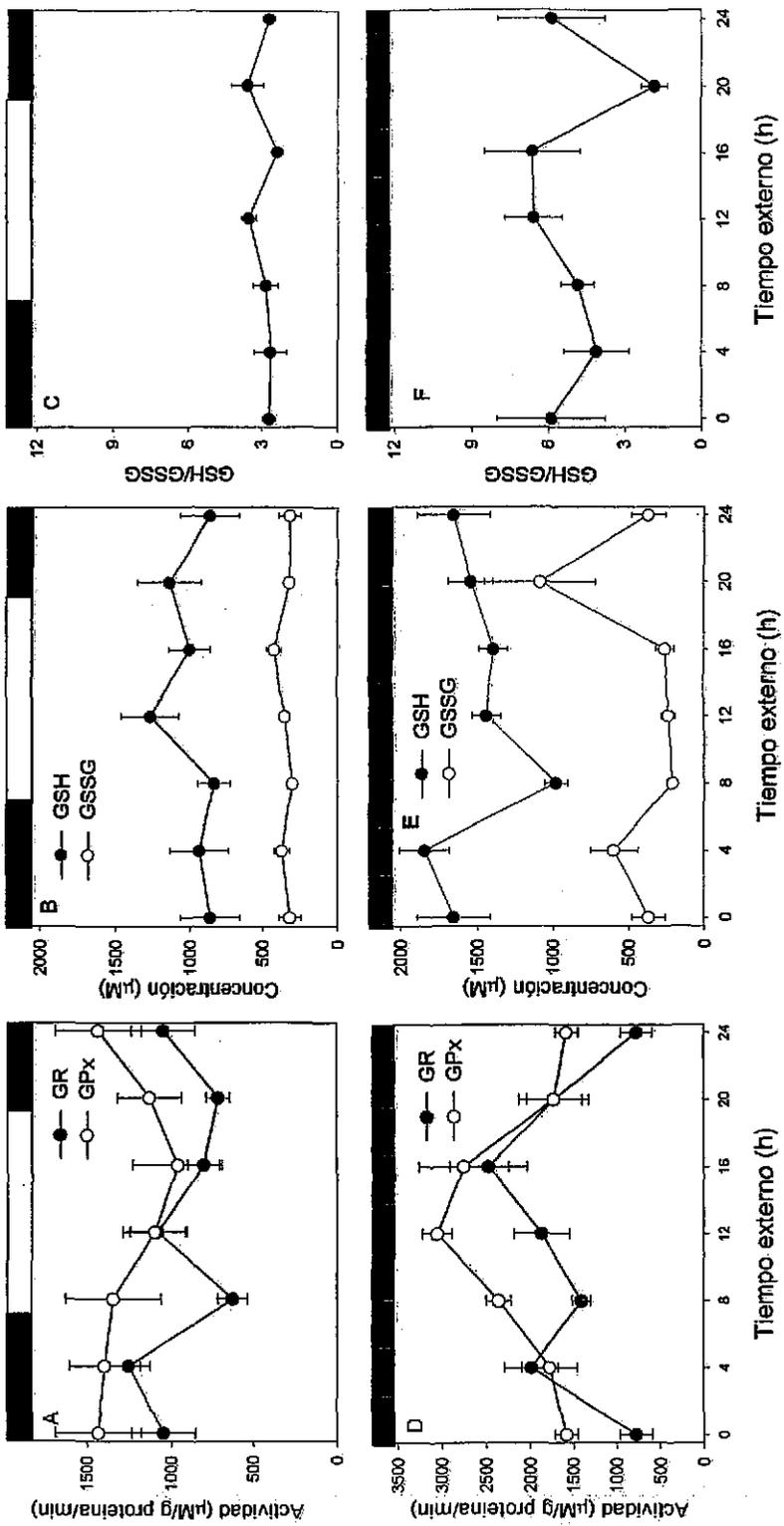


Figura 6. Hepatopáncreas de *P. digueti*. A) Actividad de las enzimas GR y GPx, B) Concentración de GSH y GSSG y C) de la relación GSH/GSSG en condiciones de LO 12:12 con 0.043 Wm² y después de 72 h en OO (D-F).

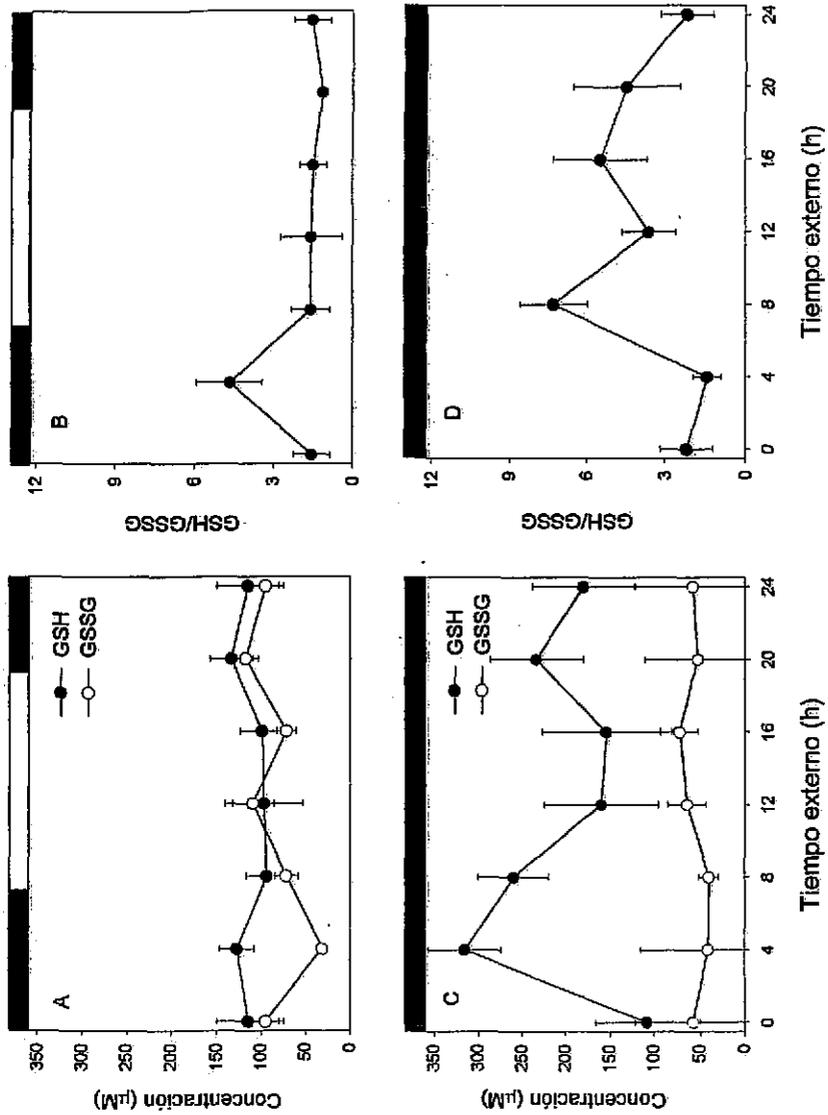


Figura 7. Hemolinfa de *P. digueti*. Cronogramas de A) concentración de GSH y GSSG y B) la relación GSH/GSSG en condiciones de LO 12:12 con BI y después de 72 h en OO (C y D).

El análisis de Cosinor reveló que únicamente el ritmo de la actividad de la GPx se ajustó a $\tau = 24$ h con una amplitud significativa (PR = 73%, F = 28.8). Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 2.

8.4. EFECTOS DEL INCREMENTO EN LA IRRADIANCIA Y FOTOPERIODO SOBRE LOS RITMOS EN *Procambarus digueti*

En la figura 8 y en la 9 se comparan los efectos del incremento en la irradiancia y del fotoperiodo sobre los ritmos del sistema glutatión en hepatopáncreas y en hemolinfa.

En la Tabla 2 se presentan los resultados del análisis de Cosinor de las condiciones LO 12:12 con AI, LO 20:4 con BI y LO 20:4 con AI.

Hepatopáncreas. En condición LO 12:12 con AI, la oscilación de actividad de la GR mostró un patrón bimodal mientras que la de la GPx lo mostró unimodal, ambas oscilaciones presentaron la cresta durante el fotoperiodo (14 y 16 h, respectivamente)(Fig. 8A). A pesar de que estos ritmos presentaron PR altos, estos no fueron significativos para Cosinor (GR PR=51.2% y GPx PR= 64.2%)(Tabla 2).

En el fotoperiodo de 20 h con BI y AI ambas enzimas mostraron oscilaciones en fase, con las acrofases en el fotoperiodo. Hay un aumento en la amplitud y del PR al compararlo con las condiciones experimentales anteriores (GR PR=92.4% y 89.4; GPx PR=96.7% y 71%, respectivamente) (Fig. 8 D y G).

En LO 12:12 con AI la concentración del GSH y la del GSSG presentaron oscilaciones bimodales y unimodales, (Fig. 8B) con valores semejantes a los de la condición control, aunque no estadísticamente significativos para Cosinor. Sin embargo, la prueba de t de Student reveló diferencias significativas entre cresta y valle de la oscilación de la concentración del GSH ($t=5.24$, $P<0.05$).

En las condiciones de fotoperiodo de 20 h con BI (Fig 8E), las dos formas de glutatión presentaron oscilaciones amortiguadas no significativas. En la condición LO 20:4 con AI, tanto como el GSH como el GSSG presentaron oscilaciones robustas con acrofases cercanas y el mayor PR de todas las condiciones experimentales (GSH PR=93.9%, acrofase a las 23.66 h y GSSG PR= 71.3%, acrofase a las 0.7 h) (Fig 8H) (Tabla 2).

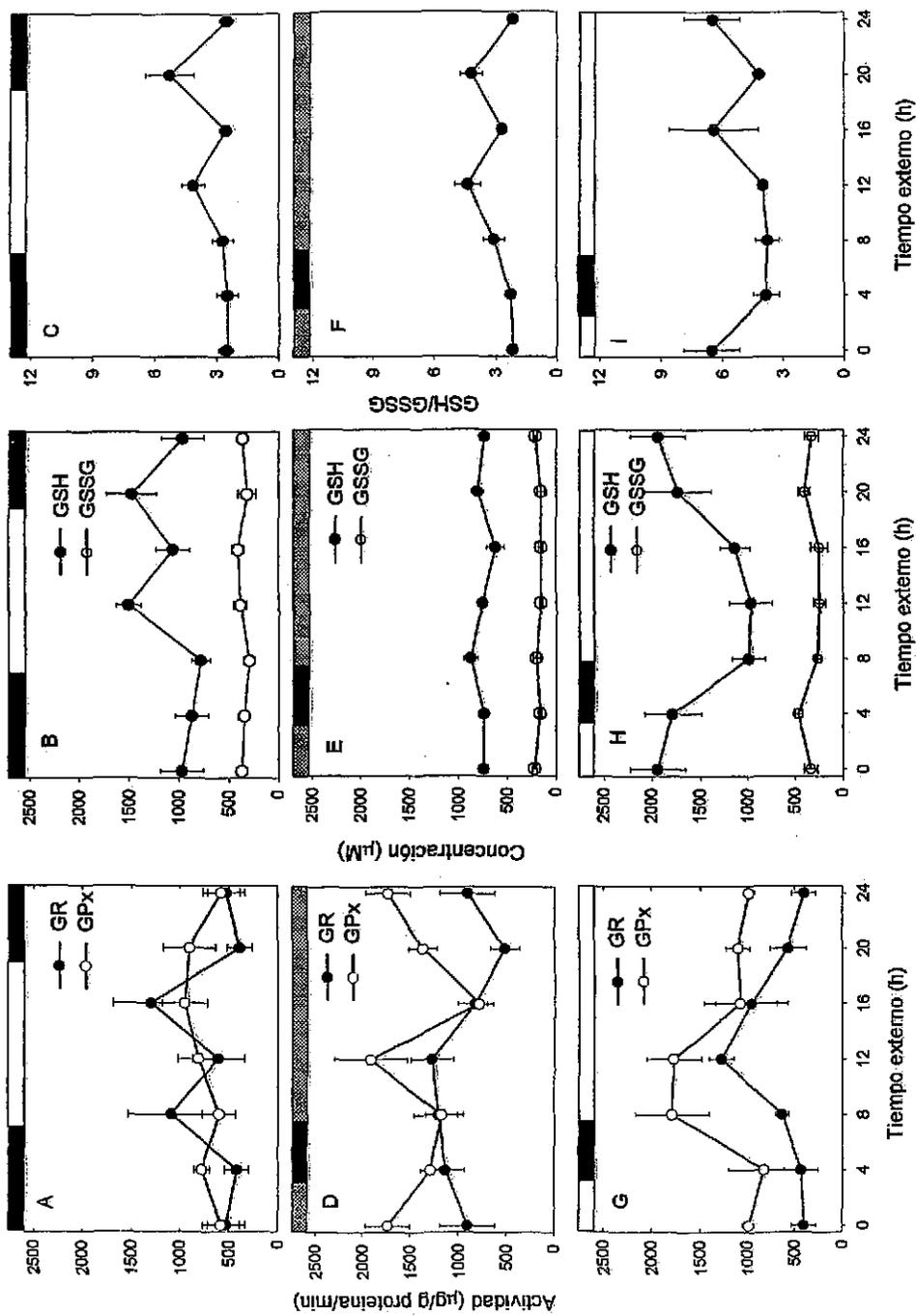


Figura 8.- Hepatopáncreas de *P. digueti*. Cronogramas de la actividad de las enzimas GR y GPx, de la concentración de GSH y GSSG y relación GSH/GSSG en 12:12 con AI (A-C), 20:4 con BI (D-F) y con AI (G-I)

La relación GSH/GSSG mostró un ritmo bimodal que mantuvo las crestas a las 1200 y a las 2000 h en LO 12:12 con AI y en 20:4 BI (Fig. 8B y F). En LO 20:4 con AI el ritmo de la relación GSH/GSSG presentó un adelanto de fase de 4 h. Aunque este ritmo no fue significativo para Cosinor pero si lo fue para la prueba de t de Student (12:12 con AI $\tau=2.48$, $P<0.05$, y 20:4 con BI $\tau=3.85$, $P<0.05$).

