



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VARIACIONES CIRCADIANAS DEL CONTENIDO
DEL SISTEMA GLUTATIÓN EN ESTRUCTURAS
MARCAPASO DEL ACOCIL *Procambarus clarkii*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

HUGO IVAN CRUZ ROSAS

TUTORA:

DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA



Facultad de Ciencias
UNAM

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

*La “ciencia triste” seguirá siéndolo mientras
se la enseñe y se la estudie en un vacío histórico*

Leo Huberman

A mis abuelitas: **Petra Gómez, Albina Cruz y Guadalupe Pérez;** mi abuelo **Andrés Luna** y a quienes sus consejos han llegado a mí en libros y sentimientos (algunos más viejos que otros [KM, ALH, PF, JR, MM, FE, VIL, RD, LCB, EZ, PV, RFM, BB, VJ, AP, EG, PIT... y muchos etc., más]).

A mis Padres: **Marisa Rosas y Pedro Cruz.**

A mis hermanos: **Oscar y Ariana;** a **Esteban** y a todos y cada uno de **mis familiares:** por creer en mí y mostrarme siempre y en tan numerosas formas todo su apoyo y cariño incondicional, y por darme su confianza.

Un agradecimiento especial para mi profesor **Julio Alejandro Prieto Sagredo,** por todo lo que he aprendido de él y por su apoyo y aprecio.

Agradecimiento muy importante tiene lugar para la **Dra. María Luisa Fanjul-Moles** por todos sus consejos, apoyo y tiempo dedicado: Gracias.

Gracias también a todos los que forman parte del Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias (U. N. A. M.); y que hacen agradable la estancia y el trabajo fraterno en él, entre todos a la **Dra. Elsa Escamilla, Biol. Marlen Valdés, Rosa María Amado** y a todos quienes hemos compartido este tiempo.

Un especial agradecimiento a la **Dra. María Eugenia Gonsebatt, Dra. Marcela Aguilar, Dra. María Luisa Fanjul, M. en C. Julio Prieto y Dra. Elsa Escamilla;** quienes formaron parte del jurado y quienes efectuaron la revisión de esta tesis. Gracias por su tiempo y comentarios.

Así, solo al final de esta hoja (y solo de esta hoja) agradezco a cada uno de **mis amigos y amigas,** por creer siempre en mí; aunque a veces las cosas no han sido fáciles (y aunque otras tantas tampoco han sido tan difíciles en realidad), siempre hemos estado de alguna manera juntos: esto es gracias a ustedes... **M, E, JR, M y A (3c), O, O, L, F(P), R, JC, R, M, D, O, E, V, J, M, M, A, A, F, A, A, M, A, L, K, E, V, J, M, M, R, O, A, P...**

Nada hubiese sido igual si no hubiéramos cruzado nuestros caminos en algún punto, por breve que haya sido el tiempo o no.

Este trabajo se realizó con el apoyo de **CONACyT 46193-Q y PAPIIT 207008.** 

ÍNDICE	Págs.
RESUMEN.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	4
I. 1. Ritmos Biológicos.....	4
I.1.a. Generalidades.....	4
I.1.b. Ritmos circadianos.....	7
I. 2. El Acocil <i>Procambarus clarkii</i> como Modelo en el Estudio de los Ritmos Biológicos.....	8
I. 2. a. Generalidades.....	8
I. 2. b. Taxonomía.....	9
I. 2. c. Biología general de <i>P. clarkii</i>	10
I. 2. d. Retina, lóbulo óptico y ganglio cerebroide.....	11
I. 2. e. <i>Procambarus clarkii</i> como modelo experimental.....	13
I. 2. f. Respuesta a la luz.....	14
I. 3. Estrés Oxidativo.....	16
I. 3. a. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno.....	16
I. 3. b. Sistema antioxidante del glutatión (GSH).....	18
I. 4. La Luz como un Factor de Estrés Oxidativo.....	22
I. 5. El Metabolismo como un Factor de Estrés Oxidativo.....	24
I. 6. Ritmos Circadianos y Estrés Oxidativo.....	25
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
III. HIPÓTESIS.....	30
IV. OBJETIVOS.....	31
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
VI. RESULTADOS.....	37
VII. DISCUSIÓN.....	44
VII. 1. Ajuste de los Datos.....	44
VII. 2. Ritmicidad de las Variables.....	45
VII. 3. Posibles Aplicaciones.....	50
VIII. CONCLUSIONES.....	53
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	54

RESUMEN

En esta tesis se determinaron las variaciones diarias y circadianas de la oxidación producidas por la luz y el metabolismo en la Retina y el Complejo Ganglio Cerebroide-Lóbulo Óptico (GC-LO) del acocil *Procambarus clarkii*, así como la capacidad de estas estructuras para antagonizar la oxidación mediante el Sistema Glutación. Por medio de protocolos experimentales en los que se utilizaron ciclos de 24 horas de luz-oscuridad y oscuridad continua se encontró que tanto la retina como el GC-LO producen las enzimas Glutación Peroxidasa (GPx) y Glutación Reductasa (GRd), las que muestran oscilaciones diarias significativas relacionadas con el ciclo luminoso y el metabolismo. La retina es capaz de antagonizar la oxidación producida por la luz aumentando la concentración de GRd durante la fotofase y de la GPx en la escotofase, periodo en el que aumenta el metabolismo en esta estructura. En tanto que el GC-LO parece anticiparse a los cambios luminosos y metabólicos aumentando la concentración de ambas enzimas antes de la fase luminosa y antes de la fase oscura. En condiciones de oscuridad constante la GRd en retina mostró un ritmo circadiano significativo en antifase con los ritmos metabólicos y lipoperoxidativos. Puesto que ambas estructuras mostraron una mayor peroxidación en la condición de oscuridad constante que en la de luz-oscuridad, estos resultados indican que las enzimas del sistema glutación antagonizan con mayor eficacia el daño foto-oxidativo que el metabólico. Los cambios circadianos encontrados en esta tesis parecen reforzar la propuesta de que tanto la retina como el complejo ganglio cerebroide-lóbulo óptico funcionan como estructuras marcapaso en el sistema antioxidante del glutación en este organismo. 

Palabras clave: *Ritmos circadianos, estrés oxidativo, especies reactivas del oxígeno, sistema antioxidante del glutación, Procambarus clarkii.*

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. Ritmos Biológicos

I. 1. a. Generalidades

La historia de la vida se encuentra intrínsecamente ligada a la historia de la Tierra, cambiando y evolucionando a la par, modificándose una a la otra y definiendo una estrecha relación adaptativa¹ de los seres vivos a su entorno ambiental. De este modo, la vida como un fenómeno producto del avance en la complejidad de la organización de la materia se ha visto influida por los fenómenos propios de la Tierra; algunos de estos procesos definieron ambientes cíclicos desde etapas muy tempranas en la formación del planeta y han estado presentes desde la aparición de la vida, y han determinado el desarrollo en un orden de tiempo en los organismos.

Así, procesos existentes en el Universo se encuentran en nosotros como seres organizados de una manera especial, donde son manifestados como vida, pues no se dan por separado: no existe organismo vivo sin un ambiente externo y no existe este último sin el primero. Pues como dijera Alfonso Luís Herrera (1924): *“El concepto clásico de la vida, supuesta aislada, exclusiva de la Tierra, de cierto período geológico y de sustancias especiales albuminoides, casi equivale a pretender que la vida es una enfermedad de la materia”*.

De este modo la evolución de los seres vivos se ha realizado en respuesta de dos aspectos generales: su organización con respecto al espacio-ambiente y su concomitante arreglo en el tiempo. La primera responde más evidentemente al desarrollo de estructuras morfológicas, mientras que la segunda a la respuesta de los sistemas biológicos con respecto a momentos en el tiempo producidos por características ambientales; esto se hace evidente principalmente en procesos fisiológicos, metabólicos y conductuales.

¹ Según teorías evolutivas actuales, principalmente definidas por R. C. Lewontin (*La pensée* No. 223, sept, 1981; traducción al español de Adolfo Olea), que sugieren cambiar el término de Adaptación, por el de Construcción; se entiende aquí como adaptación a la respuesta bidireccional de los organismos ante condiciones del medio según la construcción de nichos ambientales por parte de estos sistemas biológicos para lograr su trascendencia en el tiempo.

Estos procesos biológicos dados en un momento temporal definido en un medio, son evidencia del acoplamiento entre la actividad de los organismos vivos y su entorno; donde los fenómenos cíclicos han representado condiciones predecibles en los sistemas vivos como lo hicieron notar Colin Pittendrigh y Jürgen Aschoff con sus trabajos sobre ritmos biológicos hacia la década de 1960.

De esta manera, evolutivamente los organismos fueron capaces de predecir y anticipar los cambios rítmicos del entorno en que definen sus nichos ambientales, adaptando diversos procesos fisiológicos, metabólicos y conductuales en distintos momentos dentro de un periodo ambiental, a distintas escalas de tiempo (días, meses, años). Esto generó patrones rítmicos en estas variables biológicas, las cuáles son los denominados **Ritmos Biológicos**, que son las variables en los organismos que pueden ser medidas y son controlados por procesos genéticos dentro del organismo capaces de responder a cambios rítmicos según el momento temporal dentro de un periodo ambiental por medio de un asa de retroalimentación negativa para generar una salida oscilante de las variables en relación de su entorno; mecanismo que en su conjunto celular ha sido denominado como **Reloj Biológico**; término análogo a los instrumentos humanos desarrollados para la medición del tiempo en lapsos constantes y periódicos, es decir: los sistemas biológicos en verdad son capaces de “dar la hora” por medio de la expresión de una variable en relación a un momento ambiental.

Bien, todo ritmo biológico se encuentra determinado genéticamente por el reloj biológico, hecho que les da un carácter **endógeno**, además de **hereditario**: si bien un ritmo biológico necesita de las oscilaciones del ambiente para expresar su periodo exacto en tiempo con respecto al periodo de la oscilación ambiental, aún ante la carencia de cualquier referencia del medio en organismos aislados de su entorno y colocados en condiciones constantes, es decir, sin ritmos ambientales (*zeitgeber*); las oscilaciones dentro del sistema biológico se mantienen en periodos estables que varían ligeramente en relación con la duración del periodo ambiental, expresando un **periodo endógeno**, denominado por la letra griega τ (*tau*) y que tiende, ante la presencia de las referencias cíclicas ambientales, a una duración exacta del **periodo externo** (ambiental) o **T**; pudiéndose sincronizar a éste en cuanto a duración del periodo y acaecimiento de sus fases. Este fenómeno se conoce como **sincronización** (externa), y se puede expresar

por la fórmula $\tau \rightarrow \tau^* = T$, donde τ^* representa el periodo endógeno sincronizado al tiempo externo y que es igual al periodo ambiental.

Los sistemas biológicos son complejos en las relaciones entre sus ritmos, presentando más de una variable rítmica; por lo que el fenómeno de sincronización también se da de manera interna, donde la oscilación de una variable se encuentra en una **relación de fase** específica con las demás variables cíclicas y reguladas por el reloj biológico que puede estar constituido por uno o más **osciladores centrales**. Estos osciladores, capaces de generar cambios cíclicos, pueden agruparse en regiones anatómicas del organismo para constituir los llamados **marcapasos** (o estructuras marcapaso); y que son capaces de regular la ritmicidad dentro del sistema tanto en periodo, frecuencia y amplitud del ritmo con respecto a las referencias externas, presentando así una **sincronización interna**.

Para clasificar los ritmos biológicos y poder sistematizar su estudio, se emplean dos criterios: por una parte, se clasifican **según la frecuencia**, es decir el valor recíproco del periodo. Un ritmo biológico que tiene un periodo mayor que 24 horas se denomina **infradiano**, pues su frecuencia es menor a $1/24$ (Dunlap *et al.*, 2004); considerándose como tal si este último se produce con un periodo mayor de 28 horas. Los ritmos **ultradianos**, en cambio, se denominan así debido a que su frecuencia es mayor dentro de un lapso equivalente a un día, por lo que su periodo es significativamente menor a 24 horas (Dunlap *et al.*, 2004); siendo tal si su periodo se da por debajo de las 19 horas (Hiriart en Fanjul, *et al.*, 1998).

El segundo criterio para clasificar los ritmos está basado en su **capacidad de sincronización a cambios cíclicos externos**, evidenciada por la duración del periodo endógeno del ritmo. En base a esto existen ritmos **circamareales**: dos mareas bajas y dos altas en un día lunar; **circalunares**: con un periodo equivalente al de un mes lunar de 29.5 días terrestres; **circanuales**: con periodos cercanos a un año terrestre y los **circadianos**: cercanos a un día (Hiriart en Fanjul, *et al.*, 1998). En esta introducción haremos mayor énfasis en los ritmos circadianos por ser la base del estudio en este trabajo.

I. 1. b. Ritmos circadianos

Hemos hablado de que los ritmos biológicos pueden ser definidos de acuerdo a la duración de su periodo endógeno al sincronizarse a los cambios externos. Atendiendo a la particularidad de que el valor del periodo endógeno del ritmo difiere ligeramente del periodo ambiental, se les confiere el término *circa-* por el prefijo en latín “cercano”.

Dado que la alternancia del día y la noche es el ciclo ambiental más conspicuo y tiene un valor de periodo con una duración de 24 horas, lo que coincide con variaciones de temperatura producidas por el ángulo de incidencia del Sol sobre la Tierra, los ritmos más frecuentemente estudiados y documentados entre los organismos vivientes son aquellos que tienen un periodo endógeno cercano a 24 horas, correspondientes a la duración de un día terrestre, llamándoseles **ritmos circadianos**, por su etimología del latín “cercanos a un día”; con periodos endógenos entre las 20 y 28 horas (Hiriart en Fanjul, *et al.*, 1998). Estos ritmos se han encontrado en prácticamente todos los organismos vivientes, desde los procariontes, cuando se agregan en colonias, hasta los primates, como el ser humano.

Un ritmo circadiano es la salida visible del reloj biológico capaz de oscilar en intervalos de tiempo cercanos a 24 horas en el organismo. Estos ritmos son endógenos, hereditarios, con una base genética, pueden detectar cambios en el fotoperiodo que les permite ajustar sus variables según el momento del año y son capaces de compensar la temperatura cuando el organismo es perturbado por variaciones repentinas de esta, siempre que estas variaciones no constituyan un **zeitgeber** (dador de tiempo o sincronizador). Estas variaciones diarias en los organismos se pueden observar tanto en plantas, al abrir y cerrar sus flores, durante la fotosíntesis en la alternancia de la fase de luz y de oscuridad del día, en la ciclosis de los cloroplastos, etc. Podemos observar también ritmos circadianos en los animales: los ciclos de actividad y reposo, del sueño y la vigilia, la sincronización por disponibilidad de alimento en un día, las variaciones de temperatura en organismos homeotermos, etc. En los acociles, los principales ritmos circadianos que se han reportado son el ritmo de actividad motora, la migración de los pigmentos accesorios de la retina y el consecuente ritmo de sensibilidad retiniana medida por la amplitud del electroretinograma (ERG). Estas variaciones diarias permanecen expresándose aún cuando el organismo es mantenido en condiciones

ambientales constantes pero desaparecen bajo ciertas condiciones como luz constante o brillante, e incluso ante cambios muy bruscos de temperatura.

