



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

"EFECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DE LA MELATONINA
EXOGENA, EN LOS PIGMENTOS DE MELANINA DEL
HIGADO DE Rana montezumae."

T E S I S

Que para obtener el Título de
B I O L O G O
P r e s e n t a

PATRICIA MONTENEGRO GARCIA



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.

A mis padres con cariño y agradecimiento por la confianza y el deseo de superación que siempre me han inculcado.

A mis hermanos:

Maru

Gabriela

Mónica

Silvia

Angélica y

Jaime

Los invito a llegar

hasta aquí.

*Deseo agradecer a la M. en C. Ma. Elena
Cuspinera M. directora de esta tesis, por
su valiosa ayuda que me oriento para la
culminación de mis estudios.*

*Con un especial agradecimiento a el Dr.
Salvador de Lara Galindo, por su aportaa
ción para el logro del presente trabajo.*

*Mi más sincero agradecimiento a mis compa
ñeras del laboratorio **Beatriz** y **Elisa**,
por su desinteresada colaboración.*

CONTENIDO

<i>Introducción</i>	<i>1</i>
<i>Antecedentes</i>	<i>12</i>
<i>Material y</i>	
<i>Método</i>	<i>16</i>
<i>Resultados</i>	<i>22</i>
<i>Discusión</i>	<i>39</i>
<i>Conclusiones</i>	<i>44</i>
<i>Tablas y</i>	
<i>Gráficas</i>	<i>45</i>
<i>Bibliografía</i>	<i>55</i>

INTRODUCCION.-

Los pigmentos de animales y plantas son muy numerosos y se pueden agrupar en 3 categorías principalmente: 1) pigmentos hemo, que se localizan en el interior del organismo: hemosiderinas, hematoidinas, bilirrubinas, hematinas y aposiderinas; 2) pigmentos lípidos, también localizados en el interior: lipofuscinas, ceroides y lipocromos y 3) pigmentos tirosina-triptofano, que se localizan normalmente en la coroides del ojo, tegumentos y anexos de la piel (Pearse, 1961).

El término melanina deriva del griego *melas*, que significa negro, y aunque fue utilizado por vez primera durante el siglo XIX por Berzelius para nombrar el pigmento negro, un extenso uso del término melaninas fue introducido por Robin en 1973 para describir los pigmentos naturales que fluctúan de amarillo a negro (amarillo, café, negro y aún violeta). El uso moderno de este término está basado en la sub-estructura química unificadora de melaninas, la cual nos indica que ellos son un derivado indol polimerizado.

Las melaninas prácticamente se encuentran en todos los organismos vivos, incluyendo plantas superiores, hongos y bacterias (Prota, 1980); y comprenden la mayor superficie pigmentada en el reino animal, Ca

si todos los animales superiores la poseen en la superficie del cuerpo concentrándose en algunas regiones más que en otras, y siempre dentro de células especializadas denominadas melanóforos en vertebrados de sangre fría (poiquiloterms), que junto con otros cromatóforos participan en el rápido cambio de color de los animales, dando origen a un rango variable de colores superficiales utilizados en el fenómeno de metización, en el caso de lagartijas, anfibios, cefalópodos, camarón y numerosos peces; y se denomina melanocitos en aves y mamíferos incluyendo el hombre (Fitzpatrick, 1966), en los que la superficie de pigmentación es más marcada en plumas y pelo, estos accesorios epidermales actúan como barreras extremadamente eficientes, y su pigmentación está indudablemente conectada con camuflaje y exhibición, sin embargo en mamíferos relativamente sin pelo (incluyendo las especies acuáticas), la epidermis está fuertemente pigmentada.

En cuanto a la función protectora de la melanina se sabe que la luz ultravioleta es absorbida por este pigmento, protegiendo de esta forma a los tejidos fundamentales de ser dañados por la radiación ultravioleta, y este mecanismo se basa en la propiedad que tie-

nen las melaninas de ser radicales libres, resultando en un fenómeno conocido como oscurecimiento del pigmento (Lerner 1959 y 1961).

El proceso de formación de melaninas se denomina melanogénesis y el sitio de síntesis de melanina en el citoplasma del melanocito es en un organelo especializado llamado melanosoma, el desarrollo del melanosoma involucra la síntesis de melanina y la organización de una matriz proteica. Estudios electroforéticos indican que varias especies de matriz proteica están -- presentes y que la estructura interna de melanosomas está compuesta de una combinación de proteínas estructurales (la mayor parte de ellas parece derivar de vesículas Golgi), y proteínas enzimáticas; la formación de un gránulo melanizado completamente es un proceso complejo involucrando fusiones sucesivas de vesículas de alrededor de 0.05 micrómetros de diámetro, resultando en una gran vesícula dentro de la estructura (estado I del melanosoma), un substrato es además depositado (estado II del melanosoma), sobre el cual la melanina se acumula (estado III del melanosoma). Finalmente alcanza el completo estado melanizado, el -- cual no exhibe más actividad de tirosinasa (estado IV) llamado gránulo de melanina maduro, que es muy elec -

trodenso en comparación a los estadios anteriores.