Hemolinfa. Las oscilaciones de la concentración de ambas formas de glutatión fueron bimodales tanto en LO 12:12 con AI como en LO 20:4 con BI (Fig. 9A y C). En LO 20:4 con AI estas oscilaciones fueron unimodales. El análisis de Cosinor reveló ritmos significativos con $\tau = 12$ h y 24 h (Tabla 2). La relación GSH/GSSG presentó un ritmo unimodal tanto en LO 12:12 con AI como en LO 20:4 con BI (Fig. 9B y D), en esta última condición el ritmo se ajustó a $\tau = 24$ h y PR = 99.4% (Tabla 2). Nótese que en LO 20:4 con AI esta oscilación se amortiguó hasta desaparecer (Fig. 9 F). En esta condición los valores de GSSG están por arriba de los valores de GSH, lo que resulta en que la relación GSH/GSSG presentó una amplitud mínima (Tabla 2).

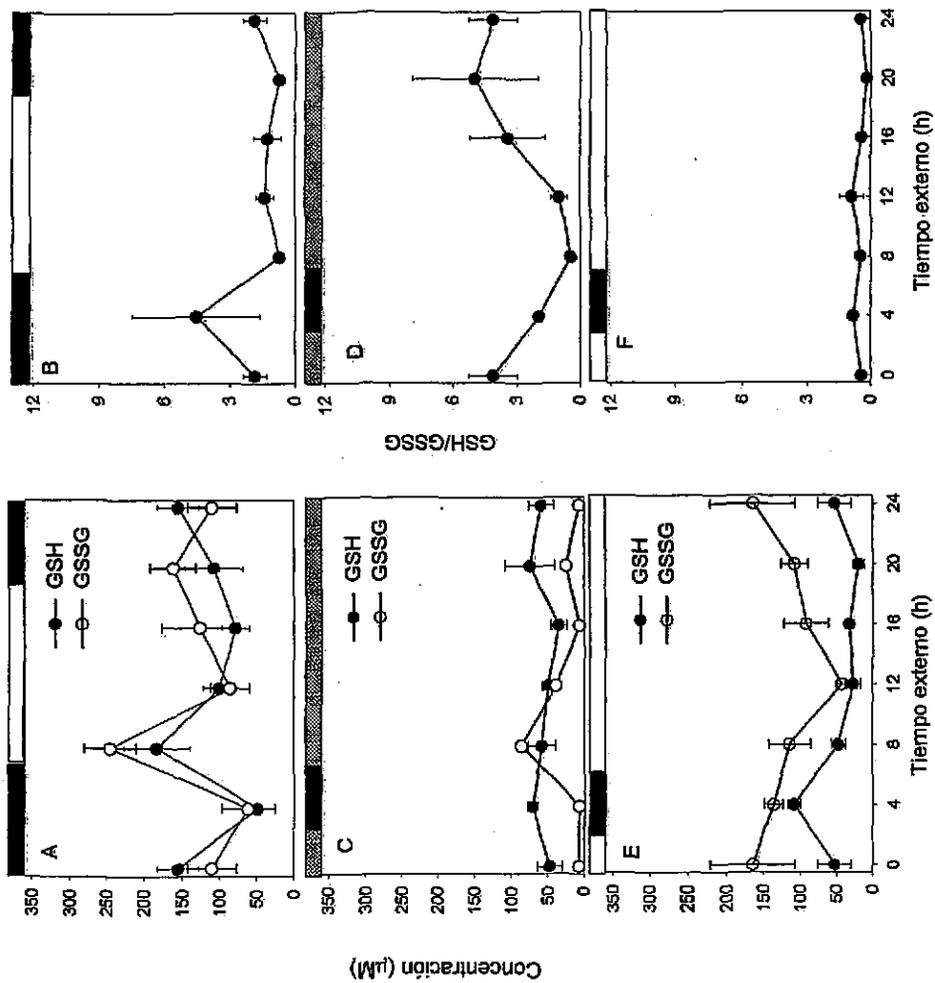


Figura 9.- Hemolinfa de *P. digueti*. Cronogramas de la concentración de GSH y GSSG y relación GSH/GSSG en 12:12 con AI (A-B), 20:4 con BI (C-D) y con AI (E-F)

TABLA 2. Resultados del análisis de Cosinor simple de los cronogramas de la actividad de GR and GPx y de concentración de GSH, GSSG y relación de GSH/GSSG en hepatopáncreas y hemolinfa de *P. digueti* bajo las condiciones control y experimentales.

	Variable	Periodo (h)	Mesor (mM)	Amplitud (mM)	Acrofase (h)	PR (%)	
12:12 BI	GR	12	0.91 ± 0.10	482.53	1.8 ± 0.33	60.7	
	GPx §	24	1.22 ± 0.85	336	0.8 ± 0.16	74.0	
	GSH	24	1000.04 ± 74.2	131.0	15.55 ± 0.68	61.3	
	GSSG	12	348.32 ± 20.1	36.97	3.5 ± 0.31	66	
	GSH/GSSG	12	2.96 ± 0.22	0.268	9.88 ± 0.4	40.0	
72 OO	GR	24	1.70 ± 0.10	418.26	12.3 ± 0.8	51.7	
	GPx	24	2.18 ± 0.39	698	13.8 ± 0.15	96.2	
	GSH	24	1464.13 ± 107.3	221.32	23.43 ± 0.78	53.4	
	GSSG	24	438 ± 151.15	239.0	21.9 ± 0.73	56.0	
	GSH/GSSG	24	4.92 ± 0.8	1.04	11.24 ± 0.31	36.4	
H E P A T O P A N C R E A S	12:12 AI	GR	24	0.72 ± 0.16	189.26	14.1 ± 0.83	51.2
	GPx	24	0.77 ± 0.69	134.7	16 ± 0.9	64.2	
	GSH	24	1111.26 ± 138	242.27	16.6 ± 0.66	61.3	
	GSSG	12	358.19 ± 18	30.47	1.99 ± 0.41	50.3	
	GSH/GSSG	24	3.28 ± 0.5	0.74	17.5 ± 0.2	40.9	
C O N T R O L	20:4 BI	GR †	24	0.977 ± 0.12	321.28	3.47 ± 3.06	92.4
	GPx ‡	24	1.37 ± 0.18	217	8.1 ± 0.23	96.7	
	GSH	12	757.51 ± 38	59.75	8.8 ± 0.35	58.7	
	GSSG	12	176.1 ± 12	18.5	3.3 ± 0.8	38.3	
	GSH/GSSG	24	3.12 ± 0.4	0.68	14.41 ± 0.45	54.	
E X P E R I M E N T A L	20:4 AI	GR ¶	24	0.71 ± 0.15	365.187	13.16 ± 0.75	89.4
	GPx ††	24	1.25 ± 0.18	385	10 ± 0.53	71	
	GSH	24	1426.08 ± 195	505.86	23.66 ± 0.15	96.9	
	GSSG ¶¶	24	327.08 ± 41	79.86	0.7 ± 0.53	71.3	
	GSH/GSSG	24	4.78 ± 0.6	0.85	20 ± 0.54	46.1	
H E M O L I N F A	12:12 BI	GSH †*	12	110.214 ± 7.15	15.78	23.4 ± 0.51	75.9
	GSSG	24	81.24 ± 14.31	22.7	17.2 ± 0.85	47.1	
	GSH/GSSG	24	2.01 ± 0.58	1.07	4.47 ± 0.31	60.1	
H E M O L I N F A	72 OO	GSH	24	207.57 ± 28.62	48.34	5.23 ± 1	40.7
	GSSG ‡*	24	106.97 ± 43.82	88.71	2.39 ± 0.5	73.3	
	GSH/GSSG	24	3.81 ± 1.2	1.36	13.2 ± 0.55	45.2	
O L I M P O	12:12 AI	GSH ††*	12	112.28 ± 14	36.61	9.71 ± 0.3	66.4
	GSSG ††*	12	131.73 ± 18	48.62	8 ± 0.3	67.1	
	GSH/GSSG	24	1.76 ± 0.13	1.006	3.5 ± 0.21	51.1	
N E F R O N O	20:4 BI	GSH	24	58 ± 6	9.8	5.23 ± 0.95	43.2
	GSSG §*	24	58.89 ± 24	45.57	2.39 ± 0.53	71.2	
	GSH/GSSG *	24	2.62 ± 0.8	2.12	20.75 ± 0.04	99.4	
A M O N I O	20:4 AI	GSH ¶*	24	48.15 ± 14	30	4.2 ± 0.48	75.2
	GSSG §§*	24	109.75 ± 18	47.28	1.08 ± 0.25	91.3	
	GSH/GSSG*	24	0.54 ± 0.13	0.21	8.1 ± 0.46	55.1	

Los valores son medias ± ES. Los símbolos marcan cuando la amplitud difiere significativamente de cero ($P < 0.05$): § F = 254.47; || F = 264.34; † F = 126.8; ‡ F = 29.91; ¶ F = 88.68; †† F = 26.12; ||| F = 31.83; ¶¶ F = 26.11; †* F = 33.11; ‡* F = 28.85; ††* F = 20.7; ††* F = 21.42, §* F = 25.92; ||* F = 98.63; ¶* F = 31.83; §§* F = 110.4.

8.5 DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS

8.5.1 DIFERENCIAS EN MESOR, AMPLITUD Y PORCENTAJE DE RITMO

La figura 11 muestra la foto-reactividad del sistema glutatión en hepatopáncreas de *P. clarkii* y de *P. digueti*. En la primera especie, la actividad enzimática del sistema (Fig. 10A y B) aumentó debido al incremento de la irradiancia y al alargamiento del fotoperiodo, como indica el aumento del valor del mesor de los ritmos con respecto al control (GR $F = 5.41$, $P < 0.05$ y GPx $F = 12.47$, $P < 0.05$). Los cambios en la amplitud y en el PR no fueron paralelos a los observados en el mesor (Tabla 1), las enzimas aumentaron su amplitud en condiciones de alta irradiancia, y el PR disminuyó con el fotoperiodo largo.

Los cambios producidos por la luz en los ritmos de la actividad enzimática no se reflejaron en los parámetros de los ritmos de concentración de los productos (y/o sustratos) (Fig. 10C y D). Los parámetros luminosos afectaron al del GSH, que mostró diferencias significativas en LO 12:12 AI, condición en la que duplicaron los valores del mesor ($F = 18.7$, $P < 0.05$) aunque no produjeron cambios significativos en el ritmo de concentración del GSSG.

El efecto del fotoperiodo y la irradiancia sobre los ritmos del GSH y del GSSG se reflejó en el aumento del mesor del ritmo de la relación GSH/GSSG (Fig. 10E) en la condición LO 12:12 con AI. Esta fue la única condición en que el ANOVA de dos vías detectó diferencias estadísticamente significativas con respecto a las otras condiciones LO ($F = 5.2$, $P < 0.05$). La amplitud y el PR del GSH aumentaron con los aumentos de irradiancia y longitud del fotoperiodo (Tabla 1).

En el hepatopáncreas de *P. digueti* (Fig. 10F-I), el aumento en la irradiancia produjo un decremento en el mesor y en la amplitud de los ritmos de la actividad enzimática (Fig. 10F-G). El mesor del ritmo de la actividad de la GR no presentó diferencias estadísticamente significativas en relación con el control, en tanto que el mesor de la GPx disminuyó significativamente en LO 12:12 con AI ($F = 9.46$, $P < 0.05$).

Únicamente la condición LO 20:4 con BI produjo un decremento estadísticamente significativo en el mesor de los ritmos de la concentración de los productos (GSH $F = 9.13$, $P < 0.05$ y GSSG $F = 10.46$, $P < 0.05$)(Fig. 10H-I).

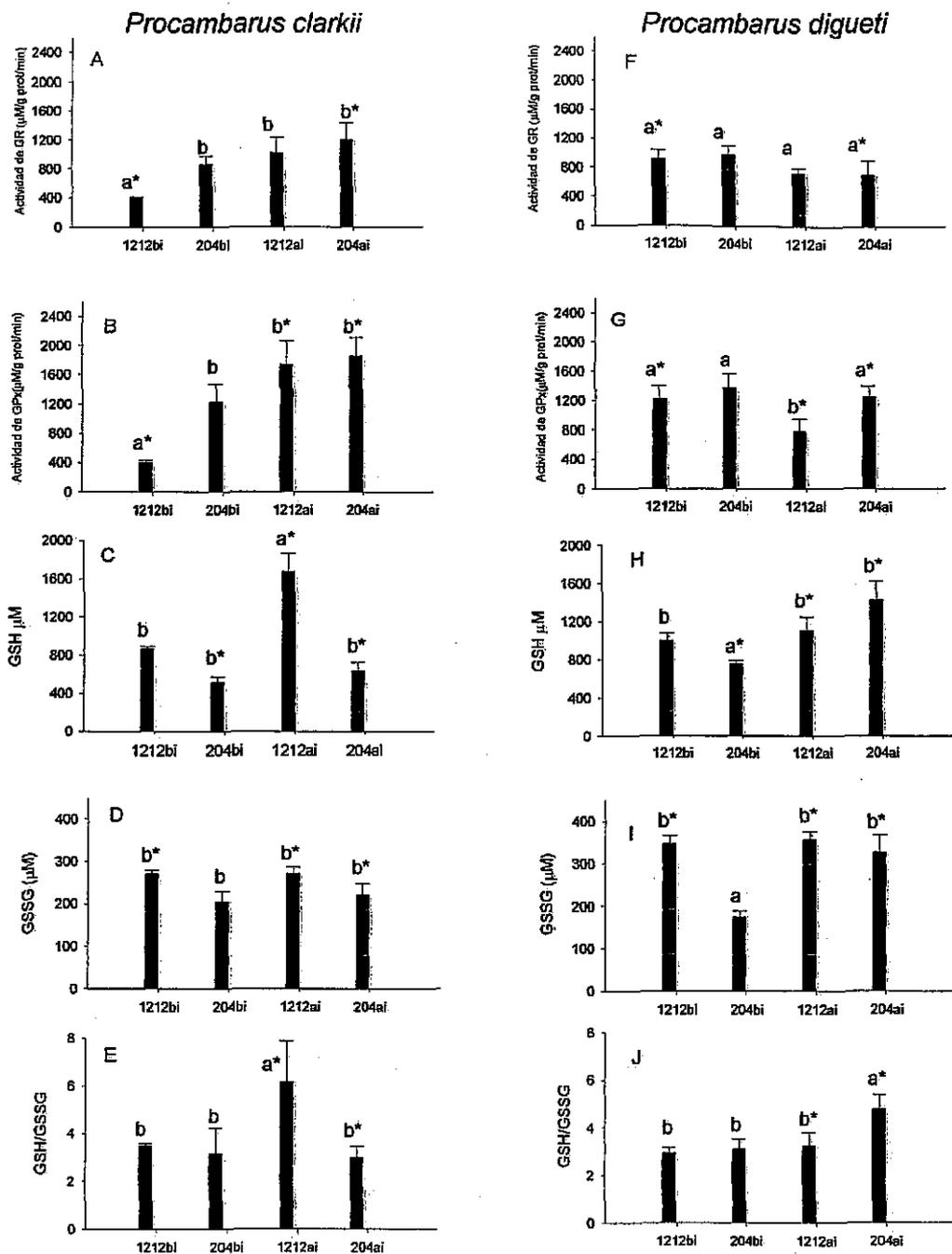


Figura 11.- Comparación de los valores de mesor de los parámetros del sistema glutatión en hepatopáncreas de *P. clarkii* y de *P. digueti* en en las diferentes condiciones LO. Letras diferentes indican diferencias significativas intraespecíficas y los asteriscos indican diferencias significativas interespecíficas comparando las mismas condiciones LO.