Cabe mencionar que no toda variación diaria de un proceso biológico es debida al reloj circadiano: existen variables que alternan entre máximos y mínimos con duraciones periódicas de 24 horas que cuando son aisladas del medio y se les coloca en condiciones constantes, desaparecen; por lo que a estas variables diarias que no son endógenas se les ha llamado variaciones **nictemerales**, por los vocablos griegos νυκτος (niktos): noche y ημερα (heméra): día, dado que son reflejo más bien de la alternancia del día y la noche en un día terrestre y no del control endógeno del reloj circadiano.

I. 2. El Acocil *P. clarkii* como Modelo en el Estudio de los Ritmos Biológicos

I. 2. a. Generalidades

La palabra acocil proviene de dos vocablos de origen náhuatl: *atl* (agua) y *cuicilli* (sacudir), cuya interpretación etimológica suele darse como “el que se sacude en el agua” (del Valle, *et al.*, 2004), cuyo uso alimenticio es conocido desde tiempos prehispánicos en Mesoamérica, aunque por medio de otras especies nativas, como *P. digueti*. En la cuenca de México, principalmente del lago de Xochimilco eran capturados estos crustáceos por los mexicas, pudiendo aún encontrar poblaciones de estos decápodos hasta nuestros días.

Los acociles son los únicos decápodos representantes en agua dulce de los Reptantia macroquelata y son considerados como un grupo monofilético por Scholtz y Richter (1995) dentro de los crustáceos decápodos (citado por Holdich en Holdich, 2002).



Figura 1.- *Procambarus clarkii*. Vista dorsal de un acocil adulto. [Tomado de www.crayfishworld.org]



I. 2. b. Taxonomía

Taxonómicamente, dentro de los **invertebrados**, los acociles son un grupo de **crustáceos decápodos** (cuadro 1) denominado **Reptantia** del infraorden **Astacida** (Scholltz y Richter, 1995), el cuál engloba dos superfamilias: i) Parastacoidea (Huxley, 1878) con tres familias, y ii) **Astacoidea** (Deltann, 1841) con dos (Taylor C. A. en Holdich; 2002). De esta última, en los astácodos, se incluye la familia **Cambaridae** (Hobbs, 1942) con tres subfamilias, una de las cuales **Cambarinae**, contiene el género ***Procambarus*** (Ortmann, 1905) donde es clasificada la especie ***Procambarus clarkii*** (figura 1), en el subgénero *Procambarus* (Ortmann, 1905); de cuyo estudio aquí nos enfocamos (Taylor C. A. en Holdich; 2002).

Dominio	Eucaria
Reino	Animalia
Phylum	Invertebrata
Subphylum	Artropoda
Clase	Crustacea
Subclase	Decapoda
Orden	Reptantia
Suborden	Macrochelata
Infraorden	Astacida
Superfamilia	Astacoidea
Familia	Cambaridae
Subfamilia	Cambarinae
Género	<i>Procambarus</i>
Subgénero	<i>Procambarus</i>
Especie	<i>Procambarus clarkii</i>

Cuadro 1. Clasificación sistemática de *Procambarus clarkii*. Se presenta la principal clasificación de la especie y su ubicación taxonómica [Según Taylor en Holdich, 2002].

Tanto la familia Astacidae como Cambaridae presentan una distribución restringida al hemisferio norte, el origen evolutivo del plan corporal (bauplan) es incierto y en todos los acociles los estadios larvarios han sido embrionizados como una característica general común a todos los crustáceos superiores filogenéticamente hablando, por lo que presentan un desarrollo directo (Holdich en Holdich, 2002).

I. 2. c. Biología general de *P. clarkii*

Se trata de una **especie predominantemente nocturna** que, sin embargo, puede forrajear en distintas horas del día. Es un organismo filtrador usualmente empleado como bioindicador de aguas contaminadas.

Además, se ha reportado que durante el desarrollo ontogenético de este organismo, la maduración y el acoplamiento de las estructuras marcapaso de esta especie generan ritmos diurnos en sus primeros estadios de desarrollo hasta que el organismo adulto expresa las variables circadianas para una especie nocturna. Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo (2003) reportan que en una población experimental, solo el 50% de los animales en estadios juveniles presentan ritmicidad locomotora circadiana, incrementando el porcentaje al incrementar la edad de los organismos hasta en un 90% en los animales más viejos. Su patrón de **actividad es bimodal** y presenta un primer pico de actividad al inicio de la escotofase, mientras que el segundo pico de actividad se presenta antes del inicio de la fotofase y puede prolongarse algunas horas (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997).

Clasificada dentro de la familia Cambaridae, esta especie presenta una distribución geográfica comúnmente entre los 59° y 28° de latitud Norte; sin embargo se han reportado poblaciones de *P. clarkii* en latitudes más bajas, principalmente debido a su introducción con fines comerciales, desplazando especies nativas, por lo que ha sido considerada una **especie invasora**. Habita preferentemente en aguas someras, en charcos lodosos y en suelos fangosos de arroyos de corriente lenta; lugares donde cava madrigueras y túneles que le permiten protegerse durante el día y es capaz de soportar condiciones anaeróbicas (Durán-Lizarraga, 2002), por tal motivo es considerada una **especie anaerobia facultativa**.

En el caso particular de México, los datos oficiales registran que fue introducido al norte del país con fines comerciales a principios de 1900 y ha ido desplazando a las especies nativas al lograr una mayor adecuación sobre ellas y no hay datos de que se encuentre asociado a un tipo de vegetación a modo de algunas especies endémicas, como en el caso de *P. digueti*, aún cuando su asociación no es forzosa.

De esta manera, según estudios previos de Fanjul-Moles y colaboradores (1987) y Prieto-Sagredo y Fanjul-Moles (2001), en los acociles se presenta una respuesta a la luz que se relaciona tanto con la actividad eléctrica de los fotorreceptores visuales y extrarretinianos como con la migración circadiana de los pigmentos accesorios de la retina (Fingerman y Lowe, 1957). Siendo así la condición de iluminación uno de los factores que determinan la tasa de consumo de oxígeno en estos crustáceos decápodos (Fingerman y Argimiro, 1957; Rice y Armitage, 1974; Fanjul-Moles y colaboradores, 1998), incluso, para *P. clarkii*, se ha reportado que existe un cambio en la ruta metabólica de aerobia a anaerobia en condiciones de estrés luminoso. 

I. 2. d. Retina, lóbulo óptico y ganglio cerebroide

Al ser un invertebrado, este crustáceo decápodo es un organismo ectotermo, presenta un **sistema nervioso ganglionar** compuesto por una cadena de 13 ganglios (figura 2), la hemolinfa circula en un **sistema abierto** al interior del acocil, posee **ojos pedunculados y compuestos**, cuyos fotorreceptores se encuentran unidos al ganglio cerebroide por la porción denominada protocerebro (del Valle, *et al.*, 2004), conectada con el lóbulo óptico.

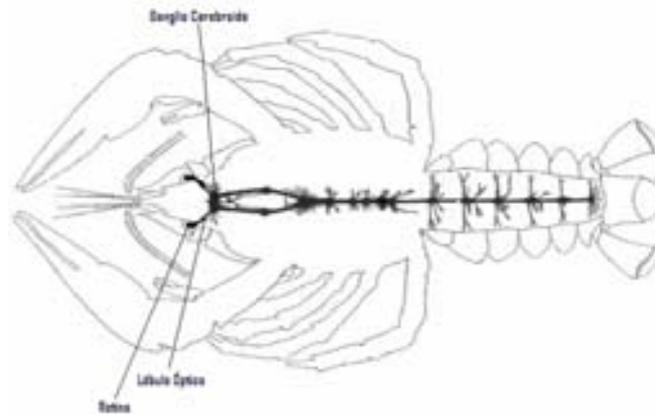


Figura 2.- Cadena Ganglionar, retina y lóbulo óptico. Se muestra una representación esquemática de la cadena ganglionar de *P. clarkii* con sus trece ganglios, resaltando el cerebroide, unido al lóbulo óptico y éste a la retina.

El **ganglio cerebroide** incluye cerca de 80,000 neuronas organizadas en neuropilos, cúmulos celulares periféricos y tractos neurales; y cuenta con un par de lóbulos accesorios que se han interpretado como centros sensoriales integrativos resultantes del linaje evolutivo animal y también se han asociado al comportamiento nocturno del acocil. Por su parte, el **lóbulo óptico** (que conecta con la retina, por un lado, y con el ganglio cerebroide por medio de la porción del protocerebro, por el otro), incluye a la *lámina ganglionaris* (que conecta con la retina), la médula externa, la médula interna, el complejo órgano X-glándula sinusal y el cuerpo hemielipsoidal. Por último, la **retina** esta formada por ocho células retinulares: siete que proyectan sus microvellosidades con una orientación opuesta al centro de la omatidia, y una más accesorias. Estas capas de microvellosidades forman el rabdomo que absorbe la luz. Al tener ojos compuestos, cada omatidia es la estructura funcional del ojo (Vogt, en Holdich, 2002).

Tanto el Ganglio Cerebroide, como el Lóbulo Óptico y la Retina son estructuras propuestas como posibles marcapasos del reloj circadiano de *P. clarkii* (para revisión Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo 2003). Esto significa que dichas estructuras tendrían no solo la posibilidad de generar los ritmos sino también de dirigir las salidas rítmicas del organismo en relación al tiempo externo, sincronizando el orden temporal interno como reportan Aréchiga y Rodríguez-Sosa (2002).

I. 2. e. *Procambarus clarkii* como modelo experimental

Nos hemos detenido en este modelo debido a que, en efecto un organismo está definido antes por entidades celulares y, por lo tanto, puede ser estudiado a distintos niveles de organización antes del organismo íntegro. Sin embargo, el objetivo de emplear este modelo es el de comprender cómo se encuentran las variables diarias y circadianas antioxidantes con respecto a periodos de 24 horas en la interacción entre las distintas estructuras anatómicas propuestas como posibles marcapasos del acocil; además de relacionar este posible comportamiento con los factores ambientales que interactúan con el organismo íntegro (que es como vive en realidad, no en partes separadas). Se puede contribuir así a la comprensión de las diferencias en comportamiento, adaptación y distribución de los diversos taxa pluricelulares, pues la interacción entre variables dentro de un sistema favorece la emergencia de nuevas propiedades² que solo se manifiestan en este nivel de organización, fundamentando el primer paso para un futuro estudio detallado de cada variable que integra al organismo como unidad en este nivel de organización.

Procambarus clarkii ha sido empleado como modelo experimental en la investigación cronobiológica desde hace varios años, entre otras causas debido a que, siendo la temperatura un sincronizador ambiental (un zeitgeber), el que se trate de un animal poiquilotermo nos confiere la capacidad de controlar la temperatura del organismo al controlar la temperatura experimentalmente. Por otra parte, el mantenimiento de esta especie en un laboratorio es relativamente sencillo y se cuenta con suficiente información para poder plantear hipótesis experimentales y desarrollar nuevos estudios.

En los acociles se ha obtenido información en el área de la fisiología, la neurobiología y la cronobiología. Experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio para tratar de entender la ontogenia del ritmo locomotor y de la sensibilidad retiniana,

² Según se ha observado en los niveles de organización de la materia, las propiedades definidas en un cuerpo cambian según interactúa con otro dentro de un sistema, originando nuevas propiedades que no eran manifiestas sino hasta la interacción entre estos. De este modo, un átomo presenta propiedades únicas según su naturaleza pero que en interacción con otros átomos genera propiedades novedosas. Las moléculas así formadas alcanzan nuevas propiedades al interactuar con otras moléculas o con átomos hasta formar macromoléculas con propiedades específicas a este nivel de complejidad; donde la progresiva complicación en las interacciones dentro de la materia van generando niveles de organización con propiedades emergentes propias de cada nivel de organización hasta los sistemas vivos e incluso los sistemas sociales.

así como ritmos metabólicos y antioxidantes han dado pie a concluir que el desarrollo de la ritmicidad circadiana depende de la maduración de las estructuras marcapaso así como del establecimiento de mecanismos y vías de acoplamiento entre éstas conforme se desarrolla el organismo, por lo que los ritmos son expresado gradualmente de manera más robusta conforme avanza la edad, aún cuando el reloj ya está presente y sea funcional desde la eclosión del acocil (Fanjul-Moles, 1998).

Se sabe además que la ritmicidad circadiana en estos crustáceos es controlada por un sistema multioscilario formado por osciladores independientes, que en el organismo intacto intervienen entre sí de diversas maneras, pero cuya naturaleza puede ser jerárquica con posibles marcapasos centrales; siendo dos de estos posibles marcapasos el lóbulo óptico y la retina (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 2002) que deben interactuar con otro marcapaso central: el cerebro (o ganglio cerebroide).

Por otra parte, los experimentos con luz permiten el control en varios esqueletos de fotoperiodo y a diferentes intensidades luminosas que incidan sobre todo el animal en condiciones restringidas, pues a pesar de ser organismos que cuentan con sistemas rítmicos de efectores pigmentarios para protegerse de la luz, estos pigmentos al ser fotosensibles son susceptibles a la foto-oxidación, y por lo tanto a reacciones redox que nos permiten estudiar los cambios rítmicos antioxidantes dependientes de la estimulación luminosa, como es el sistema glutatión. 

I. 2. f. Respuesta a la luz

A pesar de que en las horas de luz permanecen escondidos en sus madrigueras, los acociles de esta especie presentan respuestas ante estímulos luminosos del medio: existe una **respuesta fototáctica positiva** en las horas de oscuridad (Durán Lizarraga, 2002). Esto es coherente según lo reportado en la caracterización del ritmo de sensibilidad de la retina por medio de la amplitud del ERG, donde ha sido descrito un pico máximo durante la escotofase, donde la amplitud es grande cuando los pigmentos están en la posición adaptada a la oscuridad y es baja durante el estado adaptado a la luz (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003). Así, Aréchiga y colaboradores (1993), reportan que el umbral al cuál es alcanzada la respuesta a la luz varía en el ciclo luz-oscuridad, siendo menor durante la noche que durante el día, además de que la latencia a la respuesta disminuye en las primeras horas de oscuridad hacia la media noche, es decir, que la

respuesta a la luz se da con mayor facilidad y velocidad hacia la mitad de la fase de oscuridad en el ciclo de 24 horas.