En LO 20:4 AI, se incrementó significativamente el valor del mesor del ritmo de la relación GSH/GSSG ($F = 5.3533$, $P < 0.05$) (Fig. 10J).

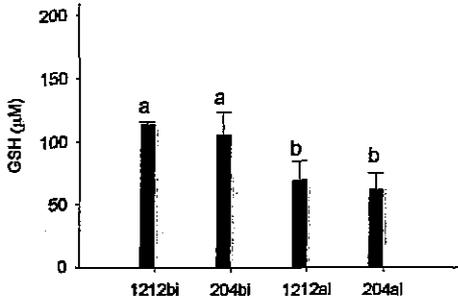
La amplitud de los ritmos de las enzimas y de los sustratos tendió a incrementar al aumentar la irradiancia y el fotoperiodo de manera semejante al aumento en el PR (Tabla 2).

En la hemolinfa de *P. clarkii* tanto la concentración del GSH (Fig. 11A) como la del GSSG (Fig. 11B) no parecen ser consecuencia de los cambios metabólicos del sistema en el hepatopáncreas. El aumento de la irradiancia disminuyó el valor del mesor de la concentración del GSH ($F = 21.86$, $P < 0.05$), mientras que el mesor del ritmo de concentración del GSSG aumentó en LO 12:12 AI y 20:4 BI ($F = 20.33$, $P < 0.05$). La amplitud del ritmo de la concentración GSH se mantuvo sin cambio bajo las condiciones LO, mientras que el de GSSG aumentó su amplitud en LO 12:12 AI y 20:4 BI y la relación GSH/GSSG tendió a aumentar la amplitud y el PR de su oscilación con el fotoperiodo largo (Tabla 1).

En la hemolinfa de *P. digueti* el alargamiento del fotoperiodo produjo un decremento en el mesor del ritmo de concentración del GSH (Fig. 11D), ($GSH F = 30.31$, $P < 0.05$), en tanto que el mesor del ritmo de la concentración del GSSG no presentó diferencias significativas (Fig. 11E). La disminución del GSH se reflejó en el mesor del ritmo de la relación de GSH/GSSG que mostró diferencias estadísticamente significativas en la condición LO 20:4 con AI ($F = 7.02$, $P < 0.05$). Los ritmos de GSH y de GSSG tendieron a aumentar su amplitud en las condiciones LO experimentales con respecto a la amplitud de la condición control aunque la amplitud del ritmo de la relación GSH/GSSG disminuyó particularmente en LO 20:4 AI (Tabla 2)

En las condiciones de OO en *P. digueti* se encontró que el valor de mesor de la actividad enzimática y de GSH y GSSG tanto en hepatopáncreas como en hemolinfa fue mayor que en *P. clarkii*. El mesor de la relación GSH/GSSG de ambos tejidos fue menor en *P. digueti* que en *P. clarkii* (en hepatopáncreas: GR $F = 21.54$, GPx $F = 49.85$; GSH $F = 150.81$; GSSG $F = 11.89$; relación GSH/GSSG $F = 21.54$; hemolinfa: GSH $F = 14.73$; GSSG $F = 8.17$; relación GSH/GSSG $F = 5.19$, en todos los casos $P < 0.01$).

Procambarus clarkii



Procambarus digueti

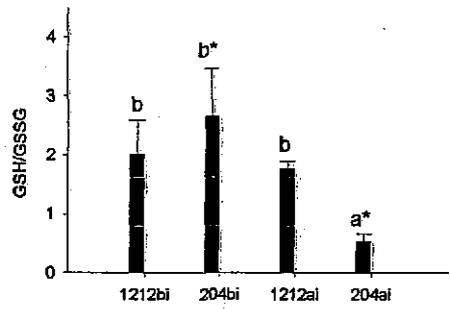
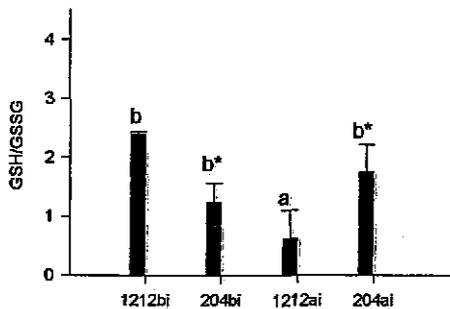
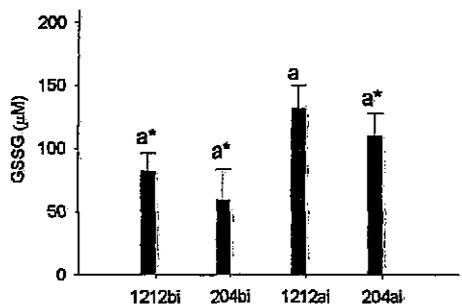
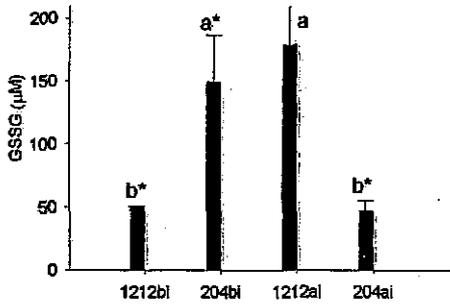
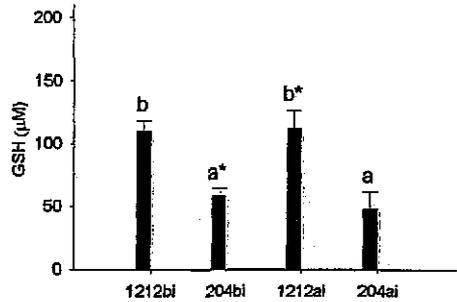


Figura 12. Comparación entre los valores de mesor del GSH, del GSSG y de la relación GSH/GSSG en las distintas condiciones LO encontradas en la hemolinfa de ambas especies de acocil. Letras diferentes indican diferencias significativas intraespecíficas y los asteriscos indican diferencias interespecíficas en variables bajo condiciones de LO semejantes.

En la condición control (LO 12:12 con B1) los hepatocitos de *P. digueti* parecen trabajar a niveles enzimáticos mas elevados que los de *P. clarkii* (el doble de actividad de GR y el triple de GPx que en *P. clarkii*), lo que se refleja en una concentración mayor de GSSG tanto en el hepatopáncreas como la hemolinfa e indican un estado de oxidación mayor en esta especie (GR $F = 28.78$, $P < 0.05$ y GPx $F = 122.89$, $P < 0.05$; GSSG de hepatopáncreas $F = 5.21$, $P < 0.05$, y de hemolinfa $F = 8.54$, $p < 0.05$). Sin embargo el mesor de la relación GSH/GSSG en los tejidos de ambas especies no mostró diferencias significativas.

Al incrementar la irradiancia, el hepatopáncreas de *P. clarkii* presentó una capacidad antioxidativa mayor que *P. digueti* como lo indican los aumentos en el valor de mesor de los ritmos de actividad enzimática (GR y GPX), y la relación GSH/GSSG, y valores menores en el mesor del ritmo de concentración de GSSG (GPx $F = 10.98$, $P < 0.05$; GSH $F = 7.65$, $P < 0.05$; relación GSH/GSSG $F = 12.37$, $P < 0.05$; GSSG $F = 20.64$, $P < 0.05$). Sin embargo, las oscilaciones de la hemolinfa parecen reflejar un estado de oxidación mayor en esta especie que en *P. digueti* como lo indican menor valor del mesor de los ritmos de la concentración del GSH ($F = 5.06$, $P < 0.05$) y de la relación GSH/GSSG.

Ante la condición LO 20:4 con B1, el sistema glutatión del hepatopáncreas de ambas especies presentó valores similares de mesor para todos los ritmos estudiados excepto el ritmo de la concentración del GSH, que fue menor en *P. clarkii* ($F = 24.4$, $P < 0.05$). En la hemolinfa de esta especie el mesor de la concentración de ambos productos fue menor que el valor obtenido para *P. digueti* pero el mesor del ritmo de la relación GSH/GSSG fue mayor (GSH $F = 30.05$, $P < 0.05$; GSSG $F = 4.88$, $P < 0.05$, relación GSH/GSSG $F = 5.04$, $P < 0.05$).

Al incrementar la longitud del fotoperiodo y la irradiancia (LO 20:4 con A1) el hepatopáncreas de *P. clarkii* aparentemente presentó una mayor capacidad antioxidativa que *P. digueti*, mostrando una mayor actividad enzimática, (GR $F = 5.9$, $P < 0.05$; GPx $F = 6.73$, $P < 0.05$) con un valor del mesor de las concentraciones de GSH y de la relación de GSH/GSSG menores en *P. clarkii* ($F = 21.2$, $P < 0.05$ y $F = 7.8$, $P < 0.05$). Esta diferencias se presentaron en sentido opuesto en la hemolinfa. En este tejido, *P. clarkii*

presentó un valor de mesor menor en la concentración de GSSG en tanto que el de la relación GSH/GSSG fue mayor (GSSG $F = 17.0$, $P < 0.05$; relación GSH/GSSG $F = 10.17$, $P < 0.05$).

En ambas especies se encontraron oscilaciones en condiciones de oscuridad constante, pero la significación estadística de estos ritmos fue diferente. *Procambarus clarkii* presentó ritmos significativos en los parámetros reductores del sistema glutatión, como son los ritmos de actividad de GR y de concentración de GSH en hepatopáncreas, en tanto que *P. digueti* los mostró en la fase oxidativa del mismo (ritmos de actividad de GPx en hepatopáncreas y GSSG en hemolinfa).

8.4.2 ORDEN TEMPORAL INTERNO DEL SISTEMA GLUTATIÓN

En la figura 12 se presentan las acrofases de los parámetros del sistema de glutatión de ambas especies de acocil en las condiciones LO control y experimentales donde se observan las diferencias interespecíficas en el orden temporal de este sistema.

Después de 72 h en OO (Fig. 12A y F) los ritmos de las enzimas establecieron ángulos de fase diferentes en cada especie: *P. clarkii* 2 h y *P. digueti* 6 h. Los ángulos de fase que establecieron las enzimas con su sustrato fueron parecidos cada especie: en *P. clarkii* $\psi_{GR-GSSG} = 6$ h y $\psi_{GPX-GSH} = 5$ h; mientras que en *P. digueti* $\psi_{GR-GSSG} = 10$ h, y $\psi_{GPX-GSH} = 10$ h. En cambio, los ángulos de fase entre las enzimas y sus productos fueron: $\psi_{GR-GSH} = 12$ h en las dos especies, pero en *P. clarkii* $\psi_{GPX-GSSG} = 2$ h y en *P. digueti* $\psi_{GPX-GSSG} = 8$ h.

En *P. clarkii* el sistema glutatión en LO 12:12 BI y AI (Fig. 12B y C) se agrupó cerca del encendido de la luz mediante avances y atrasos de fase ($U = 1.66$; $P < 0.05$; $U = 1.64$, $P < 0.05$, respectivamente). Puede observarse en que aún al fotoperiodo largo hay un agrupamiento en torno a la escotofase, ya sea con el encendido o el apagado de la luz ($U = 1.65$, $P < 0.05$ en ambas condiciones)(Fig. 12D y E).

El sistema glutatión de *P. digueti* no parece presentar una dirección de preferencia en las condiciones LO (Fig. 12G-J) excepto en LO 20:4 BI cuando las acrofases se agruparon en torno a la escotofase ($U = 2.08$, $P < 0.05$) (Fig. 12 I). Estos resultados demuestran que tanto en condiciones control y experimentales las acrofases del sistema en *P. clarkii* tienen una distribución unimodal ($P < 0.05$) mientras que en *P. digueti* la distribución es aleatoria.

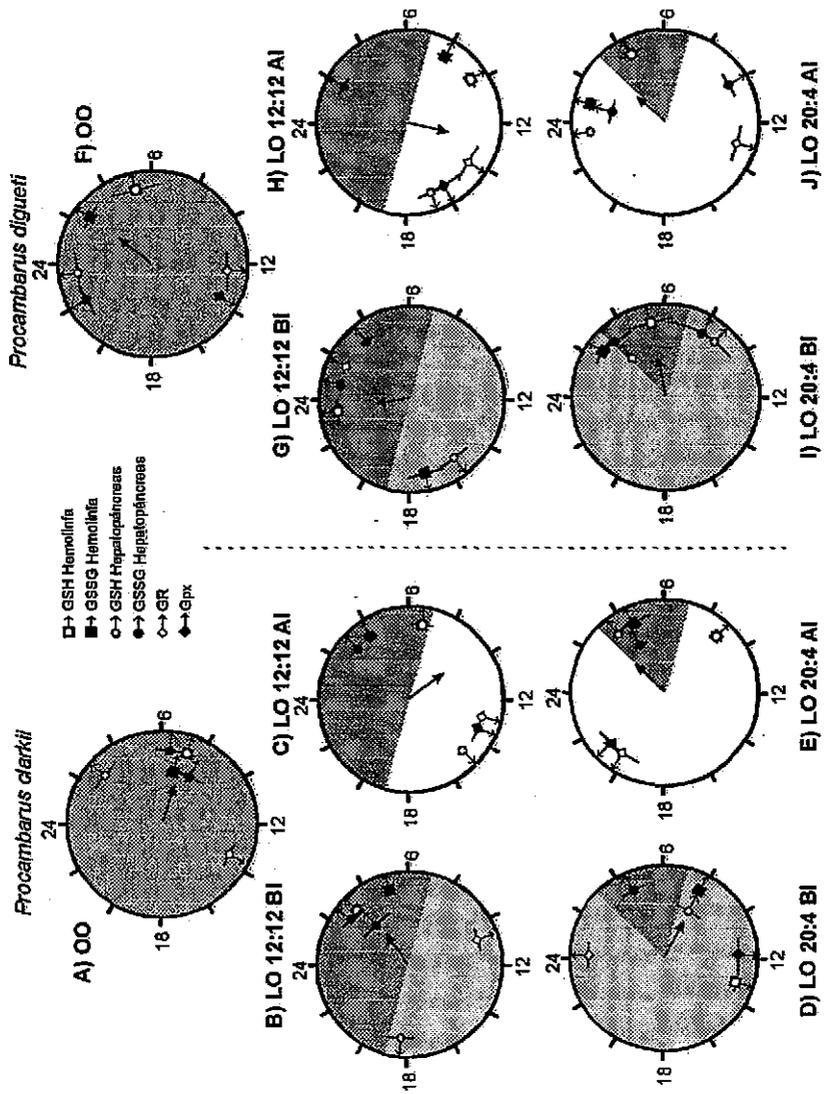


Figura 12. Acrofases estimadas de los ritmos de los parámetros del sistema glutatión de *P. clarkii* y *P. digueti*. El vector indica la dirección de la agrupación de las acrofases. Las barras horizontales indican la mediana error estándar.

10. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis indican la presencia de oscilaciones circadianas en el sistema glutatión del acocil de las dos especies estudiadas. De acuerdo con el nivel de significación estadística señalado por Cosinor después de 72 hr en oscilación libre, tanto los ritmos de la actividad de la GR en hepatopáncreas y de la relación GSH/GSSG en este tejido y en la hemolinfa, se pueden considerar ritmos circadianos en *P. clarkii*. Mientras que en *P. digueti* los ritmos de la actividad de GPx y la concentración de GSSG en hemolinfa son endógenos. El que se encontraran ritmos endógenos en la actividad de las enzimas del sistema en los acociles sugiere que el sistema glutatión del hepatopáncreas está acoplado al reloj circadiano.

Esta diferencia interespecífica en la expresión de los ritmos se hace evidente al estudiar los cambios de las oscilaciones en los parámetros de los ritmos del sistema glutatión (observadas tanto en hepatopáncreas como en hemolinfa) bajo las condiciones experimentales de irradiancia y longitud del fotoperiodo. Estos parámetros: mesor, amplitud y PR, son parámetros rítmicos complejos y tienen un significado funcional importante.

El mesor representa el promedio de las concentraciones de los sustratos y la actividad enzimática del sistema a lo largo del día, es decir es la media de la oscilación (Halberg et. al, 1977; Reinberg y Smolensky, 1993). En el hepatopáncreas de *P. clarkii*, la actividad de ambas enzimas y la concentración del GSH se incrementaron al alargar el fotoperiodo y aumentar la irradiancia (Fig. 11A-C). En la hemolinfa el incremento en irradiancia produjo una disminución en el mesor de la concentración de GSH, y las condiciones LO 12:12 con AI y 20:4 con BI aumentaron el del GSSG (Fig. 12A y B)

El hepatopáncreas de *P. digueti* parece tener una menor capacidad de respuesta ante el aumento en la cantidad de luz, ya que no presenta cambios significativos en el mesor de la actividad enzimática (Fig.11F y G). En la hemolinfa se observó una disminución del mesor de la concentración de GSH asociada al alargamiento del fotoperiodo, y un aumento en la del GSSG asociada al aumento en la irradiancia (Fig. 12D y E).

Estos resultados, aunque obtenidos con diferentes protocolos experimentales, parecen corroborar resultados de trabajos previos de nuestro laboratorio (Prieto-Sagredo et al., 2000) en los que el sistema glutatión de *P. clarkii* fue más reactivo a la irradiancia que a la longitud del fotoperiodo y *P. digueti* presentó una mayor reactividad ante este último parámetro luminoso, el que indujo decrementos en la actividad enzimática de la GR hepática.

La amplitud es un parámetro rítmico que indica el grado de acoplamiento del reloj circadiano con los efectores del mismo. La significancia estadística de un ritmo analizado mediante Cosinor se basa en que la amplitud del ritmo difiera en forma estadísticamente significativa del valor cero, y que la oscilación tenga un ajuste significativo a una onda coseno (Halberg et. al, 1977; Reinberg y Smolensky, 1993). Los resultados de este trabajo reportan un número mayor de ritmos significativos en *P. clarkii* que en *P. digueti*, tanto en condiciones control como de oscuridad constante (Tablas 4 y 5).

En *P. clarkii* todas las oscilaciones de los parámetros del ciclo glutatión se amortiguaron al aumentar la intensidad y la cantidad de la luz, como se espera de un ritmo circadiano en un organismos nocturno (Aschoff, 1981). En hepatopáncreas los diferentes parámetros del ciclo glutatión presentaron porcentajes de ritmo mayores a 40% y en hemolinfa mayores a 50% aunque no todos presentaron una amplitud estadísticamente significativa. El aumento en la intensidad y la duración de la fase luminosa del ciclo externo produjo en *P. digueti* un incremento en la amplitud y el PR de los ritmos del sistema glutatión. Esta especie parece requerir de una mayor cantidad de luz para la expresión de la ritmicidad antioxidativa, lo anterior fue más evidente en la condición LO 20:4 con AI. El incremento de la ritmicidad en dicha condición podría ser el resultado de que el sistema glutatión responda directamente a la luz, lo que indicaría que hay un fenómeno de enmascaramiento: el efecto cíclico de las condiciones LO produce cambios periódicos en la foto-oxidación y, por ende, una respuesta antioxidativa diaria.

Otra diferencia interespecífica de los ritmos del sistema glutatión se encuentra en el orden temporal interno de este sistema. Si bien en ambas especies se observó que la relación de fase entre enzimas y sustratos o productos varió en cada condición experimental, el

análisis estadístico encontró que en *P. clarkii* las acrofases del sistema tendieron a agruparse hacia el encendido o el apagado de las luces (Fig. 12 B-E). La relación de fase de estos ritmos con el apagado de la luz parece conservarse lo que indica sincronización. Esto es apoyado por otros resultados obtenidos en el laboratorio (Durán-Lizarraga et. al., 2001) que indican que en esta especie, las variables del sistema glutatión con ritmos endógenos presentan control de fase. En *P. digueti* las acrofases se encontraron distribuidas al azar, excepto en la condición LO 20:4 BI cuando todas se encontraron asociadas a la escotofase (Fig 12G-I). Nuevamente, esto apoya la posibilidad de que en esta especie haya enmascaramiento en estas condiciones luminosas. Lo anterior sugiere la posibilidad de que el acoplamiento entre el sistema glutatión y el sistema circadiano en *P. clarkii* sea mayor que en *P. digueti*.

Los resultados de este trabajo se ven reforzados por trabajos previos en otras especies. Las relaciones de fase entre la GR, la GPx y el GSH del hepatopáncreas encontradas en las condiciones control en *P. clarkii* son semejantes a las encontradas por Díaz-Muñoz et al. (1985) y Hodoglugil et al. (1995), aunque en otros reportes (Kolossova et al., 1983; Bridges et al., 1992) no se encuentra una relación de fase coherente entre la actividad de las enzimas y ninguno de sus productos y sustratos. Estos autores explican lo anterior argumentando que la participación de las enzimas de síntesis del GSH, así como las vías en la que está involucrado este tripéptido, son numerosas, lo que hace que las relaciones temporales sean poco aparentes.

Las diferencias encontradas en las características de los parámetros rítmicos en los dos sistemas estudiados, hepatopáncreas y hemolinfa, sugieren diferencias en el grado de acoplamiento de ambos sistemas oscilatorios al reloj circadiano, y quizá del papel de estos órganos en el sistema circadiano del acocil. Aunque especulativo, podríamos proponer al hepatopáncreas como un verdadero oscilador acoplado al reloj, en tanto que la hemolinfa podría considerarse como una salida pasiva, tanto de este oscilador como de otros posibles osciladores del sistema glutatión, entre los cuales se contarían; entre otros; los sistemas oscilatorios del cerebro, la retina y el lóbulo óptico. Estas estructuras del sistema nervioso, que podrían estar produciendo GSH y las enzimas relacionadas con

él, han sido propuestas como marcapasos para el acocil (Page y Larimer, 1972; Barrera y Block, 1990). Esta interpretación no descarta la posibilidad de que el hepatopáncreas sea un sistema marcapaso como se ha reportado recientemente en los mamíferos (Stokkan et al., 2001; Escobar, et al., 2001).

Esta tesis es el primer estudio comparativo de los ritmos circadianos y sistemas antioxidantes en invertebrados. Previamente, se habían reportado cambios en los sistemas antioxidantes de invertebrados y de vertebrados inferiores relacionados con fenómenos estacionales en nivel de actividad, hipometabolismo y disponibilidad de oxígeno (Dykens y Shick, 1988; Hermes-Lima y Storey, 1995a; Hermes-Lima y Storey, 1995b, Power y Sheehan, 1996; Hermes-Lima et al, 1998;Joanisse y Storey, 1996; Joanisse y Storey, 1998; Pannunzio y Storey, 1998, Ramos 1999; Hermes-Lima et al., 2001). Los cambios reportados en los diversos sistemas antioxidantes son semejantes en invertebrados y en vertebrados inferiores que enfrentan variaciones estacionales en la disponibilidad de oxígeno y son diferentes a las que se presentan en los sistemas de mamíferos y aves (Hermes-Lima et al., 2001; Tϕien, et al., 2001; Drew et. al., 2001).

Las dos especies estudiadas en esta tesis, tienen estrategias diferentes para enfrentar el estrés foto-oxidativo que imponen los ciclos luminosos. Esta estrategias pueden agruparse entre las que presentan los invertebrados y vertebrados inferiores expuestos a cambios estacionales relacionados con las defensas antioxidantes. *Procambarus clarkii* entra dentro del grupo de especies que presentan preparación para el estrés oxidativo. En este grupo se encuentran organismos que desarrollan hipometabolismo durante los meses de verano, como la estivación (fotoperiodo largo) o durante meses de escasez de alimento en el invierno, como la hibernación (fotoperiodo corto). En estos organismos se incrementan las defensas antioxidativas, particularmente la actividad de las enzimas durante los estados hipometabólicos, como en *Rana pipiens*, *R. sylvatica*, *Littorina littorea*, *Otala lactea*, *Helix aspersa* (Hermes-Lima et al., 2001). Se ha demostrado que el acocil *P. clarkii* es capaz de entrar en estados hipometabólicos en condiciones de iluminación semejantes a los usados en este trabajo (Fanjul-Moles et al., 1998).

Procambarus digueti no tiene esta capacidad y entra dentro del grupo que mantiene los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes elevados de forma permanente como *Trachemys scripta elegans* (Hermes-Lima et al., 2001).

En esta tesis se demuestra que en los tejidos de invertebrados hay una regulación de la relación del GSH/GSSG como se ha demostrado en mamíferos (Taylor et al., 1996). La relación GSH/GSSG es una variable que representa el balance entre antioxidantes y prooxidantes, GSH y GSSG respectivamente (Halliwell y Gutteridge, 1999). En los resultados de este estudio, encontramos que en ambas especies se mantiene este parámetro constante en hepatopáncreas en las condiciones LO, excepto en la situación en que este parámetro en hemolinfa muestra los valores mínimos y el en hepatopáncreas los valores máximos (12:12 con AI en *P. clarkii* y LO 20:4 con BI en *P. digueti*) (Fig 6C y 7B de *P. clarkii* y 8I y 9F de *P. digueti*). Proponemos la posibilidad de que el desbalance de la relación GSH/GSSG en la hemolinfa, sea una señal similar a la que producen las hormonas, la alimentación, y el estrés; señales que actúan estimulando la producción y liberación hepática de GSH hacia la sangre en los mamíferos (Taylor et al., 1996). Otra posibilidad, es que este desbalance entre antioxidantes y prooxidantes sea debido a que la producción de GSSG exceda la capacidad reductora de la GR sea excretado activamente (Ziegler, 1996).

Al igual que en reportes anteriores (Prieto-Sagredo et al., 2000), los resultados de este trabajo confirman que son las condiciones de 12:12 con AI y de 20:4 con AI las que más afectan a la relación GSH/GSSG en hemolinfa de *P. clarkii* y *P. digueti*, respectivamente. En estas mismas condiciones se ha reportado disminución en la actividad locomotora y en el consumo de oxígeno, así como un incremento en la concentración de lactato en la hemolinfa (Fanjul-Moles et al., 1998).

En *P. clarkii*, los ritmos encontrados bajo condiciones control y después de 72 h en OO, en particular los de la relación GSH/GSSG de la hemolinfa y del hepatopáncreas, podrían estar relacionados con la actividad locomotora. Ambas especies bajo estudio son predominantemente nocturnas. En *P. clarkii* se ha demostrado un ritmo motor circadiano bimodal con el pico endógeno de actividad al apagado de la luz y otro pequeño pico

exógeno al encendido de la luz (Page y Larimer, 1972, 1975). Estas variaciones cíclicas se han asociado a otros ritmos como los de consumo de oxígeno que también alcanza su máximo durante las horas de oscuridad (Fingerman, 1955). En el hepatopáncreas se observa que tanto las crestas como los valles del ritmo de la concentración del GSH coinciden temporalmente con los picos de la actividad locomotora reportada en animales juveniles y adultos (Page y Larimer, 1972, 1975; Fanjul-Moles, 1998). Los valles de el ritmo de la relación GSH/GSSG de la hemolinfa también coinciden temporalmente con las crestas del ritmo de actividad locomotora. En *P. digueti* se ha demostrado el carácter circadiano de el ritmo de actividad (Viccón-Pale et al., 1997), sin embargo no ha descrito si la sincronización en LO es semejante a la que se ha demostrado en *P. clarkii*, por lo que no se puede determinar si podría guardar relación con las oscilaciones en los parámetros del sistema glutatión, pero no se debe descartar que exista una asociación entre los ritmos endógenos del sistema antioxidativo con los metabólicos y conductuales.

La presencia de ritmos circadianos en los parámetros del sistema glutatión indica que la susceptibilidad o resistencia del acocil se relaciona con la hora del día. Esta capacidad adaptativa es más evidente en *P. clarkii* que en *P. digueti*. Esta capacidad circadiana ha sido reportada en ratones, ratas, pollos e incluso en el alga fotosintética *Gonyaulax polyedra*, en esta última se ha demostrado que la organización circadiana es necesaria para mantener el estado redox adecuado (Kolossova et al., 1983; Díaz-Muñoz et al., 1985; Bridges et al., 1992; Hodoglugil et al., 1995; Ramalho, et al., 1995; Hollnagel et al., 1996; Lí et al., 1997, Pablos et al., 1998).