Ya se ha mencionado que existe una variación circadiana a la respuesta de la luz en los fotorreceptores visuales y los extraretinianos, además de la migración de los pigmentos accesorios que definen el patrón circadiano de la amplitud del ERG; así como la capacidad que presenta *P. clarkii* de cambiar la ruta de obtención de energía de aeróbica a anaeróbica según las condiciones de iluminación, además de regular el consumo de oxígeno. De estas respuestas a la luz (en intensidad y duración), se ha reportado que tanto el proceso de muda como la maduración de las gónadas también se ven influidos por la luminosidad (Castañón-Cervantes *et al.* 1995; Fanjul-Moles *et al.* 2001).

En 1997, Kashiwagi y colaboradores reportaron que existe un daño funcional y estructural en los fotorreceptores de distintos crustáceos debida a la foto-oxidación de ácidos grasos insaturados cuando son expuestos a luz brillante. Incluso se tienen datos de que la luz afecta a las estructuras neurales y endócrinas encargadas de dirigir las variaciones metabólicas y conductuales (Durán Lizarraga, 2002).

Otros experimentos han demostrado que cuando se somete a esta especie a condiciones de luz en alta intensidad o con una duración de esta de 20 horas cada día, se efectúa una disminución en la tasa de consumo de oxígeno, incrementa la concentración de ácido láctico evidenciando rutas anaerobias y aumenta la concentración circundante en hemolinfa de glutatión reducido (GSH) como respuesta a estas condiciones de luz (Fanjul-Moles *et al.*, 1998; Prieto-Sagredo *et al.*, 2000). Sugiriendo esto que la luz es un factor importante que regula la distribución geográfica de esta especie y de muchas otras de crustáceos; por lo que la adaptación a cambios de iluminación en *P. clarkii* bien puede ser asociada a estrategias antioxidantes, metabólicas y conductuales capaces de variar tanto a lo largo de un día como según la estacionalidad anual; jugando un papel fundamental los ritmos biológicos en esta especie así como la capacidad de sincronización entre las variables y el medio. Dado que la sincronización por luz en los acociles es mediada por fotorreceptores extraretinianos, se ha establecido que las oscilaciones ultradianas del ERG pueden ser resultado de la maduración en el tiempo de las estructuras retinulares (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003), reguladas por un

marcapaso circadiano central localizado en el ganglio supraesofágico que se proyecta a la retina por axones eferentes en el nervio óptico (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998).



I. 3. Estrés Oxidativo

I. 3. a. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno

La manera en cómo se ha desarrollado la vida es dual, pues su misma conservación le origina situaciones que van en su contra, tanto en su actividad interna como en su desarrollo con el medio externo: la interacción con el ambiente, así como la misma obtención de energía para la autopropagación de los seres vivos, en nuestro caso aerobios, les confiere la generación inevitable de estas especies reactivas del oxígeno que, de no ser controladas, significarían la destrucción del organismo, y que inevitablemente son generadas y censadas a lo largo de su desarrollo en el tiempo, produciendo la vejez en el sistema. Según Olguín Albuerne, en su tesis de licenciatura, la muerte celular programada responde a distintas condiciones de estrés en el organismo (Olguín Albuerne, 2008); así pues, como dijera Claude Bernard: “*la vida es la muerte, la destrucción de los tejidos por la combustión*” (citado por Herrera, 1924; pag. 20).

Existen diversos procesos biológicos y factores ambientales que producen moléculas y/o átomos que causan daños estructurales y funcionales en los organismos debido a su inestabilidad química o a la generación de productos de ciertas reacciones en los organismos.

Las reacciones del metabolismo oxidativo en la transferencia de electrones dentro de la mitocondria y la irradiación principalmente del Sol sobre los seres vivos son algunos de los factores que producen estas moléculas o átomos inestables que se les denomina de manera general **radicales libres** y son capaces de existir de manera independiente aún cuando contienen uno o más electrones no apareados. Por su parte, cuando estos radicales libres presentan moléculas de oxígeno se les incluye dentro de las **Especies Reactivas del Oxígeno** (ROS, por sus siglas en inglés), que incluyen tanto radicales libres como no-radicales centrados en el oxígeno y que pueden ser convertidos fácilmente a radicales o son agentes oxidantes (Shaw, 1998).

De las especies reactivas, los radicales más comunes son el superóxido (O_2^-) y el hidroxilo (-OH), de éstos, el último altamente dañino en los sistemas vivos. Mientras que la especie reactiva no-radical más común en los sistemas biológicos es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), además del ácido hipocloroso (HOCl) y el peroxinitrito (ONOO) que son también especies reactivas no-radicales (Durán Lizarraga, 2002).

Estas especies reactivas del oxígeno son comúnmente originadas por la respiración aerobia y la actividad de los organismos, por lo que en la evolución biológica se han desarrollado moléculas y proteínas capaces de neutralizarlas y evitar el daño, estando normalmente en un balance tanto las defensas antioxidantes como las especies reactivas del oxígeno. Cuando este balance es roto y la proporción de ROS es mayor que los antioxidantes entonces el sistema no es capaz de neutralizar adecuadamente a las especies reactivas y se genera un daño en las biomoléculas, lo que se ha denominado como **Estrés Oxidativo**, debido a que toda situación ambiental que imprime una fuerza a un individuo y que no puede ser sobrellevada por éste se le denomina de manera general estrés y al factor un estresor; y que en este caso puede ser producto de la presencia tanto de ROS como de nitrógeno o de metales de transición (Durán Lizarraga, 2002), siendo además la luz un estresor en estos animales.

Dependiendo de la especie reactiva de la que se trate, la reactividad y la afinidad por un sustrato varían, así como si se trata de un agente reductor u oxidante. Sin embargo, en todas las reacciones originadas por ROS se desata una respuesta en cadena capaz de auto generar radicales libres. Entre las biomoléculas que son atacadas por ROS, los lípidos son sumamente susceptibles al daño directo e indirecto por acción de la oxidación lipídica, que al darse origina un carbono central en la molécula que provoca cambios estructurales, causando daño funcional y generando aldehídos citotóxicos (Durán Lizarraga, 2002) capaces de dañar a otras entidades celulares. De este modo, el estado entre estas especies reactivas del oxígeno y las moléculas antioxidantes en condiciones fisiológicas normales se encuentra en un balance que no es estático sino que varía según la producción de ROS aumenta o disminuye, aumentando o disminuyendo la cantidad de antioxidantes de manera directamente proporcional dentro de un intervalo específico.

Toda sustancia que al encontrarse en pequeñas cantidades sea capaz de retrasar o incluso inhibir la oxidación de un sustrato que se encuentra en mayores concentraciones que ésta se le a denominado como un **antioxidante** (Halliwell y Gutteridge, 1998), estos pueden ser de naturaleza protéica o no y actúan todas ellas dentro del organismo de manera sinérgica. Entre algunas de las moléculas antioxidantes más comunes en los sistemas biológicos se encuentran las destinadas a **prevenir la generación de radicales libres** como las enzimas catalasas, glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa (SOD); el glutatión reducido, el ácido ascórbico (vitamina C), la melatonina y el α -tocoferol forman el grupo de defensas antioxidantes destinadas a **neutralizar las especies reactivas que se han generado** (Shaw 1998).

De manera interna, las reacciones enzimáticas principalmente relacionadas con metabolismo aerobio son las que generan la gran mayoría de especies reactivas del oxígeno, así como diversas moléculas auto-oxidables como las quinonas y las catecolamidas. Dentro de las enzimas, las más comunes son las NADPH/NADH oxidasas, la acil coenzimaA oxidasa, la xantina oxidasa y los citocromos P-450 (Gamaley y Kluybin, 1999). Por su lado, los factores exógenos que favorecen la formación de ROS son la radiación tanto ultravioleta como ionizante, los contaminantes como el ozono (O₃) y la exposición a quimioterapia o a fármacos y antibióticos como el paracetamol (Finkel y Holbrook, 2000).

I. 3. b. Sistema antioxidante del glutatión (GSH)

Dentro de los organismos, existen diversos sistemas destinados a contrarrestar el daño por ROS y evitar el estrés oxidativo; dichos sistemas denominados antioxidantes incluyen las moléculas que ya se han mencionado, que son capaces de evitar la formación de ROS o neutralizar su acción una vez formados. Sin embargo, estas moléculas antioxidantes no actúan de manera separada o en momentos independientes, sino que tienen un efecto sinérgico dentro del organismo. Así, el glutatión trabaja en sinergia con los antioxidantes como el ácido ascórbico y el α -tocoferol, y desempeña un papel crucial en las reacciones mediadas por la SOD (Shaw, 1998).

El glutatión es un **tripéptido** conformado por los aminoácidos **glutamato, cisteína** y **glicina**, por acción de la enzima **GSH sintetasa** (figura 2). Es nombrado

químicamente como γ -L-glutamil, L-cisteinilglicina (Shaw, 1998) y ha sido referido como el principal **tiol no-proteico** contenido en todas las células animales; y según Holt (1993) es responsable del origen de la vida en la Tierra (citado por Shaw, 1998).

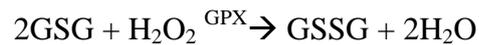


Figura 3.- Vía del Glutatión. Se presenta la principal vía de síntesis y degradación del GSH en los sistemas vivos. Nótese que la síntesis de GSH tiene una regulación por un asa de retroalimentación negativa sobre la γ -glutamilcisteína sintetasa. [Modificado de Shaw, 1998].

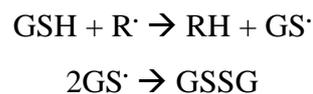
En los sistemas biológicos, el glutatión existe tanto en su **forma reducida (GSH)** como en su **forma oxidada disulfido (GSSG)**, manteniendo una proporción entre ambas que se ha llamado **estado del GHS** y ha sido empleado como el principal parámetro para determinar la viabilidad y la salud celular; dicho estado no es estático, sino que varía de manera dinámica según parámetros homeostáticos y responde a alteraciones en el ambiente celular (Shaw, 1998), y su participación en el sistema antioxidante que involucra su oxidación y reducción mediada por las respectivas enzimas glutatión reductasa (GRd) y glutatión peroxidasa (GPx) es uno de los más importantes y eficientes mecanismos en contra de ROS (Durán Lizarraga, 2002), así, por ejemplo en la transferencia de electrones dentro de la mitocondria, ésta importa GSH del citoplasma para neutralizar las especies reactivas que se generan.

El ciclo del glutatión (figura 3) incluye la **interconversión** de **GSH** a **GSSG** y viceversa por acción de las **enzimas GRd** y **GPx**, la primera cataliza la reducción del GSSG para obtener glutatión reducido, este GSH por acción de la GPx es oxidado

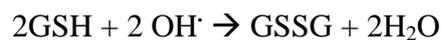
manteniendo la relación GSH/GSSG dentro del parámetro referido como estado del GSH. Por tal motivo, la GRd también nombrada como GSSG reductasa y la GPx como GSH reductasa (Shaw, 1998). Con esta propiedad, el glutatión puede actuar de manera directa o indirecta como un antioxidante: indirectamente, el GSH actúa como sustrato de la GPx para reducir el H₂O₂ y generar GSSG y agua, neutralizando esta especie reactiva en la reacción:



Directamente, el glutatión puede actuar de tres maneras, la primera en una reacción de oxidación con dos electrones, la segunda en un intercambio tiol-disulfido mediado por GSH y la tercera, y más frecuente: el GSH dona protones a un radical libre en la reacción:



Como el caso del radical hidroxilo:



En estos ejemplos, descritos por Shaw (1998), el glutatión es convertido constantemente en su forma oxidada y reducida, manteniendo el estado GSH y el equilibrio homeostático entre antioxidantes y ROS. Empero, debe recordarse que el sistema del glutatión no es el único que actúa en estas defensas, pero representa uno de los más eficientes y comunes mecanismos antioxidantes en los sistemas vivos.

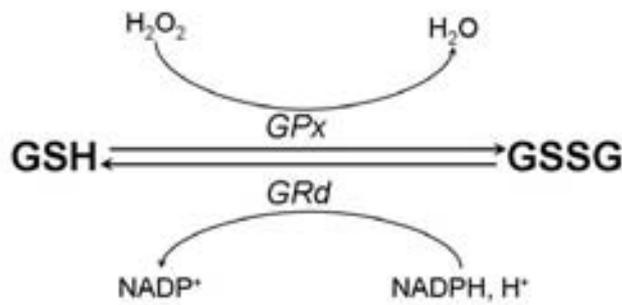
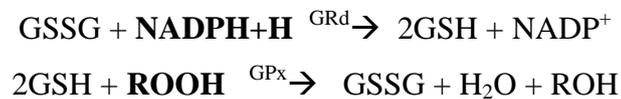


Figura 4.- Ciclo del Glutati3n. Se presenta la reacci3n general por medio de la cual el glutati3n es interconvertido a sus formas oxidada (GSSG) y reducida (GSH) para mantener el equilibrio GSH/GSSG por acci3n de las enzimas glutati3n peroxidasa (GPx) y glutati3n reductasa (GRd). [Modificado de Shaw, 1998].

Incluso, como se puede apreciar en la figura 3, la reducci3n del GSSG por medio de la GRd emplea NADPH, H⁺ como donador de electrones; generando GSH y NADP. En la reacci3n, cada mol3cula de NADPH, H⁺ oxidada por la GRd corresponde a una mol3cula de hidroper3xido (ROOH) reducida por la GPx en las reacciones:



Lo anterior permite la cuantificaci3n de la actividad enzimática de la GPx de manera indirecta en base a esta reacci3n acoplada con la GRd al medir la disminuci3n registrada por la absorbancia del NADPH a 340nm durante la evoluci3n en el tiempo de la reacci3n (Bompart *et al.*, 1990).

I. 4. La Luz como un Factor de Estr3s Oxidativo

Existen reacciones qu3micas que son sensibles a la luz, favoreci3ndose o incluso efectuándose ante la sola presencia de 3sta, as3 como mol3culas capaces de reaccionar qu3micamente al recibir la irradiaci3n, por tal motivo se les ha denominado mol3culas **fotosensibles**, y frecuentemente sus reacciones, al no estar mediadas por enzimas,

generan moléculas oxidantes; muchas de las cuales, producidas durante procesos fotocatalíticos, son ROS y elevan los niveles de moléculas con capacidad oxidativa en el organismo. A ésta condición se le ha denominado estrés **foto-oxidativo**.

La foto-oxidación así producida genera la donación de electrones al oxígeno por parte de los pigmentos que son capaces de efectuar reacciones de óxido-reducción y que son contenidos en tejidos u órganos como la retina de los animales, o el tejido foliar involucrado en la fotosíntesis en las plantas.

A cierto intervalo de longitud de onda del espectro fotoeléctrico según sea el caso, estas moléculas fotosensibles son capaces de absorber la luz incrementando su energía al excitarse y transferirla a una molécula de oxígeno (O_2), regresando a su estado no-excitado y pudiendo generar radicales libres como el 1O_2 y O_2^- o generar ROS no-radicales como el H_2O_2 . Algunas de estas moléculas biológicas fotoestimulables son la clorofila a y b en los organismos fotosintéticos y la riboflavina, la bilirrubina, el retinal y las porfirinas en los organismos en general (Halliwell y Gutteridge, 1998). También los radicales libres y otros oxidantes como el monóxido pueden ser inducidos por la luz (Hardeland, *et al.*, 2003).

El que diferentes procesos metabólicos y fisiológicos dependan de la luz, determina que la generación de ROS posea un marcado componente exógeno (Hardeland, *et al.*, 2003), pues además de la generación endógena de ROS, en las horas de luz se favorece el estrés oxidativo; y dado que la alternancia de la luz con la oscuridad se da en un periodo de 24 horas, la duración de la escotofase y la fotofase implican una respuesta diaria del organismo.

Por lo anterior es de esperarse que los tejidos y órganos expuestos a la radiación luminosa sean los más afectados por ésta. Se sabe que los **rayos ultra violeta** (rUV) son el **principal factor generador de ROS**. Este tipo de emisiones favorecen las reacciones como las de la xantina oxidasa para generar ROS, pues existen elementos tanto celulares, como subcelulares y extracelulares con capacidad de absorción energética en los organismos en el espectro UV. Ésta radiación, dependiendo de la longitud de onda (λ), puede ser del tipo A (400-320nm), B (320-290nm) o C (<290nm), siendo estas últimas las de menor λ y mayor energía y son absorbidas por la capa de ozono (Alvarez

Fontanet, 1995). Son las radiaciones UVB las que en especial inducen ROS en los organismos.

Alvarez Fontanet (1995), al hacer una revisión del tema relacionado con la piel de humanos menciona que, de manera contraria a la antigua creencia de que los rUVA no causaban gran daño foto-oxidativo, se ha reportado en varios trabajos que éstas son la principal causa de ciertas patologías relacionadas con la irradiación y que, además, su acción afecta de tal manera al organismo que facilita el que los rayos UVB causen un daño mayor. Asimismo, reporta que la actividad de enzimas como la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa se presentan en proporciones más altas en la epidermis que en la dermis, pues la primera es la capa más afectada por las rUV, y la disminución de las defensas antioxidantes aunada al aumento en la generación de ROS como consecuencia de la exposición a rUV son eventos que indican que el balance pro-oxidativo se favorece por el estrés foto-oxidativo agudo o crónico. Además, en este mismo trabajo, Alvarez Fontanet hace referencia a que las rUV son responsables del fotoenvejecimiento como principal factor externo; donde se plantea la generación de ROS por rUVA en presencia de ciertos cromóforos foto-sensibles como la riboflavina, las porfirinas y el NADPH.

De este modo, la alta luminosidad, así como la exposición a la radiación UV son factores importantes involucrados en los procesos foto-catalíticos de manera general en los animales; y se ha visto que son capaces de influenciar el funcionamiento del reloj biológico (Hardeland, *et al.*, 2000). En los procesos de oxido-reducción ha sido demostrado, en diversos organismos, que éstos procesos juegan un papel central en el funcionamiento del oscilador maestro (Rutter, *et al.*, 2001); además, se sabe que la organización circadiana es importante para el mantenimiento del estado redox (Fanjul-Moles, *et al.*, 2003). Esto nos evidencia la complejidad en las relaciones que se establecen al interior de los organismos y que se dan en relación a su ambiente externo que les influye; siendo en este caso la luz el factor ambiental que imprime una marcada perturbación hacia el interior del sistema biológico en su estado redox, y que genera una respuesta en el organismo para mantener dicho estado en intervalos constantes que permitan el desarrollo de la “sociedad celular” como individuo. Por tanto, la proporción de luz y oscuridad en el ciclo diario, así como la intensidad luminosa, son considerados ambos factores que imprimen una presión de selección

(Fanjul-Moles, *et al.*, 2003) en las poblaciones naturales, lo que puede verificarse en las poblaciones experimentales.

I. 5. El metabolismo como un factor de estrés oxidativo

Los radicales libres y otros oxidantes son productos inevitables de las reacciones de transferencia de electrones al interior del organismo y son a menudo utilizados en defensas antibacterianas y como sustratos de ciertas enzimas. En mamíferos, del 2% al 5% del oxígeno inspirado es gradualmente convertido en radicales libres por las mitocondrias (Hardeland, *et al.*, 2003).

De este modo, la actividad biológica destinada a obtener la energía necesaria para el desarrollo y la supervivencia de los sistemas biológicos genera condiciones al interior de éstos que resultan desfavorables para el buen funcionamiento del organismo. El metabolismo, como proceso de reacciones químicas ordenadas y destinadas a transformar las moléculas que ingresan al organismo por la alimentación y obtener así la energía necesaria para realizar diversas funciones, genera durante su desarrollo intermediarios del oxígeno que sirven como aceptores de electrones; por tal motivo, estos intermediarios suelen ser especies reactivas del oxígeno. Muchas de estas reacciones metabólicas son mediadas por enzimas para evitar o minimizar la formación de estas ROS; empero, existen reacciones que se efectúan sin la presencia de enzimas, como en la glucosilación, cuyas reacciones, según avanzan hacia la formación de sus productos terminales, generan radicales libres del oxígeno.

Se sabe que cuando las proteínas son incubadas con cetonas sufren una glucosilación no-enzimática y una oxidación; el resultado de estas interacciones es una clase de proteínas modificadas llamadas Productos Terminales del Avance de la Glucosilación. Estos productos terminales inducen estrés oxidativo cuando interaccionan con los blancos celulares, mediante receptores específicos de membrana, este estrés oxidante produce cambios en la expresión génica y en otras propiedades celulares (Anderson *et al.*, 1994). El metabolismo como un factor de estrés oxidante provoca así variaciones periódicas al existir cambios rítmicos en la actividad metabólica, y por ende en la formación de radicales libres, que depende de la actividad

celular; tanto de la fotosíntesis en los cloroplastos, como de la actividad de la mitocondria (Hardeland, *et al.*, 2003). 

I. 6. Ritmos Circadianos y Estrés Oxidativo

En los seres vivos, las necesidades biológicas (como respirar o alimentarse), que condicionan la necesidad de la supervivencia en los organismos, surgen y se desarrollan al mismo tiempo que la supervivencia misma, y su surgimiento está condicionado por los resultados de esta supervivencia, los cuales se crean para satisfacer las necesidades biológicas. De este modo, cuando los organismos se encuentran existiendo como seres vivos están respondiendo a su necesidad de sobrevivir por medio de procesos biológicos que definen su existencia en un momento dado y en relación a las condiciones externas en que se desarrollan; por lo que el buen resultado de estos procesos biológicos es la supervivencia del organismo, que a la par crea nuevas necesidades para su mantenimiento.

En este contexto en la actividad biológica de los organismos se generan radicales libres y otros ROS, tanto de manera endógena como de manera exógena. Ambos factores que les inducen no son estáticos, es decir: el desarrollo de todo sistema en el tiempo se sabe que es dinámico, incluso el mantenimiento de algún parámetro dentro de un intervalo constante requiere del dinamismo de otras variables para mantenerle en tal estabilidad relativa. Tanto la actividad de los seres vivos como las condiciones ambientales en que se desarrollan no son estáticas, sino cambiantes; y puesto que la rotación y traslación de la Tierra se presentan en intervalos constantes de tiempo definiendo ciclos geofísicos, el dinamismo de la Tierra en diversos factores ambientales es cíclico y periódico. Puesto que los organismos no se encuentran de manera alguna separados de su medio que, por tal, presenta factores cíclicos, la actividad de los organismos se desarrolla también con patrones temporales que se repiten de manera constante.

Dentro de este hecho es que se encuentran inmersos los ritmos biológicos, manifestándose por medio de la medición el tiempo ambiental por el reloj biológico y generando un orden temporal interno (o sea, innato) que permite la predicción de las condiciones cíclicas ambientales y el óptimo desarrollo y empleo de estas. En base a

esto podemos inferir que la actividad biológica, además de no ser estática ni constante, define patrones periódicos tanto a lo interno como en relación al exterior.

Los oxidantes pueden ser generados periódicamente por medio de factores endógenos o exógenos. Las variaciones circadianas y diarias en el metabolismo, incluyendo los patrones de locomoción y actividad cerebral, pueden resultar en un correspondiente patrón temporal de formación de oxidantes. El límite en la capacidad para eliminarlos varía rítmicamente, y por esto, la vulnerabilidad a la toxicidad de ROS muestra una periodicidad definida cada vez más claramente relacionada con el control endógeno del reloj biológico, por ejemplo: la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa de mamíferos y aves, y la actividad de la glutatión reductasa, siguen los ritmos de melatonina (Hardeland, *et al.*, 2003), hormona claramente relacionada en la regulación circadiana del ritmo sueño-vigilia, y las fluctuaciones en la temperatura corporal, entre otras funciones; y secretada por la glándula pineal según la regulación del hipotálamo. Otra evidencia que vincula la actividad circadiana y el estrés oxidativo es nuevamente revisada por Hardeland y colaboradores en 2003. Estos autores señalan que los antioxidantes de bajo peso molecular se encuentran en organismos filogenéticamente distantes, por lo que parecen ser moléculas muy conservadas que además siempre presentan un comportamiento rítmico; Entre ellos se encuentra el glutatión reducido, cuya periodicidad depende del aporte de nutrientes.

Resultados de diferentes experimentos sustentan la idea de que el sistema circadiano de los diferentes organismos es capaz de organizar las funciones metabólicas en un programa temporal que asegura la sincronía de este programa con respecto a las variaciones ambientales diarias (Wijnen y Young, 2006).

En *P. clarkii*, Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo (2003), han propuesto a la hemolinfa como un sistema oscilador pasivo controlada por varios osciladores auto-sostenibles como el hepatopáncreas y el cerebro. 

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El acocil *Procambarus clarkii* es conocido como una especie invasora. Originaria de latitudes altas hacia el norte de América, su distribución ha sido ampliada principalmente por su introducción con fines comerciales a latitudes bajas, reportándose como una especie bien establecida en el norte de México, desplazando especies nativas y logrando una mejor adecuación sobre éstas.

Además, dado que los factores ambientales determinan la abundancia y la distribución de los organismos, las condiciones físicas en una cierta región geográfica condicionarán el desarrollo de las especies que habiten en él, pues su actividad biológica se halla intrínsecamente relacionada con el ambiente.

Se sabe que los organismos alternan entre máximos y mínimos en sus variables fisiológicas, metabólicas y conductuales, en relación a máximos y mínimos en las variaciones ambientales. De este modo, los animales presentan un máximo de actividad en un momento dado de la variación diaria. El ciclo luz-oscuridad es el ciclo geofísico más evidente, y los resultados experimentales han demostrado que se encuentra en fase y coincide con un máximo metabólico; que como se ha discutido anteriormente va a originar un incremento diario en el estrés oxidante endógeno que se unirá al exógeno producido por la luminosidad. Por lo anterior, la capacidad de la especie *P. clarkii* de adaptarse a cambios ambientales en la luminosidad, modificando su comportamiento y sincronizando sus funciones a nuevas referencias cíclicas (principalmente el fotoperiodo) para poder colonizar así nuevos espacios geográficos en latitudes bajas, hace de esta especie de crustáceo decápodo un buen modelo experimental para poder entender cómo responden los sistemas biológicos a nivel de organismos ante cambios drásticos en sus parámetros ambientales de luminosidad.

Trabajos recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la exposición de diferentes especies del género *Procambarus* a cambios en la intensidad y la duración de la luz produce cambios en un sistema rítmico antioxidante de naturaleza circadiana: el sistema glutatión. En condiciones de oscuridad constante se producen cambios rítmicos endógenos en la concentración de sustratos y actividad enzimática del sistema glutatión en el hepatopáncreas y la hemolinfa de este animal (Durán-Lizarraga *et al.*, 2001;

Fanjul-Moles *et al.*, 2003). Ante cambios en la intensidad de luz, tanto la concentración de los sustratos (GSH y GSSG) como la actividad de sus enzimas (glutación reductasa y glutación peroxidasa) cambian adaptando al acocil para lograr una protección hacia la oxidación producida por la luz. Los resultados de estos trabajos han llevado a proponer a este órgano como un posible marcapaso del sistema circadiano de éste crustáceo, tal como se ha propuesto con el hígado en mamíferos (Stokkman *et al.*, 2001; Escobar *et al.*, 2001), o bien como un oscilador secundario, bajo control de las estructuras osciladoras maestras en este organismo como son la Retina y el complejo Ganglio Cerebroide-Lóbulo Óptico (Arechiga *et al.*, 1993; Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003).

Sin embargo, la existencia de glutación (GSH) y de ritmos circadianos del sistema GSH y las características de los mismos en estas estructuras marcapaso, así como la eficacia de este sistema para contrarrestar los daños producidos por el estrés oxidativo de naturaleza endógena o exógena en estos sistemas neurales, no se ha investigado. En esta tesis se investigó la interacción entre ritmos metabólicos, ambientales y antioxidantes; y utilizando datos previos del laboratorio se compararon estos ritmos con los cambios cíclicos oxidativos producidos por el metabolismo y la luminosidad en la oxidación de lípidos de las estructuras mencionadas. 

III.HIPÓTESIS

General

Las estructuras marcapaso del acocil son capaces de antagonizar el estrés oxidativo exógeno y endógeno regulando sistemas antioxidantes. 🐾

Específicas

1.- Tanto la retina como el complejo ganglio cerebroide-lóbulo óptico del acocil expresan ritmos circadianos del sistema glutatión y del metabolismo.

2. En condiciones de luz-oscuridad estos ritmos están acoplados y se sincronizan a los ciclos luminosos externos.

3. Tanto los ritmos luminosos como los metabólicos producen daños oxidativos en las dos estructuras, pero principalmente en la retina.

4. Los ritmos antioxidantes son capaces de antagonizar el daño oxidativo. 🐾

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar como un ritmo circadiano las posibles variaciones diarias en la actividad de las enzimas Glutación Reductasa (GRd) y Glutación Peroxidasa (GPx), así como su relación con los cambios cíclicos metabólicos y luminosos y su capacidad antioxidante.

Objetivos Particulares

1.- Determinar cambios en la actividad de las dos enzimas del sistema glutatión en condiciones cíclicas de oscuridad constante (OO) y luz-oscuridad (LO), en la retina y el complejo ganglio cerebroide-lóbulo óptico (GC-LO).

2.- Determinar los cambios cíclicos metabólicos endógenos utilizando como marcador la concentración de glucosa en las mismas condiciones OO y LO en la hemolinfa la retina y el GC-LO.

3.- Identificar si el sistema antioxidante del glutatión es capaz de antagonizar el daño producido por el estrés oxidativo en dichas estructuras, utilizando como marcador los cambios cíclicos en lipoperoxidación (datos previos del laboratorio).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los Animales

Utilizamos un lote de 60 acociles *Procambarus clarkii* de peso y tamaño homogéneos; todos ellos en etapa de intermuda.