Los ritmos diarios de la actividad enzimática de GR y GPx en pollos y ratas están relacionados con una hormona con capacidad antioxidativa: la melatonina, por lo que se ha propuesto que ritmos de esta hormona influyan sobre los de la actividad enzimática de GR y GPx (Reiter et al. 1997; Pablos et al., 1998). En el acocil *P. clarkii* se ha documentado la presencia de ritmos circadianos en la secreción de melatonina (Agapito et al., 1995) y de la expresión y producción de serotonina, (Escamilla-Chimal et al., 1998; Castañón-Cervantes et al., 1999). Esto sugiere la participación de la melatonina en la regulación de los ritmos del sistema glutatión del acocil. La serotonina induce la liberación

de la hormona hiperglicemiante (CHH) en retina y tallo ocular también en *P. clarkii* (Escamilla-Chimal et al., 2002). Esta hormona, similar al glucagon de los vertebrados, se manifiesta de manera circadiana en el acocil (Gorgels-Kallen y Voorte, 1985; Escamilla-Chimal et al., 2001). Puesto que el glucagon induce la liberación de GSH en el hígado de los vertebrados (Taylor et al., 1996) es interesante la posibilidad de que la CHH esté involucrada en el control de la reostasis del estado redox del acocil. Esta posibilidad abre nuevos campos de estudio sobre la regulación metabólica y conductual del acocil y su adaptación a los cambios diarios y estacionales de la luz.

11. CONCLUSIONES

1. El acocil enfrenta la foto oxidación producida por los ciclos de 24 h externos mediante ritmos diarios y circadianos de protección antioxidativa
2. Los acociles de las especies *P. clarkii* como *P. digueti* poseen ritmos diarios y/o circadianos en todos los parámetros del sistema glutatión tanto en el hepatopáncreas como la hemolinfa. En *P. clarkii* el sistema circadiano antioxidativo es evidente y expresa ritmos en oscilación espontánea, capaces de sincronizarse a los distintos ciclos luminosos. En *P. digueti* este sistema está amortiguado, no se sincroniza a los ciclos de luz extremos y presenta enmascaramiento.
3. *Procambarus clarkii* presenta ritmos endógenos en la fase reductora del ciclo glutatión. *Procambarus digueti* presenta ritmos endógenos en la fase oxidativa de este ciclo.
4. Hay diferencias interespecíficas en el grado de foto oxidación de ambas especies lo que parece determinar la sensibilidad del sistema glutatión a la luz.
5. En la hemolinfa el sistema glutatión de *P. clarkii* es más sensible a los cambios en la irradiancia, en tanto que el sistema glutatión de *P. digueti* lo es a la longitud del fotoperiodo.
6. Las diferencias interespecíficas en las características del sistema circadiano del ciclo glutatión parecen deberse a la latitud y origen de ambas especies y podrían manifestarse en la capacidad adaptativa de las mismas para invadir nuevos ambientes.
7. Los cambios observados en el sistema glutatión durante la exposición de los organismos a estrés por luz es semejante a la que presentan otros organismos expuestos a diversas fuentes de estrés ambientales. Así mismo los niveles de actividad enzimática y concentración de glutatión en sus dos formas son semejantes a los reportados para otros crustáceos y grupos de invertebrados.
8. Se propone al hepatopáncreas un como un oscilador acoplado al sistema circadiano y a la hemolinfa como un sistema efector que permite monitorear el estado redox del organismo en general.

12. BIBLIOGRAFIA

- Agapito, M.T., Herrero B., Pablos M.I., Miguel J.L. and Recio J. M. (1995) Circadian rhythms of melatonin and serotonin-N-acetyltransferase activity in *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **112A(1)**:179-185.
- Aguilar-Roblero, R. (1993) Teorías Básicas de los Ritmos Biológicos. *Psiquis.* **2(6)**:121-132.
- Aguilar-Roblero, R., Salazar-Suárez, A., Rojas-Castañeda J., Escobar, C. and Cintra L. (1997) Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats. *Am. J. Physiol.* R1321-R1331.
- Almar M.M., J. Díaz-Mayans and Romero, F. J. (1987) Glutathione content and GSH S-transferase activity in midgut gland of *Procambarus clarkii*. Sex differences, the effect of fasting, and their implications in cadmium toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.* **87C(2)**, 433-435.
- Almar, M. Otero, L., Santos, c. and González-Gallego, J. (1998) Liver glutathione content and glutathione dependent enzymes of two species of freshwater crayfish as bioindicators of chemical pollution. *J. Environ. Sci. Health.* **33B**, 769-783.
- Anderson M.E. and Meister A. (1980) Dynamic state of glutathione in blood plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *Biol. Chem.* **255**, 9530-9533.
- Anderson, M. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* **111-112**: 1-14.
- Archer, J. (1979) Animals under stress. Academic Press. London. 59 pp.
- Aréchiga, H., Fuentes, B. and Barrera, B. (1973) Circadian rhythm of the responsiveness in the visual system of the crayfish. En: Neurobiology of invertebrates. Salanki, J. (ed). Budapest. House of the Hungarian Acad. Sci. Pp 403-421.
- Aréchiga, H., Fernández-Quiróz, F., Fernández de Miguel, F. and Rodríguez-Sosa, L. (1993) The circadian system of crustaceans. *Chronobiol. Int.* **10**: 11-19.
- Aréchiga, H. and Rodríguez-Sosa, L. (1997) Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythmic behaviour in decapod crustaceans. *J. mar. biol. Ass.* **77**:17-29.
- Aschoff, J.A. (1981) Survey in Biological Rhythms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4. Biological Rhythms. J. Aschoff (ed). New York. Plenum Press. s/d, pp 3-10.
- Barrera, B. and G. Block (1990) Protocerebral circadian pacemakers in crayfish: Evidence for mutually coupled pacemakers. *Brain Res.* **533**, 241-245.
- Blat, A., Almar, M.M. and Romero, F.J. (1988) The effect of S-containing pesticides on GSH content and g-glutamyl transpeptidase activities in midgut gland of the american red crayfish *Procambarus clarkii*. *Drug Metabolism and drug interactions.* **6(3/4)**, 383-392.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **7**, 248-254.
- Brady, J. (1982) Introduction to Biological Timekeeping. En: Biological Timekeeping. Brady, J. (ed). Cambridge. Cambridge University Press. s/ed. pp 1-11.
- Bridges, A.B., Fischer, T.C., Scott, N., McLaren, M. and Beich, J. (1992) Circadian Rhythm of White Blood Cell Agregation and Free Radical Status in Healthy Human Volunteers. *Free Radic. Res. Commun.* **16(2)**:89-97.

- Bompard, G., Prevot, D. and Bascands, J.L. (1990) Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity: application to cisplatin induced toxicity. *Clinical Biochemistry* 23: 501-504.
- Bunning, E. (1960) Circadian rhythms and the time measurement in photoperiodism. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:249-256.
- Castañón-Cervantes, O., Lugo, C., Aguilar, M; González-Morán, G. and Fanjul-Moles, M.L. (1995) Photoperiodic induction on the grown rate and gonad maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* during ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A(2):139-146.
- Castañón-Cervantes, O., Batelle, B., and Fanjul-Moles, M.L. (1999) Rhythmic changes in the serotonin content of the brain and eyestalk of crayfish during development. *J. Exp. Biol.* 202(20) :2823-30.
- Dalton, T., Shertzer, H.G. and Puga, A. (1999) Regulation Of Gene Expression By Reactive Oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:67-101.
- Díaz-Muñoz, M., Hernández-Muñoz, R., Suárez, J. and Chagoya-de-Sánchez V. (1985) Day-Night cycle of lipid peroxidation in rat cerebral cortex and their relationship to the glutathione cycle and superoxide dismutase activity. *Neurosci.* 16(4):859-63.
- Drew, K.L., Rice, M.E., Kuhn, T.B. and Smith, M. (2001) Neuroprotective adaptations in hibernation: therapeutic implications for ischemia-reperfusion, traumatic brain injury and neurodegenerative diseases. *Free Radical Biol. Med.* 31(5):563-573.
- Dykens, J.A. and Shick, M. (1988) Relevance of purine catabolism to hypoxia and recovery in euryoxic and stenoxic marine invertebrates, particularly bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 91C, 35-41.
- Enright, J.T. (1981) Methodology. En *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol 4. Biological Rhythms. J. Aschoff (ed). New York. Plenum Press. s/d, pp 11-20.
- Escamilla-Chimal, E., García-Rivera, C., Romero-Díaz, V. and Fanjul-Moles, M.L. (1998) The retina of crayfish *Procambarus clarkii* during development show serotonin and tryptophan hydroxylase immunoreactivity daily changes. *Biol. Rhythm Res.* 29(5):1-9.
- Escamilla-Chimal, E.G., Hiriart, M., Sánchez-Soto, M.C. and Fanjul-Moles, M.L. (2002) Serotonin modulation of CHH secretion by isolated cells of the crayfish retina and optic lobe. *Gen. and Comp. Endocrinol.* 125:283-290.
- Escobar, C., Martínez-Merlos, M.T., Angeles, M. y Mendoza, J. (2001) El alimento como sincronizador biológico: su relevancia para la identificación de un oscilador circadiano. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 2.
- Fanjul-Moles, M.L., Moreno-Sáenz, E., Villalobos-Hiriart, N. and Fuentes-Pardo-B. (1987) ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A(2): 213-219.
- Fanjul-Moles M.L. (1998) Ontogenetic study of a circadian rhythm in crayfish: pacemaker and entrainment. *Trends. Comp. Biochem. Physiol.* 5, 153-160.
- Fanjul-Moles, M.L., Bosques-Tistler, T., Prieto-Sagredo, J., Castañón-Cervantes, O. and Fernández-Rivera-Río, F. (1998) Effect Of variation in photoperiod and light intensity on oxygen consumption, lactate concentration and behavior in crayfish, *Procambarus clarkii* and *Procambarus digueti*. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A:263-269.
- Fanjul-Moles, M.L., Ruiz-Yáñez, S. Aguilar-Morales, M., Prieto-Sagredo, J. and Escamilla-Chimal, E. (2001) Photoperiodic induction of ovarian maturation in crayfish *Procambarus clarkii* is mediated by extraretinal photoreception. *Chronobiol. int.* 18(3), 423-434.
- Fingerman, M. (1955) The rate of oxygen consumption of the dwarf crayfish *Cambarellus suffeltidi*. *Tulane Stud. zool.* 3.103-116.

- Fingerman, M. and Lowe, M. (1957) Twenty-four hour rhythm of distal retinal pigment migration in the dwarf crawfish. *J. cell. Comp. Physiol.* **50**, 317-379.
- Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* **408**:239-247.
- Foyer C.H., Lelandais, M. and Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* **92**, 696-717.
- Gamaley, I.A. and Kluybin I.V. (1999) Roles of Reactive Oxygen Species: Signaling and Regulation of Cellular Functions. *Int. Review Cytology.* **188**:203-255.
- Golombek, D.A. (1997) Cronobiología: En busca del tiempo perdido. Fisiología de los ritmos biológicos. En *II Curso Latinoamericano de Cronobiología (Memorias)*. Facultad de Ciencias. UNAM, 27-30 de Agosto de 1997. pp 273-285.
- González-Flecha, E. and Dempley, B. (1999). Biochemistry of Redox Signaling. En: *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. D.L. Gilbert and C.A. Colton (eds) Kluwer Academic Press. Plenum Publishers New York. pp.
- Gorgels-Kallen, J.L. and Voorte, C. (1985) The secretory dynamics of the CHH-producing cell group in the eyestalk of the crayfish, *Astacus leptodactylus*, in the course of the day/night Cycle. *Cell. Tissue Res.* **241**:361-366.
- Granados-Fuentes, D., Salazar, Juárez, A., Vergara-Aragón, P., Escandón- Calderón, J., Vega-González, A. y Aguilar-Roblero, R. (1995) Los Ritmos circádicos en mamíferos: conceptos, implicaciones y bases Biológicas. En: *Temas Selectos de Neurociencias*. J. Velázquez Moctezuma (ed). UAM. México. pp 433-458.
- Grundy, J.E. and Storey, K.B. (1998) Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. *J. Comp. Physiol.* **B168**:132-142.
- Gutteridge, J and Halliwell, B. (1999) Antioxidant Protection and Oxygen Radical Signaling: En: *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. D.L. Gilbert and C.A. Colton (eds) Kluwer Academic Press. Plenum Publishers New York. pp 189-218.
- Halberg, F., Caradente, F., Cornelissen, G., and Katinas, G.S. (1977) Glossary of Chronobiology. *Chronobiology* **4**, Suppl. 1.
- Halliwell, B. 1991. Reactive oxygen species in living systems. *Am. J. Of Med.* **91**(3C):9-25.
- Halliwell, B and Gutteridge, J. (1998) Free radicals in biology and medicine. 3rd Ed. Oxford Science Publications. Oxford. 936 pp.
- Halliwell, B., Clement, M.V. and Long, L.H. (2000). Hydrogen peroxide in human body. *FEBS Letters.* **486**:10-13.
- Hansberg, W. (1999). La biología del dioxígeno en singulete. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* **2**(2):47-55.
- Hardeland, R., Balzer I., Poeggeler, B., Fuhrberg, B., Uría, H., Behrmann, G., Wolf, R., Meyer, R. and Reiter, R. (1995) On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J. Pineal Res.* **18**:104-111.
- Hastings, J.W., Rusak, B. and Boulos Z. (1991) Circadian rhythms: The physiology of biological timing. En: *Neural and Integrative Animal Physiology. Comparative Animal Physiology.* 4 ed. Prosser, L. (ed) Wiley-Lis. New York. 435-546 pp.
- Hermes-Lima, M. and Storey, J.M. (1995a) Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* **268**, R1386-R1393.
- Hermes-Lima, M. and Storey, J.M. (1995b). Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase from an estivating land snail *Z. Naturforschung*, **50C**, 685-694.

- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., and Storey, K.B. (1998) Antioxidant defenses and metabolic depression. the hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol.* 120B:437-448.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M. and Storey, K.B. (2001) Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. En. Adaptations and signal transduction. Storey, K.B. and Storey, J.M. (eds). Elsevier Science. New York, pp 263-287.
- Hissin, P.J. and Hilf, R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochem.* 74, 214-226.
- Hodoglugil, U., Ongun, O., Guney, Z., Altan, N., Zengin, H. (1995) Temporal variations in hepatic superoxide dismutase activity in mice. *Chronobiol. Int.* 12(2):152-5.
- Hollnagel, H.C., Di Mascio P., Asano, C.S., Okamoto, O.K., Stringer, C.G., Oliveira, M.C. and P. Colepicolo. (1996) The effect of the light in the biosynthesis of β -carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic algae *Gonyaulax polyedra*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 105-110.
- Huner, J.V. (1988) *Procambarus* in North America and Elsewhere. En: Holdich, D.M. and Lowery, R.S. (eds). Freshwater crayfish. Biology, management and exploitation. Portland, OR. Timber Press. pp 239-291.
- Huner, J and Lindqvist, O. (1995) Physiological adaptations of freshwater crayfishes that permit successful aquacultural enterprises. *Amer. Zool.* 35:12-19.
- James, D.A., Arnold, D.P., and Parsons, P.G. (1994) Potency and selective toxicity of porphyrins in human melanome cells with and without exposure to red light. *Photochem. Photobiol* 59(4):441-447.
- Joanisse, D.R and Storey, K.B. (1996) Oxidative damage and antioxidant in *Rana sylvatica* the freeze-tolerant wood frog. *Am. J. Physiol* 271, R545-R553.
- Joanisse, D.R and Storey, K.B. (1998) Oxidative stress and antioxidants in stress recovery of cold-hardy insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 23-30.
- Jones D.J., Erlow L., Thor H. and Orrenius S (1981). Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: Relative contribution of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenous generated H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 210(2):505.
- Kashiwagi, T, Meyer-Rochow, V.B., Nishimura, K. and Eguchi, E. (1997) Fatty acid composition and ultrastructure of photoreceptive membranes in the crayfish *Procambarus clarkii* under conditions of thermal and photic stress. *J. Comp. Physiol. B* 167:1-8.
- Kim, J.D., McCarter, R.J. and Yu, B.P. Influence of age, exercise and dietary restriction on oxidative stress in rats. *Ageing (Milano)* 8(2):123-129.
- Kolosova, N.G., Mel'nikov, V.N., Shorin, I.P. and Khasnulin, V.I. (1983) Role of photoperiodicity and circadian rhythm of glucocorticoids in synchronizing the fluctuations in free radical oxidation of lipids in rats. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 96(9):99-101.
- Kosower, N. S and Kosower, E. M. (1978) The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 54:109.
- Leus, N.F., Kolomiichuk, S.G. and Lishchenko, V.B. 1997. Activity of glutathione S-transferase in the blood plasma, liver and crystalline lens tissues as affected by low doses of ionizing radiation and polychromatic light. *Ukr. Biokhim. Zh.* 69 (3):54-59
- Lew H., Pyke S and Quintanilla A. (1985) Changes in the glutathione state of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett* 185:262.
- Li, X.M., Metzger, G., Filipkne, E., Boughttas, N., Lemaigre, G. Hecquet, B. Filipski, J. and Levi, F. (1997). Pharmacologic modulation of reduced glutathione circadian rhythms with buthionine sulfoximine: relationship with cisplatin toxicity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143 (2):281-90.

- Long, L.H. and Halliwell, B. (2000) Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. *Free Radic. Res.* 32(5):463-7.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A. and Hermes-Lima, M. (2001) Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 280: R100-R107.
- Momut, W.T., Gowing, H. and Jones, P.D. (1978) The dynamics of crayfish and their role in the ecosystem. *Am. Midl. Nat.* 99, 10-35.
- Monier, A. (1936) Recherches sur la répartition du glutathion dans les organes des animaux inférieurs. 62 pp., Delmas, Bordeaux.
- Moore-Ede, M.C. and Sulzman, F.M. (1984) Internal temporal order. En: Biological rhythms. J. Aschoff (ed.) New York Plenum Publishing Corporation 215-238 pp.
- Nelson W., Tong Y.L. Lee J. K. and Halberg F. (1979) Methods for Cosinor rhythmometry. *Chronobiologia* 6:305-323.
- Nies E., Almar M.M., Hermenegildo C., Monsalve E. and Romero F. (1991) The activity of glutathione S transferase in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*: Seasonal variations and the influence of environmental pollutants. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C(1-2):65-66.
- Pablos M., Reiter R., Ortiz G., Guerrero J., Agapito T., Chuang J. I. and Sewerynak, E. (1988) Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int.* 32:69-75.
- Papaconstantinou J. (1994) Unifying model of intrinsic and extrinsic theories of aging. En: P. Pierpaoli (ed.) The aging clock. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 719.
- Paglià, D.E. and Valentine, W.N. (1966) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70(1): 158-69.
- Page, T. and Larimer J. (1972) Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. *J. comp. Physiol.* 78, 107-120.
- Page, T. and Larimer J. (1976) Extraretinal photoreception in entrainment of crustacea circadian rhythm. *Photochem. Photobiol.* 23:245-251.
- Pittendrigh, C. (1981) Circadian systems: General perspective En: Biological rhythms. J. Aschoff (ed.) New York Plenum Publishing Corporation 95-124 pp.
- Pittendrigh, C.S. and Minis, D. (1964) The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *Am. Nat.* 98(902):261-294.
- Power, A. and Sheenan, D. (1996) Seasonal variations in the antioxidant defense system of gill and digestive gland of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 114C(2):99-103.
- Pannunzio, T.M. and Storey, K.B. (1998) Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 221, 277-292.
- Prieto-Sagredo, J., Ricalde-Recchia, I., Durán, -Lizarraga, M.E., Gonsebatt, M.E., Fanjul-Moles, M.L. (2000). Changes in haemolymph glutathione status after variation in photoperiod and light-irradiance in crayfish *Procambarus clarkii* and *Procambarus digueti*. *Photochem. and Photobiol.*, 71(4): 487-492.
- Prieto-Sagredo, J. and Fanjul-Moles, M.L. (2001) Spontaneous and light evoked discharge of the isolated abdominal nerve cord of crayfish in vitro reveals circadian oscillations. *Chronobiol. Int.* 18(5):759-765.
- Prosser, C.L. (1957). Physiological variations in animals. *Biol. Rev.* 30:229-262.

- Ramalho, C.B., Hastings, J.W. and Colepicolo, P. (1995) Circadian oscillation of nitrate reductase activity in *Gonyaulax polyedra* is due to changes in protein levels. *Plant Physiol.* 107, 225-231.
- Ramos, G.R. (1999) Estresse oxidativo e hipometabolismo em gastrópodes *Helix aspersa*. M. Sc. Thesis, Universidade de Brasília, Brazil.
- Reinberg, A., and Smolensky, M. (1993) Introduction to chronobiology. En: Biological rhythms and medicine. Reinberg, A., and Smolensky, M. (eds). New York. Springer Verlag. p 1-21.
- Reiter, R.J., Carneiro, R.C. and Oh, C.S. (1997) Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hom. Metabol. Res.* 29(8):363-72.
- Revesz L. and Malaise E.P. (1983). Significance of cellular glutathione in radio protection and repair of radiation damage. In: Leyson et al. (eds.) Function of glutathione: Biochemical, Physiological and clinical effects. Raven Press, New York.
- Rice, P. and Armitage, K.B. (1974) The effect of photoperiod on oxygen consumption of the crayfish *Orconectes nais* (Faxon). *Comp. Biochem. Physiol.* 47A:261-270.
- Rywkinn S., Ben-Hur E., Reid M.E., Oyen R., Ralph H. and Horowitz B. (1995) Selective protection against IgG binding to red cells treated with red light. *Transfusion* 35(5):414-420.
- Saunders, D.S. (1984) Insect photoperiodism. En Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4. Biological Rhythms. J. Aschoff (ed). New York. Plenum Press. s/d, pp 3-10.
- Savoure N., Maudet M., Nicol M., Pelissier M.A., Albrecht R., Briand G. and Gombre A. (1996) tion of light-induced oxidative stress in mice skin related to dietary vitamin A and selenium intake. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 66 (4):306-315.
- Sies H. (1985). Oxidative stress. Academic Press, London.
- Sweeny M. M. (1979) Bright light does not immediately stop clock. *Plant Physiol.* 64:314-344.
- Spector, A. 1991. The lens and oxidative stress. En: Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. H. Sies (ed). Academic Press Limited. pp 529-557.
- Stadtman, E.R. and Bertlett, B.S. (1991) Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J. Biol. Chem.* 266(26):17201-17211.
- Stokkman, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. and Menaker, M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science.* 291(5503):490-493.
- Taylor, C.G., Nagy, L.E. and Bray, T.M. (1996). Nutritional and hormonal regulation of glutathione homeostasis. *Current. topics in cellular regulation.* 34:189-208.
- Thomas, B. and Vince-Prue, D. (1997) Photoperiodism in plants. Academic Press. Sand Diego. 2nd Ed. 415 pp.
- Tøien φ., Drew, K.L., Chao, M.L. and Rice, M.E. (2001) ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 281: R572-R583.
- Vega-González, A. (1993). Análisis estadístico en cronobiología. *Psiquis.* 2(6):139-149.
- Viccon-Pale, J.A., Ortega, P. and Fuentes-Pardo, B. (1997) Effects of illumination on the chelipeds of crayfish. *Biol. Rhythm Research.* 28(2):230-243.
- Villalobos, A. (1983). Crayfish of Mexico (Crustacea: Decapoda). Amerind Publishing Co. AA.Balkemia. Rotterdam. pp 7-64.
- Wefers, H. and Sies, H. (1983) Oxidation of the glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur. J. Biochem.* 137 (1-2):29-36.
- Ziegler, D.M. (1991) Non radical mechanisms for the oxidation of glutathione. En: Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. Sies, H. (Ed) Academic Press. 85-97 pp.

13. APÉNDICE
PUBLICACIÓN EN REVISTA INTERNACIONAL ARBITRADA

Crayfish *Procambarus clarkii* shows Circadian Variations in Different Parameters of the GSH Cycle¹

Ma. Elena Durán-Lizarraga¹, Julio Prieto-Sagredo¹, María Eugenia Gonsebatt² and María Luisa Fanjul-Moles^{1*}

¹Lab. Neurofisiología Comparada, Facultad de Ciencias and

²Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México

Received 15 March 2001; accepted 5 May 2001

ABSTRACT

The present study investigated the rhythmic changes in glutathione status in midgut gland and hemolymph as well as in glutathione reductase (GR) activity in the crayfish *Procambarus clarkii*. In order to determine the circadian nature of these rhythms different groups of crayfish were submitted to constant-darkness conditions for 24 or 72 h after they had spent 15 days under light-dark 12:12 cycles. The animals of the different batches were killed at 6 h intervals during a 24 h cycle. Reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) in hemolymph and midgut as well as midgut GR activity were determined in midgut gland and hemolymph by fluorometric and spectrophotometric methods. Data analysis by chronogram and single Cosinor revealed circadian rhythmicity for GSH and GSSG concentration in both tissues as well as midgut GR activity. The rhythm parameters revealed oxidative stress induced by light. The possible correlation between the glutathione rhythm and other metabolic and behavioral rhythms of crayfish as well as the importance of the glutathione circadian temporal order in the adaptation of crayfish are discussed.

INTRODUCTION

The crayfish *Procambarus clarkii* is a nocturnal organism that displays a span of overt circadian and infradian rhythms to adapt to daily and seasonal environmental lighting changes. Two circadian rhythms, activity and oxygen consumption, are well documented in the crayfish (1,2). They should produce daily variations in the oxidative status of this animal's internal environment with the concomitant daily fluctuations of the antioxidant mechanisms that control and pre-

vent reactive oxygen species (ROS)†. ROS cause damage in organisms at different levels (for review see Finkel and Holbrook [3]) which must be counteracted by diverse antioxidant mechanisms. An important antioxidant is the tripeptide γ -glutamyl-cysteine-glycine or reduced glutathione (GSH). When GSH is present, any ROS will be instantly quenched with the immediate formation of oxidized glutathione (GSSG) which will be subsequently reduced by the enzyme glutathione reductase (GR) to restore GSH. Recently, our laboratory reported changes in *P. clarkii* hemolymph glutathione status as well as in midgut GR activity when this species was submitted to high irradiance and long-photoperiod light cycles (4). The aforementioned study proposed a positive correlation between the increasing GSH and GR activity and the adaptive ability of the crayfish to lighting variations. In the present study we propose that this relationship must be based on an endogenous temporal organization of the crayfish GSH system. This circadian organization will allow this animal to deal with the daily internal and external fluctuations in oxidative status produced by the behavioral and metabolic rhythms as well as the environmental daily cycles. Hence, the objective of the current work was to investigate circadian changes in GSH and GSSG concentration as well as GR activity in crayfish hemolymph and midgut, two systems where the presence of glutathione is well known (4,5). The levels of all these parameters were measured in animals maintained under 12:12 light-dark (LD) cycles and after exposure to conditions of constant darkness (DD).

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design. We used 90 crayfish *P. clarkii* of homogenous size and weight. In intermolt stage, acclimatized to the laboratory for 1 month in aquaria placed under natural LD cycles, temperature 20°C, pH 7.9, O₂ concentration of 5.7 mg·L⁻¹. The aquaria were provided with PVC tubes simulating burrows, which allowed the animals to hide from the light. After acclimatization the animals were divided into three batches with different light-cycles conditions: (1) 30 animals submitted to LD 12:12 of low intensity

†Posted on the website on 14 May 2001.

*To whom correspondence should be addressed at: Lab. Neurofisiología Comparada, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, Ap. Postal 41630, México D.F. 11000, México. Fax: 52-5682-1086; e-mail: mlajul@netmex.com

© 2001 American Society for Photobiology 1031-8655/01 \$5.00+0.00

†Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; DD, constant darkness; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSH-t, total glutathione; GSSG, oxidized glutathione; LD, light-dark; NADPH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; OPT, *o*-phthalaldehyde; PR, percentage of rhythmicity; ROS, reactive oxygen species; TCA, trichloroacetic acid.

(0.043 W·m⁻²) during 15 days: (2) 30 animals treated as described above and then exposed to DD for 24 h; and (3) 30 animals treated as described above and then exposed to DD for 72 h.

GSH and GSSG assay. Groups of five animals of the three batches were killed at 6 h intervals during a 24 h cycle, and 100 µL of hemolymph was extracted and placed in 500 µL of freshly prepared 10% trichloroacetic acid (TCA). The midgut glands were removed, and one half were homogenized in 1000 µL of ice-cold 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) for protein and enzymatic activity determinations, and the other half in 1000 µL of 10% TCA.