Los animales empleados en este trabajo fueron colectados de la cabecera municipal Ciudad Delicias, en el estado de Chihuahua; a una altitud de 2,345m y a 27°45' de latitud Norte, a orillas del río San Pedro, donde se han registrado luminosidades que varían entre 0.039Wm⁻² en el amanecer y de 3.68Wm⁻² al medio día (Durán-Lizarraga, 2002).

Fueron aclimatados en el laboratorio por un mes en acuarios puestos bajo un fotoperiodo normal 12:12 de Luz-Oscuridad (LO), con encendido a las 7:00 hrs., y apagado a las 19:00hrs., del tiempo externo; a una temperatura de 20° ± 1° C. El agua en los acuarios se mantuvo a un pH de 7.9 y una concentración de oxígeno (O₂) de 5.7 mg/L.

Los acuarios fueron provistos de tubos de PVC simulando madrigueras para permitirle a los acociles ocultarse durante las horas de luz y se les mantenía con una alimentación en días y horas aleatorios.

Montaje del Sistema Experimental

Después de la aclimatación, el lote fue dividido en dos grupos experimentales de 30 acociles cada uno. Ambos grupos fueron mantenidos por una semana con un fotoperiodo LO 12:12 con encendido a las 7:00 hrs., y apagado a las 19:00hrs., del tiempo externo. A una temperatura constante de 20° C, pH 7.9, concentración de O₂ a 5.7 mg/L, a una baja intensidad de luz (0.043 W/m²) provista por lámparas fluorescentes de luz blanca colocadas en la superficie.

Cada grupo fue mantenido en un acuario independiente, a los cuáles se les retiraron los tubos de PVC para impedir que los animales se protegieran de la luz y, al no poseer parpados o alguna estructura que les permitiera proteger su retina de la luminosidad, permanecieran expuestos a la iluminación las 12 horas de la fotofase. Se les mantuvo

una alimentación en momentos aleatorios para evitar la sincronización por alimento y evitar, al mismo tiempo, que el agua pudiera virarse turbia e impedir el paso de la luz.

Tras esta semana, a un primer grupo (i) se le sacrificó, por lo que constituyó el grupo experimental LO 12:12; mientras tanto, al segundo grupo (ii) se le mantuvo en su mismo acuario durante tres días más, bajo una condición de oscuridad constante (OO), tiempo tras el cuál, fue sacrificado, constituyendo el grupo experimental OO 72hrs.

Toma de las Muestras

De cada grupo experimental se sacrificaron 5 animales cada cuatro horas del el ciclo nictemeral, a las 4:00, 8:00, 12:00, 16:00, 20:00 y 24:00 horas del tiempo externo.

De cada organismo se obtuvieron 25µl de hemolinfa (para ensayo de glucosa) y se prepararon en frío colocando los 25µl de hemolinfa en 50µl de buffer de fosfatos (pH 7.5) y 18.5µl de ácido tricloroacético (TCA) al 10% para precipitar las proteínas. Se obtuvieron, además, el ganglio cerebroide-lóbulo óptico y las retinas aisladas (estas estructuras, además de la cuantificación de glucosa, empleadas para los ensayos de actividad enzimática y cuantificación de proteínas), preparadas en frío al ser colocadas en 50µl de buffer de fosfatos a pH 7.5.

Todas las muestras fueron homogenizadas y centrifugadas a 4° C a 2000 g por 10 minutos. Tiempo tras el cuál, alícuotas del sobrenadante de cada una fueron utilizadas inmediatamente para la cuantificación de proteínas, ensayos de actividad enzimática y cuantificación de glucosa, respectivamente.

Ensayo para Cuantificación de Proteínas

Las muestras que se usaron para cuantificar proteínas fueron las correspondientes al ganglio cerebroide-lóbulo óptico y la retina aislada; siguiendo la técnica espectrofotométrica descrita por Bradford en 1976. Cada muestra se preparó en frío colocando 100µl en 1ml del reactivo Bradford (*BioRad*) dentro de una cubetilla de cuarzo para espectrofotómetro y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos para realizar la lectura de absorbancia con un espectrofotómetro Ultraspec 2000 (*Pharmacia Biotech*; Buckinghamshire, Inglaterra).

Ensayo para la Actividad Enzimática de GRd.

Las muestras del ganglio cerebroide-lóbulo óptico y retina aislada fueron empleadas para este ensayo de actividad enzimática de Glutación Reductasa (GRd), empleando la técnica espectrofotométrica descrita por Bompart, *et al.*, en 1990.

30µl de la muestra fueron colocados en una cubeta de cuarzo para espectrofotómetro con 900µl de glutatión oxidado (GSSG) 0.44 mmol/L, como iniciador de la reacción, en un buffer de fosfatos 0.1M con ácido etilen-diamina tetracético (EDTA) 0.03M a pH 7 y 20µl de dinucleótido reducido de nicotinamida-adenina fosfatado (β -NADPH) 0.036mM, preparado y ajustado antes del ensayo; así como el agente iniciador de la reacción (GSSG).

El ensayo fue medido a los 340nm de absorbancia durante 6 minutos, registrando cada 30 segundos los valores por medio del espectrofotómetro Ultraspec 2000, antes mencionado. La actividad enzimática fue expresada en milimoles de NADPH oxidado/g de proteína/minuto, empleando un coeficiente de extinción de 6.2mM/min.

Ensayo para la Actividad Enzimática de GPx.

Las muestras del ganglio cerebroide-lóbulo óptico y de retina aislada también fueron empleadas para la determinación de actividad enzimática de Glutación Peroxidasa (GPx) por medio de la técnica espectrofotométrica descrita por Paglia y Valentine en 1966, preparando en frío 30µl de muestra en 3ml de buffer de fosfatos 0.1M (pH 7) con EDTA 0.001M a pH 7.4 y azida de sodio (NaN_3) 0.001M; con 30µl de glutatión reducido (GSH) 0.001M, 30µl de β -NADPH 0.2mM y 15 µl de GRd 1 unidad/mL agregada justo después de preparar la reacción. Para correr el ensayo se agregaron 30µl de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0.25mM como iniciador de la reacción. Todos los reactivos fueron preparados en el momento de su uso, así como el H_2O_2 .

El ensayo fue leído a los 340nm de absorbancia por 10 minutos y registrando las absorbancias cada minuto con el espectrofotómetro Ultraspec 2000 (*Pharmacia Biotech*; Buckinghamshire, Inglaterra). La actividad enzimática se expresó como milimoles de NADPH oxidado/g de proteína/minuto; empleando 6.2mM/min como coeficiente de extinción.

Ensayo para la cuantificación de Glucosa.

A las muestras de hemolinfa tomadas de cada organismo, así como las muestras de retina aislada y del ganglio cerebroide-lóbulo óptico, les fueron agregados 18.5µl de ácido tricloroacético (TCA) al 10% para ser re-homogenizadas y centrifugadas a 1000 g por 10 minutos para precipitar las proteínas. Las alícuotas fueron empleadas en la determinación espectrofotométrica de niveles de glucosa por medio del Equipo para Determinación de Glucosa *Diagnostic Chemicals Limited (DCL)*. Se colocaron 25µl de muestra en una cubeta de plástico para espectrofotómetro con 2.5ml de *Reactivo DCL para glucosa*. La reacción se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, tiempo tras el cuál se leyó la absorbancia a 505nm con el espectrofotómetro *Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, Inglaterra)*. Los datos de concentración de glucosa fueron expresados como mg de glucosa/dL.

Análisis de Datos

Todos los datos fueron graficados y ajustados a un modelo sinusoidal mediante el análisis de Cosinor simple, donde se asume la existencia dentro de la serie de datos de uno o más procesos rítmicos con periodos definidos. Este análisis ritmométrico ajusta los datos experimentalmente obtenidos a una función coseno mediante la ecuación:

$$f(t_i) = M + A \cos(\omega t_i + \phi) + \varepsilon_i$$

Donde t_i representa el tiempo de medición para el $i^{\text{ésimo}}$ individuo u observación, M es el nivel medio (mesor) de la curva coseno ajustada, A es la amplitud de la función, ω es la frecuencia angular (periodo) de la curva y ϕ es la acrofase (cambio horizontal) de la curva. Asumiendo que el error estándar (ε_i), es independiente y se distribuye de manera normal con media igual a cero y una varianza residual (Nelson *et al.*, 1979). Este análisis puede dar numerosas gráficas cosinusoidales, sin embargo, el parámetro del porcentaje de ritmo (PR), aportado por el mismo análisis, permite seleccionar la onda cosinusoidal más apropiada y que mejor se ajusta a los datos (en porcentaje) según el periodo que el investigador fija al momento de realizar el análisis.

VI. RESULTADOS

Tanto en la retina como en el complejo GC-LO casi todas las variables mostraron ritmos diarios estadísticamente significativos, muchos de los cuales presentan un comportamiento bimodal (cuadro 2). Sin embargo, en la condición LO, ni los cambios de lípidos peroxidados a través del día en el GC-LO ni la oscilación de glutatión reductasa en retina resultaron estadísticamente significativos mediante cosinor. Después de 72 horas de oscuridad constante, a excepción de GRd, todas las variables medidas arrojaron valores estadísticamente significativos de oscilación tras el análisis de cosinor simple (cuadro 2), en la hemolinfa, la retina aislada y el complejo GC-LO.

Variable	Periodo (h)	Mesor	Amplitud	Acrofase (h)	PR (%)	<i>p</i>
LO 12:12						
Glucosa en Hemolinfa (mg/dL)	22.8*	1.1±0.11	0.44±0.16	16:03±1:19	21.02	0.05
GC-LO						
GRd (mM NADPH /gr. proteina/mn)	12*	36.9±3.8	24.26±5.4	7:40±0:26	43.7	0.01
GPx (mM NADPH /gr. proteina/mn)	12*	8.6±1.7	6.13±2.5	7:21±0:46	18.9	0.05
Glucosa (mg/dL)	12.8*	1.01±0.11	0.46±0.15	2:30±0:41	25	0.05
LPO (mM/mL)	24	5.37	1.49	5:43	9.5	0.26
Retina						
GRd (mM NADPH /gr. proteina/mn)	12	11.5	5.8	11:23	16.7	0.2
GPx (mM NADPH /gr. proteina/mn)	12.3*	2.48±0.32	1.58±0.44	8:20±0:35	35.67	0.01
Glucosa (mg/dL)	24*	0.35±0.04	0.2±0.06	23:07±1:06	26.32	0.01
LPO (mM/mL)	12.1*	31.71±0.95	7.09±1.33	2:20±0:22	52.11	0.01
OO 72h						
Glucosa en Hemolinfa (mg/dL)	23.5*	1.13±0.17	0.61±0.24	12:38±1:27	19	0.05
GC-LO						
GRd (mM NADPH /gr. proteina/mn)	12	6.7	3.14	8:45	9.2	0.2
GPx (mM NADPH /gr. proteina/mn)	12.3*	16.14±3.43	14.49±4.82	10:16±0:39	29.2	0.02
Glucosa (mg/dL)	12.3*	0.98±0.08	0.6±0.11	9:17±0:21	54.19	0.01
LPO (mM/mL)	24.4*	26.81±0.85	3.74±1.19	22:27±1:15	26.83	0.01
Retina						
GRd (mM NADPH /gr. proteina/mn)	24.3*	17.3±3.2	17.7±4.5	3:14±1:00	36.3	0.01
GPx (mM NADPH /gr. proteina/mn)	12	10.3	3.36	4:39	16.62	0.09
Glucosa (mg/dL)	12.6*	0.45±0.05	0.24±0.07	1:17±0:35	35.13	0.01
LPO (mM/mL)	21.4*	505.47±21.9	77.88±31.3	12:43±1:20	18.7	0.05

Cuadro 2.- Análisis de Cosinor. Se presentan los valores del análisis de cosinor simple según el ajuste de los datos a la onda sinusoidal para Hemolinfa, GC-LO y Retina en condiciones LO 12:12 y OO 72h. PR: porcentaje de ritmo, *: valores significativos a la *p* indicada según el análisis.

Luz-Oscuridad 12:12

La medición espectrofotométrica del sobrenadante de las muestras homogenizadas de la Retina aislada y del Complejo Ganglio Cerebroide-Lóbulo Óptico (GC-LO), así como de Hemolinfa en animales sometidos a 15 días de **LO 12:12** permitió la construcción de los cronogramas mostrados en la Figura 5 después de un análisis de cosinor simple (cuadro 2).

En esta condición de luz-oscuridad, la glucosa (mg/dL) en la **hemolinfa** presenta una oscilación estadísticamente significativa de 22.8 horas, mostrando un ritmo unimodal con su acrofase a las 16:03 \pm 1:19 hrs., durante la fotofase. Con un valor de mesor de 1.1 \pm 0.11 y una amplitud de 0.44 \pm 0.16; presentando un porcentaje de ritmo de 21.02% ($p = 0.05$).

En el complejo **GC-LO**, la actividad de la enzima GRd (mM NADPH ox./gr prot./min.) oscila con un periodo estadísticamente significativo de 12 horas (figura 5e); presentando así un ritmo bimodal con un pico máximo a las 20:00 hrs., cercano al inicio de la escotofase (19:00 hrs.); y un segundo pico a las 8:00 hrs., poco después del inicio de la fotofase (7:00 hrs.). El valor del mesor es de 12.64 \pm 2.07, con una amplitud del ritmo de 12.16 \pm 3.11 y un porcentaje de ritmo (PR) de 43.5% ($p = 0.01$).

La actividad enzimática de GPx (mM NADPH ox./gr prot./min.) oscila con un periodo de 12 horas de manera estadísticamente significativa (figura 5e), presentando así un ritmo bimodal en antifase con GRd; presentando un pico máximo a las 8:00 hrs., hacia el inicio de la fase de luz (7:00 hrs.) y un segundo pico a las 20:00 hrs., hacia el inicio de la fase de oscuridad (19:00 hrs.). El mesor presenta un valor de 10.36 \pm 2.24, una amplitud del ritmo de 9.1 \pm 3.25 y un PR de 25.46% ($p = 0.03$).

La concentración de glucosa (mg/dL) en esta estructura oscila de manera estadísticamente significativa con un periodo de 12.8 horas en antifase con la oscilación de glucosa en hemolinfa (figura 5a), un mesor de 1.01 \pm 0.11, una amplitud de 0.46 \pm 0.15 y un PR de 25% ($p = 0.05$).

Los datos aportados por el laboratorio sobre la lipoperoxidación (mM/mL) en el complejo GC-LO en esta condición de LO 12:12 arrojan una oscilación no significativa

por cosinor con un periodo de 24 horas (figura 5c), con un pico máximo en la fotofase; un mesor de 5.37, amplitud del ritmo de 1.49 y PR de 9.5% ($p = 0.26$).