Samples were centrifuged at 4°C at 2000 g during 10 min. Supernatant aliquots were used immediately for the measurement of GSSG and GSH according to the fluorometric method of Hissin and Hilf (6). Supernatant (50 µL) was incubated in 0.1 M sodium phosphate-0.005 M ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) buffer (pH 8) in the presence of 100 µL of *o*-phthalaldehyde (OPT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) during 15 min in the dark. Fluorescence at 420 nm was determined with activation at 350 nm in a Turner 450 Fluorometer. Glutathione (Sigma) was prepared daily in 0.1 M phosphate-0.005 M EDTA buffer. OPT (0.1% wt/vol) was also prepared daily in reagent-grade absolute methanol just prior to use. The GSH standard curve was made by dissolving known amounts of GSH (200, 100, 50 and 25 ng) in phosphate-EDTA buffer (pH 8) and mixed with 100 µL of the OPT solution. The final volume of this mixture was adjusted to 2 mL with buffer. To assay GSSG 50 µL of supernatant was incubated at room temperature with 20 µL of 0.04 M *N*-ethyl-maleimide (Sigma) for 30 min. The supernatant was then incubated for 15 min with 100 µL of OPT in 1.8 mL of 0.1 N NaOH (pH 12). Fluorescence was determined similarly as for GSH. The GSSG standard curve was made by dissolving known amounts of GSSG in 0.1 N NaOH (pH 12) and 100 µL of OPT. The final volume of this mixture was adjusted to 2 mL with buffer. Total glutathione (GSH-t) was calculated as GSH-t = GSH + 2GSSG. The GSH/GSSG ratio was calculated.

GR activity and protein assay. GR activity was determined as described by Bompard *et al.* (7). To measure GR activity 20 µL of the homogenate was placed in a cuvette containing 0.44 mmol·L⁻¹ GSSG in 0.1 M phosphate buffer-0.03 M EDTA (pH 7) and 0.036 M reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), prepared and added just before the assay, as the starting reagent. The assay was run at 340 nm for 4 min, with absorbance readings taken every 30 s. Absorbance was assayed for all the readings in an Ultraspec 2000 spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). Activity was expressed in µg oxidized NADPH/g protein/min using an extinction coefficient of 6.2 mM⁻¹·cm⁻¹. The protein assay was performed according to Bradford (8).

Assessment of light parameters. Photoperiod was provided by neon lamps turned on by a timer at 0700, and light quantum scalar irradiance (QSI) was calibrated with a photoradiometer equipped with a spherical submarine sensor (LiCor Models LI-189, LI-193SA; LiCor, Lincoln, NE). Intensity values were set at the minimal values of light irradiance to which crayfish are exposed in their natural environment.

Data analysis. Chronograms were constructed as group means ± standard deviation. In order to estimate the circadian rhythms for each GSH parameter (GSH, GSSG, GSH/GSSG and GR) of the different groups of animals a single Cosinor analysis (9,10) was performed. The software program DISPAC (Digital Analysis Applied to Chronobiology) (11) was used. On the basis of a test period (τ), Cosinor analysis adjusts data to a cosinusoidal function and provides an objective test of whether the amplitude of the rhythm differs from zero, *i.e.* whether the rhythm is validated for an assumed τ . This method provides descriptive estimators for a number of different parameters of a rhythm, *i.e.* acrophase, mesor, amplitude and percentage of rhythmicity (PR). Acrophase is the crest time of the best-fitting mathematical function approximating the data, and mesor is the value around which oscillation occurs: when the time interval between data sampling is constant, it equals the arithmetic mean of the rhythmic oscillation. Hence, in the present work it corresponds to the arithmetic mean of the rhythmic oscillation of the concentration or activity of the parameters of GSH over 24 h. The formal definition of mesor is the adjusted mean of the rhythm. The amplitude is equal to half the difference between the highest and lowest values of the oscillation, and the PR is the percentage of data in-

cluded within the 95% confidence limits of the best-fitting cosine function (12). This test allows subjective examination of the hypothesis that the rhythm amplitude differs from zero, using different trial-period lengths. In the current work several periods were tested to analyze whether the temporal profiles of the GSH parameters in different LD conditions were indeed circadian.

For statistical analysis of the differences between midgut and hemolymph GSH-t content, analysis of variance (ANOVA) was followed by Scheffé *post hoc* comparisons.

RESULTS

The amount of GSH, GSSG and GR activity changed over the course of a 24 h cycle. The midgut GSH-t content in *P. clarkii* (LD \bar{x} = 1359.99 ± 78.07 µM, 24 h DD \bar{x} = 933.04 ± 40.83 µM and 72 h DD \bar{x} = 291.42 ± 27.23 µM) was always higher than that of hemolymph (LD \bar{x} = 216.42 ± 22.8 µM, 24 h DD \bar{x} = 253.87 ± 26.8 µM and 72 h DD \bar{x} = 130.68 ± 16.93 µM). ANOVA demonstrated the statistically significant differences between groups (F = 139.28, P < 0.01). The Scheffé contrast test revealed statistically significant differences between LD and 24 and 72 h DD (P < 0.05) in midgut GSH-t but not in GSH-t values in hemolymph (P > 0.05).

Chronograms showing 24 h temporal changes in GR activity in midgut are depicted in Fig. 1a-c. In LD maximal GR activity occurs in the scotoperiod at 2400 h (525.57 ± 151.42 µM/g protein/min). But during the photoperiod a second GR-activity peak from 0400 to 1200 h occurs. Interestingly, when the lights were turned off, and the crayfish changed from LD to DD conditions after 24 h of darkness, GR activity remarkably increased two-fold, reaching maximal values of 979.63 ± 251.27 µM/g protein/min (Fig. 1b). After 72 h of darkness the GR bimodal rhythm obtained under LD persisted (Fig. 1c). This secondary rhythm peak at 1200 h increased 1.7-fold without shifting, but the maximal 2400 h peak advanced 4 h, increasing (20%) above the previous value (Fig. 1a,c). Cosinor analysis revealed that GR oscillation under LD best fitted a period value of 12 h (PR 66.2%) with an acrophase of 10.58 h. GR-activity rhythm analyzed under DD showed a unimodal rhythm that fitted a period value of 24 h after 24 and 72 h of darkness (PR 62.9 and 71.5%, acrophase of 22.28 and 13.79 h, respectively). Cosinor analysis revealed the highest statistical significance after 72 h of darkness (Table 1).

Temporal changes in the glutathione midgut status under different conditions of illumination are shown in the chronograms of Fig. 2. When the crayfish were submitted to LD, both GSH and GSSG showed bimodal and unimodal rhythmic patterns with maximal peaks at the onset of the subjective day and during the night (Fig. 2a); the maximal GSH concentration peak at 0800 h (1012.1 ± 333.5 µM) precedes the GSSG peak at 1600 h (347.1 ± 33.83 µM). However, after 24 and 72 h of darkness mirror-image unimodal and bimodal rhythms of GSH and GSSG concentration may be observed (Fig. 2b,c). After 72 h of darkness the zenith of the GSH oscillation (265 ± 19.48 µM) at 2400 h coincides with the nadir of the GSSG oscillation (1.57 ± 0.65 µM), although a secondary peak with coincident increasing values at 1600 h (GSH, 262.59 ± 22.19 µM; GSSG, 87.71 ± 38.2 µM) is shown in both the rhythms. Cosinor analysis suggested that the GSH oscillations calculated from animals that were submitted to LD or darkness for 24 h have rhythms

73

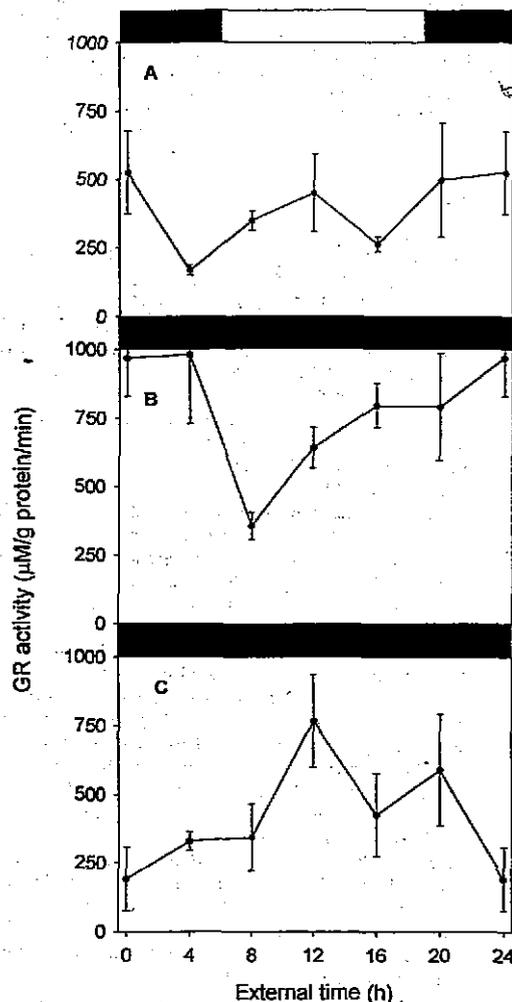


Figure 1. Chronograms of GR activity in crayfish midgut gland after: (a) LD; (b) 24 h in DD; and (c) 72 h in DD. Values are means \pm SE. Black and white bars in the upper part of each graph indicate light and dark periods. See text.

with a period of 24 h (PR 40.3%, acrophase of 18.31 h and PR 33.6%, acrophase of 21.3 h, respectively). However, after 72 h of darkness this oscillation has a rhythm of 12 h (PR 43.7%, acrophase of 2.61 h). Conversely, Cosinor analysis suggests that GSSG oscillations have rhythms with periods of 12 h after LD 12:12 and after 72 h of darkness (PR 47.6%, acrophase of 2.4 h and PR 38.5%, acrophase of 6.47 h, respectively) but a rhythm with a period of 24 h (PR 89.9%, acrophase of 18.06 h) after 24 h of darkness. The GSH/GSSG ratio oscillations shown in Fig. 2d-f further emphasize the oscillation of these parameters. Cosinor analysis suggests that these bimodal oscillations have rhythms with

Table 1. Single cosinor analysis of chronograms from GSH, GSSG, GSH/GSSG ratio and GR in midgut gland of crayfish under different conditions*.

Variable	Period (h)	Mesor (μ M)	Amplitude (μ M)	Acrophase (h)	PR (%)
LD Midgut					
GSH	24	841.3 \pm 27.29	145.23	18.31	40.3
GSSG	12	267.21 \pm 7.87	48.58	2.4	47.6
GSH/GSSG†	12	3.55 \pm 0.118	1.1	8.7	69.5
GR‡	12	375.4 \pm 13.11	118.9	10.58	66.2
24 h DD Midgut					
GSH	24	539.49 \pm 18.33	84.55	21.30	33.6
GSSG§	24	181.64 \pm 1.65	31.88	18.06	89.9
GSH/GSSG	12	3.1 \pm 0.07	0.45	9.6	49.3
GR	24	739.46 \pm 25.38	214.133	22.28	62.9
72 h DD Midgut					
GSH	12	210.64 \pm 5.36	30.59	2.61	43.7
GSSG	12	40.73 \pm 6.27	34.18	6.47	38.5
GSH/GSSG¶	12	68.1 \pm 9.38	81.67	0.022	64.3
GR#	24	441.93 \pm 17.78	182.61	13.79	71.5

*Values are taken from data shown in Figs. 1 and 2. Values are means \pm SE.

†Amplitude differs significantly from zero, $F = 23.93$, $P < 0.05$.

‡Amplitude differs significantly from zero, $F = 20.57$, $P < 0.05$.

§Amplitude differs significantly from zero, $F = 93.41$, $P < 0.05$.

||Amplitude differs significantly from zero, $F = 24.5$, $P < 0.05$.

¶Amplitude differs significantly from zero, $F = 19.5$, $P < 0.05$.

#Amplitude differs significantly from zero, $F = 26.37$, $P < 0.05$.

a period of 12 h (PR 69.5, 49.3 and 64.3%, respectively) in the three conditions studied. Table 1 shows the Cosinor statistical significance for these rhythms.

The state of the glutathione hemolymph parameters fluctuates with daily oscillations under LD and DD conditions (Fig. 3a-f). The chronograms of Fig. 3a-c show the temporal relation between the apparent bimodal and unimodal daily GSH and GSSG oscillations under LD and after the crayfish were submitted to DD for 24 and 72 h. Cosinor analysis suggests that the GSH oscillations have rhythms with 12 h periods after LD (PR 66.4%, acrophase of 3.03 h) and after 72 h of darkness (PR 40.7%, acrophase of 7.2 h) and a rhythm with 24 h period after 24 h DD (PR 91.9%, acrophase of 2.7 h). The GSSG oscillations best fitted a period of 24 h after LD and after 24 h of darkness (PR 58.5%, acrophase of 5.24 h and PR 85.7%, acrophase of 23.2 h, respectively). These oscillations best fitted a 12 h period after 72 h of darkness (PR 37.5%, acrophase of 6.9 h). After LD the GSH/GSSG ratio showed an oscillation suggesting a rhythm with a 12 h period (PR 40.2%, acrophase of 1.79 h). Interestingly, this ratio showed evident oscillations that best fitted periods of 24 h after 24 and 72 h of darkness (PR 52 and 97.5%, acrophase of 7.64 and 2.4 h, respectively). Table 2 shows the results of the Cosinor analysis.

DISCUSSION

The results of the present study demonstrate the daily and circadian changes in midgut GR activity as well as in glutathione status in both the midgut and hemolymph of the adult *P. clarkii*.