Por su parte, en las muestras de **Retina** aislada en las mismas condiciones LO 12:12; la actividad enzimática de GRd (mM NADPH ox./gr prot./min.) oscila de manera no estadística en el ajuste por cosinor con un periodo de 11.8 horas (figura 5f), con un pico máximo durante al fotofase a las 12:00 hrs., y un segundo pico a las 20:00hrs., hacia el inicio de la escotofase (19:00hrs.), un valor de mesor de 5.26, una amplitud de 4.33 y un porcentaje de ritmo de 16.36% ($p = 0.12$).

La actividad enzimática de GPx (mM NADPH ox./gr prot./min.) ajustada a una curva sinusoidal por Cosinor arrojó una oscilación bimodal con un periodo de 12.3 horas (figura 5f), estadísticamente significativo, con un pico máximo a las 24:00 hrs., y un pico menor hacia las 8:00 hrs. El mesor al cual oscila la actividad presenta un valor de 2.48 ± 0.32 , la amplitud del ritmo es de 1.58 ± 0.44 y un PR de 35.6% ($p = 0.01$).

La concentración de glucosa (mg/dL) en la retina presenta un ritmo estadísticamente significativo con un periodo de 24 horas, con su acrofase a las $23:07 \pm 1:06$ hrs., durante la escotofase (figura 5b). La amplitud se da con un valor de 0.2 ± 0.06 y el mesor de 0.35 ± 0.04 con un PR de 26.32% ($p = 0.01$).

Mientras tanto, los valores de lipoperoxidación (mM/mL) obtenidos en muestras de retina aislada bajo estas mismas condiciones de fotoperiodo muestran un ritmo bimodal estadísticamente significativo con un periodo de 12.1 horas (figura 5d), un mesor de 31.71 ± 0.95 una amplitud de 7.09 ± 1.33 y un PR de 52.11%, alcanzando su acrofase durante la noche a las $2:20 \pm 0:22$ hrs., en la curva ajustada por Cosinor ($p = 0.01$).

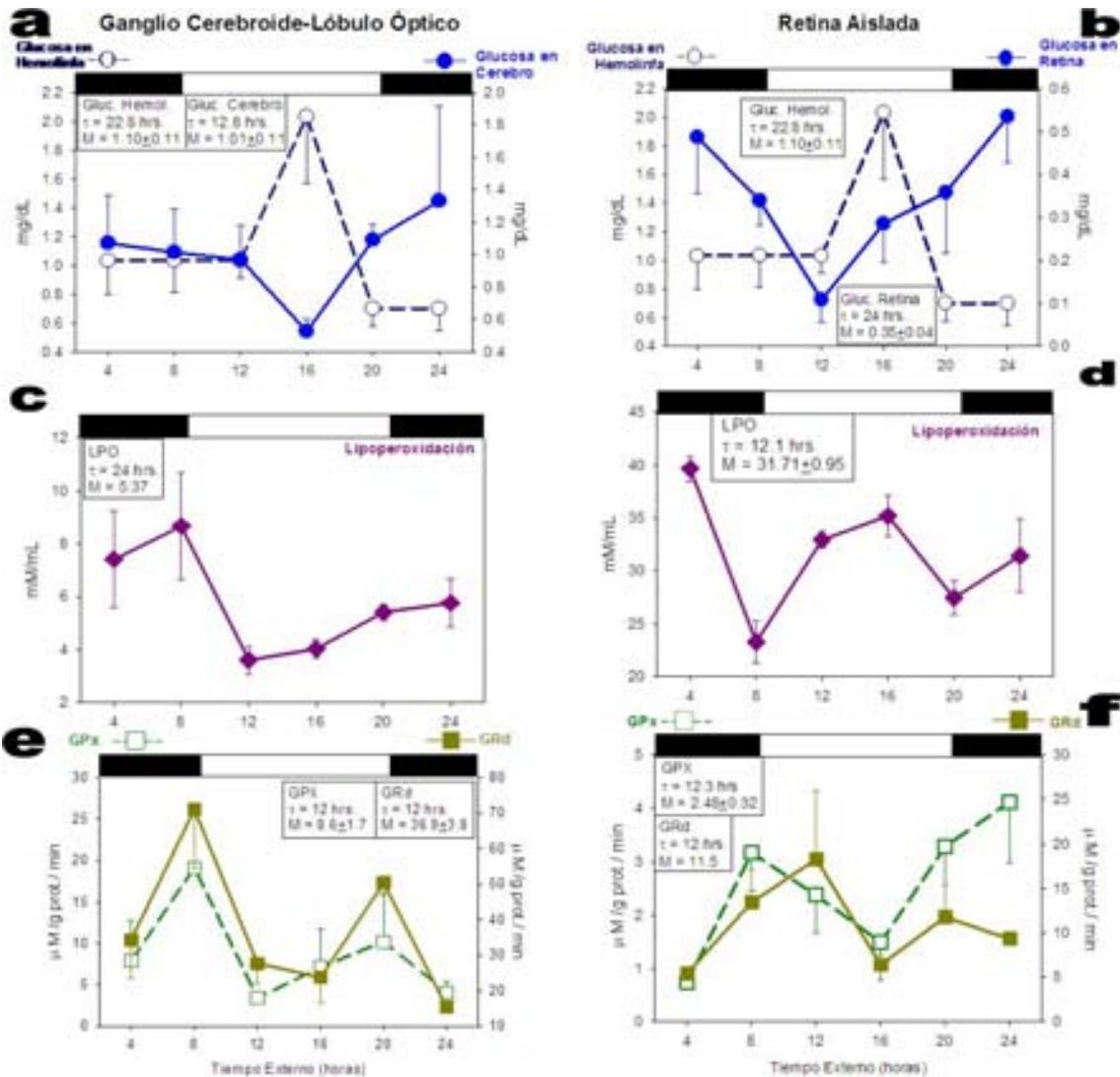


Figura 5.- Ganglio Cerebroide y Retina en Luz-Oscuridad 12:12. Se presentan los cronogramas de los parámetros medidos de glucosa (mg/dL), lípidos peroxidados (mM/mL) y actividad enzimática de GPx y GRd (mM NADPH ox./gr prot./min.) tanto en el complejo GC-LO (a, c, e) como en Retina (b, d, f).

72 horas de Oscuridad Constante

La medición de las variables realizada por espectrofotometría empleando el sobrenadante de las muestras de Hemolinfa, Retina Aislada y Ganglio Cerebroide-Lóbulo Óptico (GC-LO) en animales sometidos a un lapso de **72 horas en condiciones de oscuridad constante**, permitió la construcción de los cronogramas mostrados en la Figura 6, que se ajustaron a una onda sinusoidal por medio de un análisis de cosinor simple (cuadro 2).

Después de 72 horas de oscuridad constante (OO), la concentración de glucosa en **hemolinfa** (mg/dL) presenta variaciones diarias significativas con un periodo endógeno $\tau = 23.5$ horas, que oscila con un mesor de 1.113 ± 0.17 y una amplitud de 0.61 ± 0.24 ; alcanzando su acrofase a las $12:38 \pm 1:27$ con un valor de porcentaje de ritmo de 19% ($p = 0.05$).

En el complejo **GC-LO**, tras esta condición de 72 horas de OO, la actividad enzimática de la GRd (mM NADPH ox./gr prot./min.) osciló con un periodo no significativo por cosinor de 12.1 horas (figura 6e), presentando un mesor de 0.61, una amplitud de 0.223 con su acrofase a las 9:28hrs., del tiempo externo y un porcentaje de ritmo de 10.92% ($p = 0.21$).

La actividad enzimática de GPx, también expresada en mM NADPH ox./gr prot./min.; presentó una oscilación estadísticamente significativa de $\tau = 12.1$ horas (figura 6e), siendo un ritmo endógeno unimodal con un valor de mesor de 6.12 ± 1.31 y una amplitud de 5.14 ± 1.92 ; alcanzando su acrofase a las $15:07 \pm 0.40$ horas del tiempo externo. Presentando un PR de 24.67% ($p = 0.05$).

En tanto que, la concentración de glucosa (mg/dL) en esta estructura, presenta una oscilación significativa de $\tau = 12.3$ horas (figura 6a), siendo un ritmo endógeno bimodal con un mesor de 0.98 ± 0.08 , una amplitud de la oscilación de 0.6 ± 0.11 y una acrofase alcanzada a las $9:17 \pm 0:21$ hrs., del tiempo externo, con un PR de 54.19% ($p = 0.01$).

En esta estructura, los datos de lipoperoxidación (mM/mL) aportados por el laboratorio revelan un ritmo estadísticamente significativo con un periodo $\tau = 24.4$

horas (figura 6c), con un mesor de 26.81 ± 0.85 , una amplitud de 3.74 ± 1.19 y acrofase a las $22:27 \pm 1:15$ hrs., del tiempo externo; con un PR de 26.83% ($p = 0.001$).

Por otra parte, en las muestras de **Retina** aislada después de 72 horas de OO se presenta una oscilación no significativa en la actividad de GRd (mM NADPH ox./gr prot./min.) con un periodo de 23.1 horas (figura 6f), un mesor de 0.77, una amplitud de 0.55, alcanzando su acrofase a las 2:36 hrs., del tiempo externo y un PR de 22.44% ($p = 0.06$).

En la actividad enzimática de GPx (mM NADPH ox./gr prot./min.) se presenta un ritmo con periodo estadísticamente significativo ($\tau = 12.00$ horas), siendo un ritmo bimodal con un mesor de 2.28 ± 0.17 (figura 6f), amplitud de 0.81 ± 0.25 , acrofase de $15:51 \pm 0:34$ hrs., del tiempo externo y un PR de 29.46% ($p = 0.01$).

La concentración de glucosa (mg/dL) en la retina muestra una oscilación estadísticamente significativa con un periodo (τ) de 12.6 horas (figura 6b), considerándose así un ritmo bimodal con un valor de mesor de 0.45 ± 0.05 , una amplitud de 0.24 ± 0.07 y acrofase a las $1:17 \pm 0:35$ hrs., con un PR de 35.13% ($p = 0.01$).

Los valores de lipoperoxidación (mM/mL) en la retina, aportados por el laboratorio, muestran una oscilación unimodal estadísticamente significativa con un periodo $\tau = 21.4$ horas (figura 6d), con un mesor de 505.47 ± 21.9 , una amplitud de 77.88 ± 31.3 y una acrofase a las $12:43 \pm 1.20$ hrs., del tiempo externo y un PR de 18.7% ($p = 0.05$).

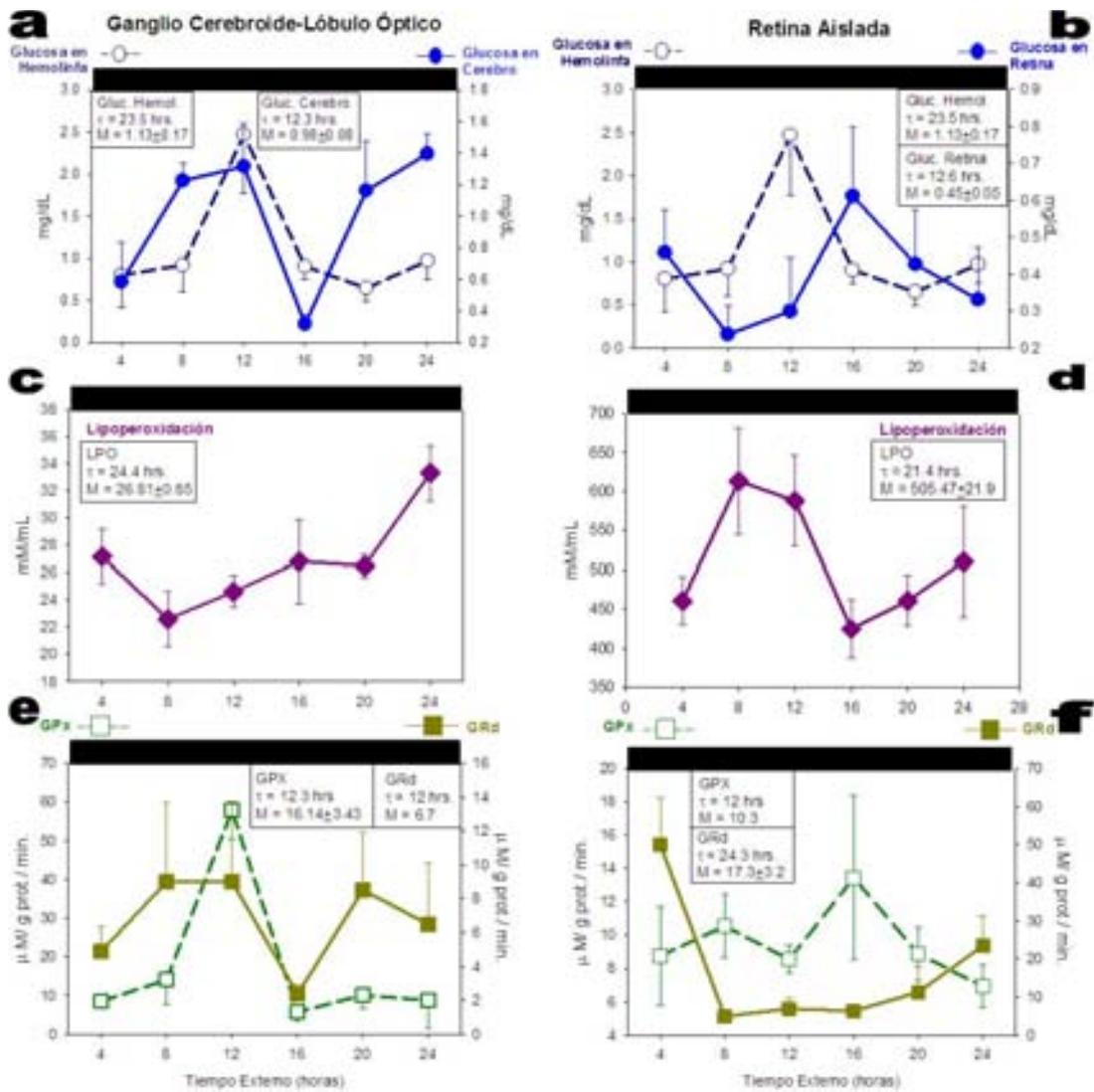


Figura 6.- Ganglio Cerebroide y Retina en Oscuridad Constante por 72 horas. Cronogramas obtenidos de la medición de los parámetros: glucosa (mg/dL), lípidos peroxidados (mM/mL) y actividad enzimática de GPx y GRd (μ M NADPH ox./gr prot./min.) tanto en GC-LO (a, c, e) como en Retina (b, d, f).

VII. DISCUSIÓN

VII. 1. Ajuste de los Datos

Las variaciones registradas en cada parámetro medido: concentración de glucosa, lípidos peroxidados y la actividad enzimática de la GPx y GRd; bien podrían ser interpretadas como variaciones al azar o espontáneas no vinculadas con la actividad biológica de los organismos sin un análisis estadístico que nos confiriera una referencia objetiva y con una baja probabilidad de error en nuestras conclusiones sobre la existencia de salidas rítmicas de los parámetros.

Debido a lo anterior en el presente trabajo se ajustaron los datos de las diferentes determinaciones bioquímicas a los estimados determinados a partir de un modelo matemático que define una onda sinusoidal por medio de una función coseno. Esto se realizó mediante el análisis de Cosinor (Nelson *et al.*, 1979). Los valores estimados del ajuste del ritmo a la onda sinusoidal como la **amplitud (A)**, con la cual **el ritmo difiere de cero**, y el porcentaje de ajuste del valor de periodo del ritmo nos permiten estimar la significación estadística de estos parámetros rítmicos; en tanto que el **mesor (M)** es un estimado del **valor medio** entre el valor máximo y el mínimo de la onda cosinusoidal y alrededor del cual se agrupan los datos de la oscilación, nos permite comparar la media ajustada de las diferentes oscilaciones. Por su parte, la **Acrofase**, siendo el estimado del **valor máximo de la oscilación** (cenit) con respecto a un punto temporal de referencia, nos permite establecer con certeza estadística la relación de fase de las diferentes oscilaciones analizadas. De este modo, cuando el muestreo es realizado en intervalos de tiempo constantes, y por tal motivo, los datos se distribuyen de manera homogénea, el valor del mesor corresponde a la media aritmética de los datos, o sea al promedio de éstos.

Por lo tanto, en esta tesis, el valor de mesor permite la comparación entre la media de las oscilaciones de los diferentes ritmos de los parámetros biológicos analizados bajo las distintas condiciones experimentales.

Es en los dos estimados estadísticos A y M en los que se basa el análisis de Cosinor para establecer la significancia estadística de un ritmo según el ajuste de los datos a la onda sinusoidal: $f(t_i) = M + A \cos(\omega t_i + \phi) + \varepsilon_i$.

Por su parte, el estimado del **periodo**, un valor que indica **el tiempo que tarda la oscilación en repetirse**, es decir, el tiempo que transcurre para que un valor dado dentro de una secuencia rítmica vuelva a presentarse; se expresa como el porcentaje de ajuste a la onda sinusoidal para un cierto valor asignado tras el análisis de cosinor. En este trabajo solo se ajustaron los datos a los valores comprendidos entre 10 y 26 horas, identificando así un ritmo como uni- o bimodal en relación a un ciclo de 24 horas.

Por estas consideraciones hechas en esta sección, y en base a los resultados obtenidos y su ajuste a una onda cosinusoidal, se puede afirmar que los registros indican la presencia de ritmos uni- y bimodales en los parámetros biológicos medidos bajo condiciones de luz-oscuridad 12:12; así como la persistencia de algunos de estos ritmos en condiciones de oscuridad constante. Pudiendo, en base a esto último, considerar únicamente como **ritmos endógenos** a los ritmos de concentración de **glucosa** tanto en la hemolinfa como en GC-LO y retina, los niveles de **LPO** en ambos órganos y únicamente al ritmo de la **GPx** tanto en el complejo GC-LO como en la Retina aislada.

VII. 2. Ritmicidad de las variables

Según Hardeland, *et al.* (2003), debido a que la cuantificación de las variaciones de ARNm de una enzima antioxidante no refleja necesariamente las variaciones de la cuantificación de la proteína, y la determinación de la concentración de estas proteínas puede modificarlas durante la manipulación en alguna técnica empleada, afectando algunos centros o dominios sensibles conformacionalmente o pueden sufrir modificaciones oxidativas; solamente la medición de la actividad enzimática refleja potencialmente la posible capacidad protectora de las enzimas respectivas. Además, mencionan estos autores que la actividad enzimática solo es cabalmente comprendida cuando se conoce la distribución subcelular, pues una baja amplitud en la medición de un ritmo en la actividad total puede ocultar oscilaciones de alta amplitud de isoformas con diferentes fases.

Si bien esto es cierto, también lo es que todo estudio de la realidad debe partir de una base real y, por lo tanto, concreta antes de comenzar el proceso de abstracción; de lo contrario, de un estudio partiendo de lo abstracto se puede llegar a una comprensión confusa de la realidad y en buena medida sofisticada. En la realización de este trabajo no tenemos referencias de una descripción previa de la distribución subcelular de las enzimas GPx y GRd en las células del GC-LO ni en la retina de *P. clarkii*, y siendo en este trabajo el objetivo principal identificar si existe una variación circadiana en el sistema glutatión en estos órganos, que sea capaz de antagonizar el daño oxidativo en el organismo íntegro; el partir primero de un estudio que nos permita describir la distribución subcelular de las isoformas de cada enzima y su variación diaria en cada órgano aquí estudiado nos impediría observar el comportamiento global del sistema y su relación concreta en el tiempo y con los factores exógenos (luz) y endógenos (metabolismo) oxidantes, pues faltaría evidencia que nos mostrara el comportamiento de las partes en interacción, que es como se presentan en realidad y no aisladas. En base a esto, obtener una descripción del comportamiento general de las enzimas del sistema glutatión en los órganos nos ayuda a identificar el comportamiento de dicho sistema y su relación en el tiempo, real y concreta, y no abstracta según las determinaciones que le conforman como todo; para poder solo así tener una comprensión lógica y completa del fenómeno, partiendo de lo real y concreto.

Los resultados de esta tesis muestran que la actividad de las enzimas del ciclo GSH, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa, muestran tanto oscilaciones diarias en respuesta a los ciclos de luz oscuridad como ritmos endógenos unimodales y bimodales tanto en el complejo cerebro-lóbulo óptico como en la retina. Estos resultados indican un importante efecto de la luz sobre los ritmos enzimáticos principalmente sobre la reductasa.

La irradiación luminosa, al producir foto-oxidación, es un factor que determina la formación de ROS en diferentes animales (Hardeland *et al.*, 2003) como se ha demostrado con anterioridad en el acicil (Prieto-Sagredo *et al.*, 2000). Aunque en esta tesis no se determinó la relación glutatión reducido\oxidado, un índice de estrés oxidativo, otros trabajos indican que hay un aumento coincidente de este parámetro con la fotofase (Fanjul-Moles *et al.*, 2003; Fanjul-Moles *et al.*, en prensa). Esto indica que el estrés oxidativo producido por la luz es antagonizado por una rápida transformación de

GSSG en GSH, probablemente debido al resultado del efecto directo de la luz sobre la glutatión reductasa. La irradiación luminosa podría producir un aumento de peróxidos con el subsecuente aumento en la actividad de la GPx y la concentración de GSSG. Esta reacción tiene que consumir una gran cantidad de GSH resultante del efecto activador de la luz sobre la actividad rítmica de la GRd.

Sin embargo, las oscilaciones de la actividad enzimática de la GPx, tanto en la retina como en el complejo GC-LO, aún cuando parecen depender del aumento en la concentración de GSH, se pueden considerar de naturaleza circadiana al ser esta una variable capaz de oscilar en condiciones constantes tras 72 horas de OO; probablemente como una respuesta al estrés oxidativo resultado de los ritmos endógenos tanto metabólicos como conductuales; pues las variables en interacción que constituyen a un todo (en este caso, al acocil), se regulan y determinan mutuamente y de manera constante, no se dan de manera aislada e independiente unas de las otras. Asimismo la actividad enzimática de la GRd, que al depender de la concentración de GSSG, es considerada endógena por la misma razón.

Aunque en esta tesis no se registró el ritmo circadiano de actividad locomotora de *P. clarkii*, éste se ha caracterizado ampliamente (para revisión Aréchiga *et al.*, 1993; Page, 2000, Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003). En condiciones de oscuridad constante este ritmo muestra un pico nocturno endógeno, correlacionado con un aumento en el consumo de oxígeno y aumento en el metabolismo. Este pico de actividad endógena parece coincidir con los picos endógenos de GPx reportados aquí tanto en retina como en GC-LO. El ritmo circadiano de actividad cambia a un patrón bimodal en condiciones LO, en el que aparece un segundo pico exógeno, al encendido de la luz, similar al encontrado en este trabajo para la GPx (Fig. 5e) tanto en GC-LO como en retina, coincidentes con los picos de actividad de GRd encontrados en ambas estructuras.

Siendo la alternancia de luz-oscuridad del ciclo de 24 horas un factor importante para la sincronización interna de la actividad de esta enzima con el resto del sistema glutatión, como lo muestra en la Figura 5e, el ritmo bimodal de GRd en sincronía con el de GPx probablemente son resultado de la producción rítmica diaria de ROS,

evidenciada por la lipoperoxidación, y relacionada con la actividad metabólica rítmica y la foto-oxidación diaria.

Como ya se ha mencionado, en este trabajo la cuantificación de los niveles de glucosa en la hemolinfa se empleó como un marcador del metabolismo. Al relacionarse con las cuantificaciones de glucosa realizadas tanto en el GC-LO como en la retina aislada de *P. clarkii*, se interpretó el aumento y la disminución cíclica de la glucosa en la hemolinfa como una baja y un aumento en la demanda de ésta por parte de los tejidos y órganos periféricos, en este caso el GC-LO y la retina. La oscilación diaria bimodal de la concentración de **glucosa en la hemolinfa** persiste con un ritmo unimodal tras 72 horas de oscuridad constante, por lo que representa un criterio objetivo para considerar la existencia de un ritmo circadiano de la actividad metabólica que se relaciona con la actividad biológica de *P. clarkii*, como se ha reportado previamente en otras especies (Kallen, *et al.*, 1990).

En trabajos de nuestro laboratorio se han descrito variaciones diarias en la secreción endógena de la **hormona hiperglucemiante de crustáceos** (CHH) tanto en la retina como en el lóbulo óptico de *P. clarkii* (Escamilla-Chimal, *et al.*, 2001), se ha reportado que, en base al efecto hiperglicémico que genera, si bien la CHH tiene una contribución insignificante a la regulación de la glucosa en el organismo en general, sí es capaz de afectar según su secreción a la regulación del metabolismo de la glucosa (Chang *et al.*, 2001; Fanjul-Moles 2006); por lo que se ha propuesto que la CHH podría mediar la regulación local del metabolismo a nivel retiniano, aumentando los niveles de glucosa en este órgano (Escamilla-Chimal *et al.*, 2002). Considerando esto, los resultados obtenidos aquí no muestran contradicciones entre la evidencia y nuestro planteamiento de utilizar a la glucosa como un marcador del metabolismo, pues todos los cronogramas tanto de los ritmos de glucosa en hemolinfa como los de GC-LO y retina respectivamente, parecen oscilar guardando una relación de fase tanto en LO como en OO que varía ligeramente probablemente debido al efecto local de la CHH sobre el metabolismo de la glucosa.

Particularmente en la retina en LO, a pesar de que hay un pico de aumento en la concentración de glucosa coincidente con el aumento de este carbohidrato en hemolinfa en la foto fase, lo que sugiere la entrada de glucosa hacia la retina, la acrofase del ritmo está a las 24hrs., del tiempo externo, momento correspondiente a la escotofase y que coincide con la concentración mínima registrada de glucosa en hemolinfa.

Los altos niveles en la concentración de glucosa en la hemolinfa en la foto fase en contradicción con los resultados de otras especies (Georges-Kallen y Voorte, 1985) pero de acuerdo con cambios estacionales en la fase del ritmo reportados para esta misma especie podría ser debido a la actividad del acocil, la cual también cambia estacionalmente (Tilden, *et al.*, 2003). Al ser éste un organismo predominantemente nocturno, la glucosa debe pasar de la hemolinfa a los tejidos de acuerdo con los requerimientos metabólicos. En esta tesis los ritmos de concentración de glucosa en hemolinfa y los registrados en el CG-LO y la retina se muestran en espejo: en el GC-LO se observa un aumento en la concentración de glucosa durante las horas de oscuridad; en tanto que en la retina, se muestra un ritmo unimodal cuyo cenit se encuentra a la mitad de la escotofase (Fig. 5a y 5b). *Procambarus clarkii* es una especie con una mayor actividad en la escotofase y un lógico incremento en su metabolismo tanto en la retina como en el GC-LO en estas horas de oscuridad.

De forma interesante, al correlacionar los niveles de lípidos peroxidados con las oscilaciones de glucosa, se observa una relación entre los niveles de pro-oxidación, el metabolismo y la luz. Los niveles de lipoperoxidación también oscilan de manera significativa en ambas estructuras tanto en condiciones de LO 12:12 como en OO durante 72hrs. La lipoperoxidación, producto de la foto-oxidación que se observa en la retina durante la foto fase (Figura 5d), parece ser un fenómeno exógeno de enmascaramiento, en tanto que el pico presente en la escotofase en ambas estructuras y que persiste en condiciones de oscuridad constante parece ser una oxidación producto del metabolismo y regulada al igual que este por el reloj circadiano.

En base a esto, y según lo propuesto por Aréchiga *et al.* (1993); y Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo (2003), tanto el complejo ganglio cerebroide-lóbulo óptico como la

retina aislada presentan la capacidad de mantener las oscilaciones endógenas en la actividad de las enzimas, la concentración de glucosa y los niveles de lipoperoxidación con variaciones circadianas, por lo que bien puede identificarse su funcionamiento con el de estructuras marcapaso, funcionando como tales en la defensa antioxidante del sistema glutatión en *Procambarus clarkii*.

VII. 3. Posibles Aplicaciones

Trascender las conclusiones como conclusiones estrictamente hablando, es decir, como fin y término del presente trabajo, es lo que otorga validez al conocimiento generado. El mundo comprendido por las personas no se da en un contexto acabado ni único, siendo esto el motor del diálogo y la actividad humana, pues todo acto humano se da dentro de lo social; por tal, aquí se mencionan algunas posibles aplicaciones con los datos obtenidos, solo como sugerencias en el campo de la ecología, la medicina y la economía.

Ecología.- Debido a que los factores y las condiciones ambientales determinan la distribución y la abundancia de los organismos vivos en los espacios geográficos, la luz, siendo ésta causante de la foto-oxidación y de la sincronización interna entre la generación de ROS y la defensa antioxidante del glutatión en *P. clarkii* según este trabajo, juega un papel importante en la actividad biológica que ha generado una respuesta adaptativa dirigida por el reloj biológico.

Por tal, siendo uno de los trabajos dentro de la ecología el generar estudios que permitan el establecimiento de áreas para la protección de ciertas especies o el generar estudios para permitir la preservación de especies biológicas endémicas a ciertas regiones; la realización de trabajos como éste, empleando otras especies de crustáceos e incluso en otros phyla animales y vegetales permitirá identificar posibles áreas de protección donde las circunstancias ambientales permitan un buen mantenimiento de las constantes fisiológicas para la mayoría de los organismos; en nuestro caso, una región cuyas condiciones de luz favorezcan el hacer frente al estrés oxidativo.