Some of these rhythmic changes appear to be driven en-

74

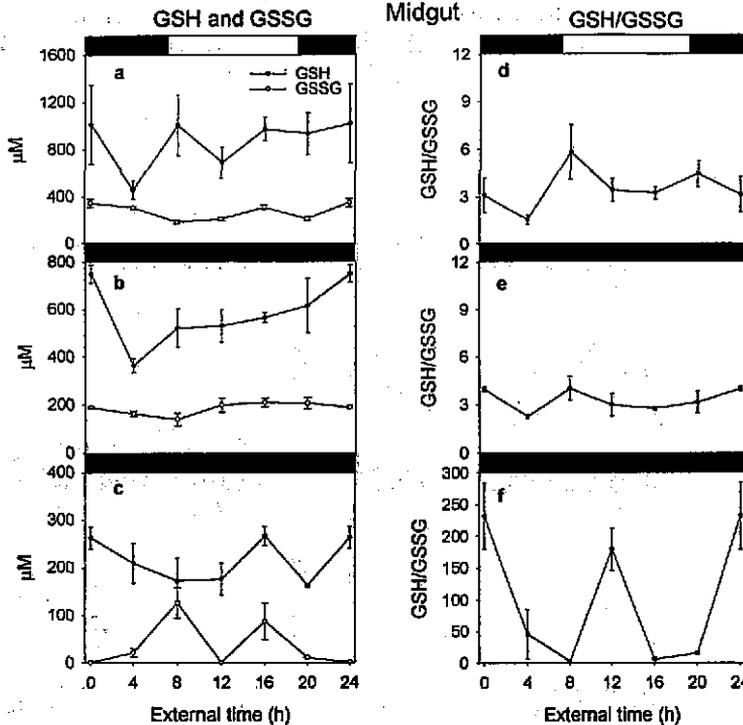


Figure 2. Chronograms of GSH, GSSG and GSH/GSSG ratio in crayfish midgut gland. GSH and GSSG concentration after: (a) LD; (b) 24 h in DD; and (c) 72 h in DD. GSH/GSSG ratio after: (d) LD; (e) 24 h in DD; and (f) 72 h in DD. Values are means \pm SE. Black and white bars in the upper part of each graph indicate light and dark periods. See text.

dogenuously since they continue to run freely, after 72 h of darkness, changing their phase (GSH/GSSG ratio and GR in midgut and GSH/GSSG ratio in hemolymph). Some of these rhythms are able to synchronize to LD cycles, as indicated by the period value of the GSH and GSSG oscillations ($\tau = 24$ h). These observations indicate that the clock was set to the zeitgeber cycle and that in crayfish there is a pacemaker coupled to the glutathione system, one of the most important systems related to antioxidant defense in all organisms (13). In the current work Cosinor analysis did not validate some of the glutathione rhythms for $\tau = 24$ h. This could be due to the asymmetrical waveform of the oscillations that, in some cases, might underlie either the harmonic or the ultradian bursts. We believe that both the chronograms and the Cosinor analysis—the appropriate methodology due to the nature of the data—indicate glutathione circadian oscillations.

Herein we demonstrate for the first time that in the midgut of the crayfish a major antioxidant enzyme GR as well as its substrate and product GSH/GSSG exhibit circadian rhythms. GSSG is also the product of another important antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx). Although circadian changes of this enzyme's activity were not determined in this work, the daily changes in the GSH/GSSG ratio might reflect the circadian oscillations of both enzymes.

In crayfish there are some reports on the changes in glutathione and glutathione transferase content in the midgut of *P. clarkii* under toxic stress (5,14) as well as in hemolymph glutathione status under photooxidative stress (4), but to date this is the first report on the circadian changes in this antioxidant system.

ROS are normally produced during aerobic metabolism and oxidative stress. Hence the exercise, a factor determining metabolic rate increase, as well as light irradiation producing photooxidation are both factors that determine ROS in different animals (15–17). On the one hand, in the crayfish *P. clarkii* oxidative stress, subsequent to high-irradiance LD 12:12 cycles, has been documented (4), and, on the other, circadian activity rhythm has been extensively studied (for review see Fanjul-Moles [18]). This animal exhibits a nocturnal unimodal endogenous rhythm that runs free under DD conditions, synchronizing to LD cycles with a small burst of activity after lights-on and to an endogenous peak after lights-off (2). The cyclic variations in activity have been related to this animal's 24 h variations in metabolic rate. Rhythmic changes in oxygen consumption associated to rhythmic activity have been reported in the dwarf crayfish (1) and the crayfish *Orconectes nais* (19). In these species the metabolic rate remained low and uniform throughout day, increasing after lights-off, to peak during the subjective

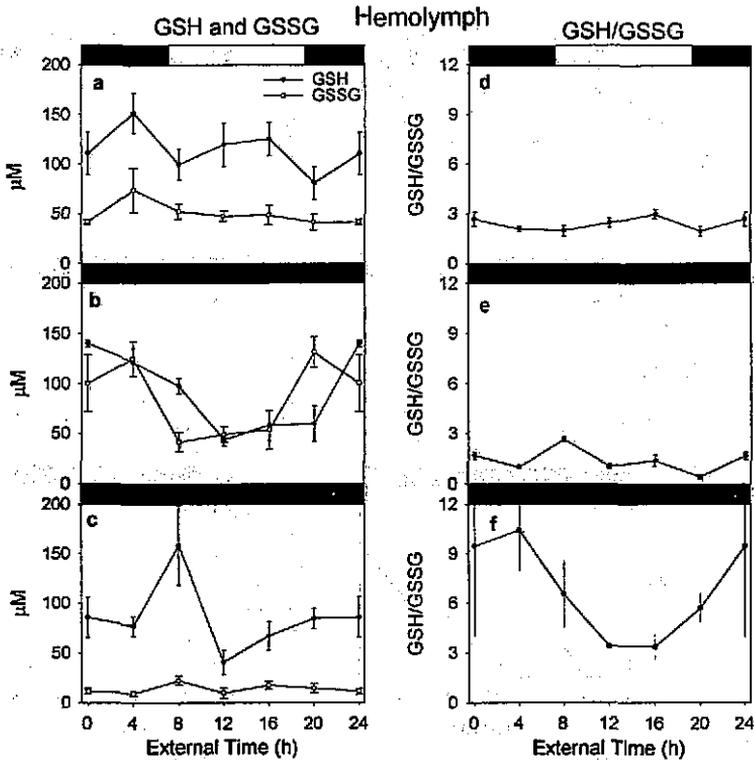


Figure 3. Chronograms of GSH, GSSG and GSH/GSSG ratio in crayfish hemolymph. GSH and GSSG concentration after: (a) LD; (b) 24 h in DD; and (c) 72 h in DD. GSH/GSSG ratio after: (d) LD; (e) 24 h in DD; and (f) 72 h in DD. Values are means \pm SE. Black and white bars in the upper part of each graph indicate light and dark periods. See text.

Table 2. Single cosinor analysis of chronograms from GSH, GSSG and GSH/GSSG ratio in hemolymph of crayfish under different conditions

Variable	Period (h)	Mesor (μM)	Amplitude (μM)	Acro-phase (h)	PR (%)
LD Hemolymph					
GSH†	12	114.37 ± 2.11	19.21	3.03	66.4
GSSG	24	50.83 ± 1.26	9.69	5.24	58.5
GSH/GSSG‡	12	2.35 ± 0.045	0.237	1.79	40.2
24 h DD Hemolymph					
GSH†	24	86.7 ± 1.95	42.52	2.7	91.9
GSSG§	24	83.4 ± 2.72	43.113	23.2	85.7
GSH/GSSG	24	1.38 ± 0.083	0.56	7.64	52.4
72 h DD Hemolymph					
GSH	12	85.5 ± 4.42	28.6	7.2	40.7
GSSG	12	14.12 ± 0.57	2.8	6.9	37.5
GSH/GSSG	24	6.4 ± 0.085	3.8	2.4	97.5

*Values are taken from data shown in Fig. 3. Values are means \pm SE.

†Amplitude differs significantly from zero, $F = 20.73$, $P < 0.05$.

‡Amplitude differs significantly from zero, $F = 118.89$, $P < 0.05$.

§Amplitude differs significantly from zero, $F = 62.91$, $P < 0.05$.

||Amplitude differs significantly from zero, $F = 409.28$, $P < 0.05$.

night of crayfish when motor activity increased. In the current work the temporal relation among the phases of glutathione parameter rhythms, always peaking during the subjective night when the rhythms were in LD or free running, indicates an internal temporal order regulating the redox status of the crayfish, a consequence of the circadian rhythms in endogenous metabolism and activity. However, it should be noted that nothing about the possible causal relationship between these functions can yet be concluded. Interestingly, the rhythm parameters analyzed by graphic and Cosinor analysis revealed the effect of oxidation produced by light, as reported elsewhere (4). In the present work when the crayfish were submitted to DD conditions, the Cosinor test revealed an increase in the amplitude and mesor of the GSH/GSSG ratio and GR rhythms. This fact as well as the two-fold increase of GR activity and GSH concentration when crayfish were changed from LD to darkness are indicators of the liberation of light prior to photooxidation. The effect of dark conditions on the GSH rhythm parameters, mesor and amplitude indicate that, like most functions of this nocturnal species, the function of the GSH system might be restricted to the dark phase of the day and vary depending on the proportion of the dark light in the LD cycle. Although there

are no precedents in the crustaceans, similar rhythms of antioxidant enzymes have been reported in other organisms including microalgae and plants (20–22). Interestingly, 24 h rhythms in GPx and GR activity have been reported in the cerebral cortex and brain of the rat and the chick (23,24). The acrophases of these rhythms were found in the dark phase and related to a physiological increase of melatonin, an antioxidant hormone, at night. This suggests that the GSH enzymatic activity may be related to the melatonin rhythm. Recently, circadian rhythms of melatonin and serotonin *N*-acetyltransferase have been reported in the eyestalk of *P. clarkii* (25). Data from our laboratory reported cyclic changes in serotonin, a precursor of melatonin synthesis, in the eyestalk and brain of the same species (26,27). Hence, the results of the current study suggest further experiments to elucidate the rhythmic mechanisms underlying the rheostasis of the redox status of crayfish.

Acknowledgements—This work is part of the doctoral thesis of Ma.E.D.-L. (CONACYT scholarship 95801) and was partially supported by CONACYT PM-31858-N. We are grateful to Dr. Adolfo Andrade-Cetto and M. En C. Patricia Guzmán-Bazán for their technical support as well as to Ms. Isabel Pérez-Monfort for the editorial revision of the manuscript.

REFERENCES

- Fingerman, M. (1955) The rate of oxygen consumption of the dwarf crawfish *Cambarellus shufeldtii*. *Tulane Stud. Zool.* 3, 103–116.
- Page, T. L. and J. L. Larimer (1975) Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97, 59–80.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Prieto-Sagredo, J., I. Ricalde-Recchia, M. E. Durán-Lizarraga, M. E. Gonshebbat and M. L. Fanjul-Moles (2000) Changes in hemolymph glutathione status after variation in photoperiod and light-irradiance in crayfish *Procambarus clarkii* and *Procambarus digueti*. *Photochem. Photobiol.* 71, 487–492.
- Almar, M. M., J. Díaz-Mayans and F. J. Romero (1987) Glutathione content and GSH S-transferase activity in midgut gland of *Procambarus clarkii*. Sex differences, the effect of fasting, and their implications in cadmium toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.* 87C, 433–435.
- Hissin, P. J. and R. Hilf (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74, 214–226.
- Bompart, G. J., D. S. Prevot and J. L. Bascands (1990) Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. *Clin. Biochem.* 23, 501–504.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7, 248–254.
- Halberg, F., F. Carendente, G. Cornelissen and G. S. Katinas (1977) Glossary of chronobiology. *Chronobiologia* 4, 1–189.
- Nelson, W., Y. Liang-Tong, J. K. Lee and F. Halberg (1979) Methods for Casinor rhythmometry. *Chronobiologia* 6, 305–323.
- Aguilar-Roblero, R., A. Salazar-Juárez, J. Rojas-Castañeda, C. Escobar and L. Cintra (1997) Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats. *Am. J. Physiol.* 273, R1321–R1331.
- Reinberg, A. and M. H. Smolensky (1983) Investigative methodology for chronobiology. In: *Biological Rhythms and Medicine. Cellular, Metabolic, Physiopathologic and Pharmacologic Aspects* (Edited by A. Reinberg and M. H. Smolensky), pp. 23–46. Springer, New York.
- Anderson, M. E. and A. Meister (1980) Dynamic state of glutathione in blood plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *J. Biol. Chem.* 255, 9530–9533.
- Almar, M., L. Otero and C. Santos, J. González-Gallego (1998) Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *J. Environ. Sci. Health* 33B, 769–783.
- Hara, M., M. Iigo, R. Ohtani-Kaneko, N. Nakamura, T. Suzuki, R. J. Reiter and K. Hirata (1997) Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats. *Biol. Signals* 6, 90–100.
- Savoure, N., M. Maudet, M. Nicol, M. A. Pelissier, R. Albrecht, G. Briand and A. Combre (1996) Modulation of ultraviolet light-induced oxidative stress in mice skin related to dietary vitamin A and selenium intake. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 66, 306–315.
- Kim, J. D., R. J. McCarter and B. P. Yu (1996) Influence of age, exercise, and dietary restriction on oxidative stress in rats. *Aging* 8, 123–129.
- Fanjul-Moles, M. L. (1998) Ontogenetic study of a circadian rhythm in crayfish: pacemaker and entrainment. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 5, 153–160.
- Rice, P. R. and K. B. Armitage (1974) The effect of photoperiod on oxygen consumption of the crayfish *Orconectes nats*. *Comp. Biochem. Physiol.* 47A, 261–270.
- Ramallo, C. B., J. W. Hastings and P. Colepicolo (1995) Circadian oscillation of nitrate reductase-activity in *Gonyaulax polyedra* is due to changes in cellular protein-levels. *Plant Physiol.* 107, 225–231.
- Hollnagel, H. C., P. Di Mascio, C. S. Asano, O. K. Okamoto, C. G. Stringher, M. C. Oliveira and P. Colepicolo (1996) The effect of light in the biosynthesis of β -carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 105–110.
- Boldt, R. and J. G. Scandalios (1997) Influence of UV-light on the expression of the Cat2 and Cat3 catalase genes in maize. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 505–514.
- Díaz-Muñoz, M., R. Hernández-Muñoz, J. Suárez and V. Chagoya-de-Sánchez (1985) Day–night cycle of lipid peroxidation in rat cerebral cortex and their relationship to the glutathione cycle and superoxide dismutase activity. *Neuroscience* 16, 859–863.
- Pablos, M., R. Reiter, G. Ortiz, J. Guerrero, T. Agapito, J. I. Chuang and E. Sewernak (1998) Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem. Int.* 32, 69–75.
- Agapito, M. T., B. Herrero, M. I. Pablos, J. L. Miguel and J. M. Recio (1995) Circadian rhythms of melatonin and serotonin-*N*-acetyltransferase activity in *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A, 179–185.
- Escamilla-Chimal, E., C. García-Rivera, V. Romero-Díaz and M. L. Fanjul-Moles (1998) The retina of crayfish *Procambarus clarkii* during development show serotonin and tryptophan hydroxylase immunoreactivity daily changes. *Biol. Rhythm Res.* 29, 1–9.
- Castañón-Cervantes, O., B. Batelle and M. L. Fanjul-Moles (1999) Rhythmic changes in the serotonin content of the brain and eyestalk of crayfish during development. *J. Exp. Biol.* 202, 2823–2830.