Además, problemas en la introducción de ciertas especies que puedan desplazar a otras nativas pueden ser previstos y potencialmente evitados; ejemplo de la carencia de lo anterior es esta especie de crustáceo decápodo que, introducido con fines comerciales a México, se ha establecido con éxito en el norte del país y ha desplazado especies nativas mexicanas como lo es *Procambarus digueti*. Que un estudio como el presentado aquí o como el desarrollado por Durán Lizárraga en el 2002, comparando las diferencias circadianas en los parámetros del glutatión entre *P. clarkii* y *P. digueti*, hubieran permitido imaginar el potencial adaptativo del primero sobre el segundo.

Medicina.- Considerando que existe una variación circadiana en la generación de ROS y una en la actividad de las defensas antioxidantes en el sistema glutatión antagonizando a la primera, podemos inferir que existen momentos en un intervalo de tiempo de 24 horas donde el sistema antioxidante es más activo y responde mejor neutralizando las perturbaciones del medio externo. Por tal, el desarrollo de tratamientos médicos destinados a contrarrestar patologías causadas por el estrés oxidativo debería considerar esta evidencia para identificar un momento óptimo en el cual, algún fármaco que pudiera generar ROS o una sustancia antioxidante, debieran ser administrados según el tratamiento. Aunque el presente trabajo se basa en una sola especie: *Procambarus clarkii*, estudios basados en la evidencia aquí mostrada pueden dirigirse a encontrar evidencia en humanos.

Por lo pronto, la deducción más lógica en este caso según nuestros resultados es que, en el caso de un fármaco que pudiese proveer de ROS al interior del organismo, el momento adecuado de su administración sería en los momentos en los cuales el sistema antioxidante del glutatión presentara sus valores máximos. Para el caso de la administración de un antioxidante, el momento idóneo sería cuando el sistema antioxidante del glutatión se encontrara en sus valores mínimos. Quedando aún por evidenciar el papel que juega la foto-oxidación en otros phyla de organismos, como el humano, para poder sugerir cabalmente un tratamiento nocturno.

Como algunas cefalalgias (o cefaleas) y algunas enfermedades visuales (como las cataratas), son padecimientos causados por el estrés oxidativo, un tratamiento eficiente

sería aquel que considere el comportamiento circadiano de las variables principalmente involucradas.

Economía.- Muchos crustáceos son empleados como recurso alimentario por el ser humano y *Procambarus clarkii* no es la excepción; sin embargo, aún no ha podido desarrollarse un protocolo para potenciar su mantenimiento en cautiverio con fines comerciales. El desarrollo acuícola de granjas de acocil deberá tener en consideración la importancia de mantener a esta especie en fotoperiodos de luz-oscuridad 12:12 para procurar una buena defensa hacia el daño oxidativo producido ya sea por la luz o por el metabolismo, incrementando con esta consideración las posibilidades de la crianza de este acocil.

Esta actividad, primordialmente económica, permitirá al ser humano seguir con la transformación de la naturaleza exterior y, por consiguiente, con la transformación de la propia naturaleza humana, empleando como uno de los medios para tal fin, la crianza de *P. clarkii* como recurso alimentario en geografías con diversas latitudes. 🐞

VIII. CONCLUSIONES

1.- Tanto la hemolinfa como el complejo GC-LO y la retina de *Procambarus clarkii* expresan ritmos circadianos de concentración de glucosa.

2 Las enzimas del sistema GSH tienen una actividad circadiana en ambas estructuras.

3. Particularmente en la retina, el sistema GSH parece antagonizar mejor el daño foto-oxidativo que el metabólico.

4.- La alternancia de Luz-Oscuridad es un sincronizador entre la generación diaria y circadiana de ROS y las variaciones endógenas en las defensas antioxidantes del Sistema Glutación, siendo este factor determinante en la protección contra el estrés oxidante en el GC-LO y la Retina de *P. clarkii*.

5.- La variación circadiana en los niveles de lipoperoxidación, tanto en el complejo GC-LO como en la retina aislada, parece estar acoplada tanto a la oscilación circadiana en la actividad enzimática de la GPx y la GRd, como a las variaciones circadianas en la concentración de glucosa en ambas estructuras: las primeras, reducen los niveles de lipoperoxidación y los mantienen en valores dentro de un intervalo fisiológico; la segunda, promueve su incremento al ser referencia del aumento en la actividad metabólica.

6.- La actividad circadiana de la GPx se encuentra acoplada principalmente a la variación circadiana de la concentración de glucosa en las estructuras (GC-LO y Retina), determinando las variaciones en la actividad de la GRd y antagonizando así este sistema el estrés oxidativo generado por el metabolismo de la glucosa. La luz sincroniza estas variables para maximizar el potencial antioxidante.

7.- Tanto el complejo GC-LO como la Retina de *Procambarus clarkii* parecen funcionar como estructuras marcapaso en el sistema antioxidante del GSH. 

IX. BIBLIOGRAFÍA

Alvarez Fontanet Ernesto. (1995). “Consecuencias del estrés oxidativo de la piel por radiaciones ultravioleta”. *Rev. Cubana Invest. Bioméd.* **14**(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403001995000100004&lng=es&nrm=iso. ISSN 0864-0300.

Anderson G. M., Zhang J., Brett J., Zu Yu S., Pinsky D. y Stern D. (1994). “Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins”. *Journ. Biol. Chem.*, **269**(13):9889-9897.

Aréchiga H., Fernández-Quiróz F., Fernández de Miguel F. y Rodríguez-Sosa L. (1993). “The circadian system of crustaceans”. *Chronobiol. Int.* **10**: 11-19.

Aréchiga H. y Rodríguez-Sosa L. (1997). “Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythmic behavior in decapod crustaceans”. *J. Mar. Biol. Ass.* **77**:17-29.

Aréchiga H. y Rodríguez-Sosa L. (1998). “Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish”. *Proc. R. Soc. Lond.* 1819-1823.

Aréchiga H. y Rodríguez-Sosas L. (2002). “Distributed circadian rhythms in the crustacean nervous system”. En: K. Wiese (Editor), *The Crustacean Nervous System*, Springer, Heidelberg, Germany. Pp. 113–122.

Bompart G. J., Prevot D. S. y Bascands J. L. (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.

Catañón-Cervantes O., Lugo C, Aguilar M, González-Morán G. y Fanjul-Moles M. L. (1995). “Photoperiodic induction on the growth rate and gonad maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* during ontogeny”. *Comp. Biochem. Physiol.* **110A**(2):139-146.

Chang E. S., Chang S. A. y Mulder E. P. (2001). “Hormones in the lives of crustaceans an overview”. *Am. Zool.* **41**, 1090-1097.

del Valle Ramiro, Ruiz Salvador, de Anda Salvador, Martínez Manuel, Pérez Miguel, Ortiz Juan, Pale José, Vargas Leonor y Enrique Gaona. (2004). “Modelo de experimentación básica para radiocirugía gamma y registros electrofisiológicos

estereotáticos del crustáceo *Procambarus clarkii*". Revista de Medica Sur. **11**(1):82-83.

DeCoursey Patricia J. (2004). "Overview of biological timing from unicells to humans. En: Dunlap Jay C., Loros Jennifer J., DeCoursey Patricia. (Editores). *Chronobiology: biological timekeeping*. Sinauer Associates Publishers. California, E. U. A. Pp. 3-23.

Durán-Lizárraga M. E., Prieto-Sagredo J., Gonsebatt M. E. y Fanjul-Moles M. L. (2001). "Crayfish *Procambarus clarkii* shows circadian variations in different parameters of GSH cycle". *Photochem. and Photobiol.* **74**(2): 350-355.

Durán Lizarraga M. E. (2002). "Variaciones circadianas en diferentes parámetros del sistema glutatión en dos especies de acocil". Tesis Doctoral. U. N. A. M. 70 pp.

Escamilla-Chimal E. G., Van Herp F. y Fanjul-Moles M. L. (2001). "Daily variations in crustacean hyperglycaemic hormone and serotonin immunoreactivity during the development of crayfish". *J. Exp. Biol.* **204**: 1073-1081.

Escamilla-Chimal E. G., Hiriart M., Sánchez-Soto M. C. y 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., Ángeles 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, U. N. A. M.

Fanjul-Moles M. L., Moreno-Saenz E., Villalobos-Hiriart N. y Fuentes-Pardo B. (1987). "Circadian rhythm in the course of the ontogeny in crayfish". *Comp. Biochem. Physiol.* **88**: 213-223.

Fanjul-Moles M. L. (1998). "Ontogenetic study of a circadian rhythm in crayfish: clock pacemaker and entrainment". *Comp. Biochem. Physiol.* **5**:153-160.

Fanjul-Moles M. L., Bosques-Tistler T., Prieto-Sagredo J, Catañón-Cervantes O. y Fernández-Rivera-Rio 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. y Escamilla-Chimal E. (2001). "Photoperiodic induction of ovarian maturation in crayfish *Procambarus clarkii* is mediated by extraretinal photoreception". *Chronobiol. Int.* **18**(3):423-434

Fanjul-Moles María Luisa y Prieto-Sagredo Julio. (2003). “The circadian system of crayfish: a developmental approach”. *Microscopy Research and Technique* 60:291-301.

Fanjul-Moles M. L., Durán-Lizarraga M. E., Gonsebatt M. E. y Prieto-Sagredo J. (2003). “The effect of photoperiod and light irradiance on the antioxidant circadian system of two species of crayfish: *Procambarus clarkia* and *P. digueti*”. *Photochem. and Photobiol.*, 77(2):210-218.

Fanjul-Moles M. L. (2006). “Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycaemic hormone in decapod crustaceans: review and update”. *Comp. Biochem. and Physiol.*, Part C **142**: 390-400.

Fanjul-Moles María Luisa, Prieto-Sagredo Julio, Santiago-López Darío, Bartolo-Orozco Ramón y Cruz-Rosas Hugo. (En prensa). “Crayfish *Procambarus clarkii* retina and nervous system exhibit antioxidant circadian rhythms coupled with metabolic and luminous daily cycles”. *Photochem. and Photobiol.*

Fingerman M. y Argimiro D. (1957). “Endogenous twenty-four hour rhythms of locomotor activity and oxygen consumption in the crawfish *Orconectes clypeatus*” *American Midland Naturalist*, **58**(2): 383-393.

Fingerman M. y Lowe M. (1957). “Twenty-four hour rhythm of distal retinal pigment migration in the dwarf crayfish”. *J. cell. Comp. Physiol.* **50**, 317-379.

Finkel T. y Holbrook N. J. (2000). “Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing”. *Nature*, **408**:239-247.

Gamaley I. A. y Klyubin I. V. (1999). “Roles of reactive oxygen species: signalling and regulation of cellular functions”. *Int. Rev. Cytology.* **188**:203-255.

Georgels-Kallen J. L. y 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.

Halliwell B. y Gutteridge J. (1998). “Free radicals in biology and medicine”. 3a ed., Oxford Science Publications. Oxford, 936 pp.

Hardeland R., Coto-Montes A., Burkhardt S. y Zsizsik B. K. (2000) “Circadian rhythms in non-vertebrate organisms”. En: The Redox State and Circadian Rhythms (editado por Driessche V., Guisset T., Petiau-de J. L. y Vries G. M.), *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, Netherlands. 121–140 pp.

Hardeland Rüdiger, Coto-Montes Ana y Poeggeler Burkhard. (2003). “Circadian rhythms, oxidative stress and antioxidative defense mechanism”. *Chronobiology International*, **6**:921-962.

Herrera Alfonso Luís. (1924). “Biología y Plasmogenia”. Herrero hermanos sucesores. México D. F., México, págs. 20 y 24.

Hiriarth Marcia (1998) “Mensajeros químicos y regulación neuroendocrina”. En: Fanjul-Moles María Luisa, Hiriarth Marcia y Fernández de Miguel Francisco. (Editores). *Biología Funcional de los Animales*. Siglo Veintiuno Editores, en coedición con la Facultad de Ciencias (U. N. A. M.). México D. F. México. Pp. 235-238.

Holdich David. (2002). “Biology of Freshwater Crayfish”. editorial Blackwell Science. Gran Bretaña.

Kallen J. L., Abrahamse S. L. y Van Herí F. (1990). “Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the hemolymph of crayfish”. *Biol. Bull.* **179**: 351-357.

Kashiwagi T, Meyer-Rochow V. B., Nishimura K. y 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.* **B167**:1-8.

Nelson W., Tong Y. L., Lee J. K y Halberg F. (1979). “Methods for cosinorhythmometry”. *Chronobiologia* **6**(4):305-323.

Olguín Albuerne M. A. (2008). “Cambios en el citoesqueleto de astrocitos de cerebro bajo condiciones de muerte celular”. Tesis de Licenciatura, U. N. A. M. 47 pp.

Page T. L. (2000). “A novel mechanism for the control of circadian clock period by light”. *Journal of Biological Rhythms*, **15**: 155–162.

Paglia D. E. y Valentine W. N. (1966). “Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase”. *J. Lab. Clin. Med.* **70**(1): 158–169.

Prieto-Sagredo J., Ricalde-Recchia I., Duran-Lizarraga M. E., Gonsebatt M. E. y Fanjul-Moles M. L. (2000). “Changes in haemolymph glutathione status after variation in photoperiod and light-irradiance in crayfish *Procambarus clarkii* and *Procambarus digueti*”. **71**(4):487-492.

Rice P. R. y Armitage K. B. (1974). “The influence of photoperiod on processes associated with molting and reproduction in the crayfish *Orconectes nais* (Faxon)”. *Comp. Biochem. Physiol.* **47A**: 243–259.

Rutter, J., Reick M., Wu L. C. y McKnight S. (2001). “Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors”. *Science* **293**: 510–514.

Shaw Ch. A. (1998). "Multiples roles of glutathione in the nervous system". En: *Glutathione in the Nervous System*. Pp. 3-23.

Stokkman K. A. Yamazaki S., Tei H., Sakaki Y. y Menaker M. (2001). "Entrainment of the circadian clocks in the liver by feeding". *Science* **291**(5503):490-493.

Tilden A., Brauch R., Ball R., Janze A., Ghaffari A., Sweeney C., Yurek J. y Cooper R. (2003). "Modulatory effects of melatonin on behaviour, hemolymph metabolites and neurotransmitter release in crayfish". *Brain Res.* **992**:252-262.

Wijnen Herman y Young Michael W. (2006). "Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms". *Annu. Rev. Genet.*, **40**:409-448.

Queda en la capacidad histórica de las personas construir y transformar el mundo humano en diálogo fecundo con los demás; y toca a nuestra conciencia entender el rumbo que a nuestros conocimientos damos, en constante proceso de construcción humana en comunión fraterna en la sociedad...

h.i.c.r., xihuitl 2008

Azcapotzalco-Tenochtitlán



grabado de José Guadalupe Posada