Las melaninas en animales se producen del metabolismo del aminoácido fenólico tirosina via 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA), o compuestos relacionados como dopamina o adrenalina, para formar 5,6 quinona la cual se polimeriza para producir el pigmento melanina (Raper, 1928); en el proceso interviene la enzima tirosinasa que actuó sobre la tirosina iniciándose la síntesis del pigmento. La ocurrencia de esta enzima tanto en organismos eucariontes y procariontes, es evidencia de que la melanogénesis aparece temprana en la evolución, por lo que se ha desarrollado básicamente sin cambios a través de la escala filogenética, hasta los mamíferos (Prota, 1980).

En vertebrados las células especializadas melanocito y melanóforo derivan de la cresta neural embrionaria (Niu, 1954) y de las evidencias histológicas en el hombre (Rugh en 1948) parece que las células de la cresta neural empiezan a migrar después de las 6 semanas de gestación, estos melanoblastos proliferan el lado bajo de la epidermis entre la décima y doceava semana, a las 14 semanas estas células penetran la epidermis e inicialmente ocupan una posición relativamente superficial, pero después los melanocitos están

presentes en otras partes del cuerpo, notablemente en el tronco uveal (túnica del ojo) y en el Sistema Nervioso Central (sustancia negra y meninges), también están asociados con vasos sanguíneos en el mesenterio visceral y peritoneo. Esto significa que de la fuente original de las células pigmentarias, ha sido muy extensiva la migración.

Así tenemos que Aire en 1973 encontró melanina - en oviducto de gallina; en túnica albugínea y en el tejido conjuntivo de testículo; Wolff en 1931 observó células pigmentarias con melanina en la coroides de - túnica vascular del ojo y en conductos semicirculares del oído; Borghesan en 1967, las encontró en el ligamento espiral, laberinto membranoso y estria vascular del oído en mamíferos y anfibios.

Por otro lado se han reportado numerosos estudios en los que se han encontrado pigmentos internos de melanina en anfibios. Dawson en 1953 reporta melanóforos en vasos sanguíneos de Rana pipiens; Eylehsymer en 1906 los observó a lo largo de las venas cutáneas en Nectururus; Azcoaga en 1960 localiza granúlos melánicos en neuronas del Sistema Nervioso de renacuajos; Van Woert en 1967 estudia la melanina del hígado del anfibio Amphiuma tridactylum, que se localiza en

melanóforos dispersos ocupando en 15 % de las células del hígado; Noda en 1976 y Cicero en 1977 observaron estos pigmentos en hígado, meninges, peritoneo parietal y visceral, y pericardio de anfibios; recientemente Cuspinera y colaboradores (1981a), los observaron en grandes acúmulos en Rana montezumae en piel, glándulas mucosas subcutáneas, músculos esqueléticos, corazón, timo, pulmones, mesenterios y peritoneo, vasos sanguíneos, hígado, bazo, ovario y en el Sistema Nervioso en meninges y dentro de algunas neuronas del lóbululo óptico, comprobando posteriormente mediante reacciones histoquímicas, que se trata efectivamente de pigmentos de melanina (Cuspinera y col. 1981b).

Es importante mencionar que la función de estos pigmentos de melanina en sitios internos se desconoce por lo que es un campo abierto para posteriores investigaciones, pero lo que sí se sabe es que estas melaninas viscerales son importantes por el hecho de que están relacionadas con aspectos patológicos, como por ejemplo en algunas enfermedades que se caracterizan por depósitos de melanina que aumentan en algunas vísceras, como en el caso de el hígado con Síndrome de Dubin-Johnson, o en un descenso en el depósito de melanina en el tallo cerebral como sucede en la enferme

dad del Parkinson y Fenilcetonuria, o la Hemocromatosis que constituye un desarreglo ambiguo en el depósito de melanina. Y en general los melanomas que son tumores relacionados con la pigmentación de melanina y -- que pueden aparecer en cualquier órgano (Altschule, 1976).

Los melanosomas carecen de la propiedad de movimiento dentro de los melanocitos en mamíferos, pero pueden contribuir a cambiar el color a largo plazo -- variando el número de células presentes en la piel o cabello, o bien cambiando la cantidad total del pigmento de la célula; este cambio a largo plazo recibe el nombre de cambio morfológico de color y contrarresta con el cambio fisiológico de color debido a cambios a corto plazo y relativamente rápidos en la dispersión y agregación de melanosomas, dependiente de la presencia de melanóforos, dentro de las ramificaciones dendríticas de los mismos (Hadley, 1966 y Barrington, 1977).

Examinando la regulación de la respuesta de los melanóforos en anfibios, se observa que el cambio de color fisiológico lo producen principalmente los melanóforos dérmicos, y el oscurecimiento lo provoca la liberación de una hormona hipofisaria que es la

hormona estimulante de los melanocitos (MSH), liberada por la porción intermedia por lo que también se le conoce como intermedina. Las investigaciones para el control hormonal del cambio de color empezaron cuando Smith de la Universidad de California y Jennet de la Universidad de Kansas, encontraron que quitando la glándula hipófisis de los renacuajos, ranas y ciertos animales, resultaba un marcado aclaramiento de la piel; inversamente se demostró que inyecciones de extracto de pineal producen blanqueamiento; al mismo tiempo la primera pista de una función activa de la glándula pineal fue descubierta por McCord y Allen en 1917, quienes agregaron extractos de glándula pineal de res a el agua con renacuajos, y observaron -- que su piel se volvió muy transparente tanto que sus corazones e intestino eran claramente visibles a través de ella, más aún el estudio reveló que este cambio en la pigmentación era causado por la aglutinación de melanina dentro del melanóforo, bajo la influencia de extractos de pineal.

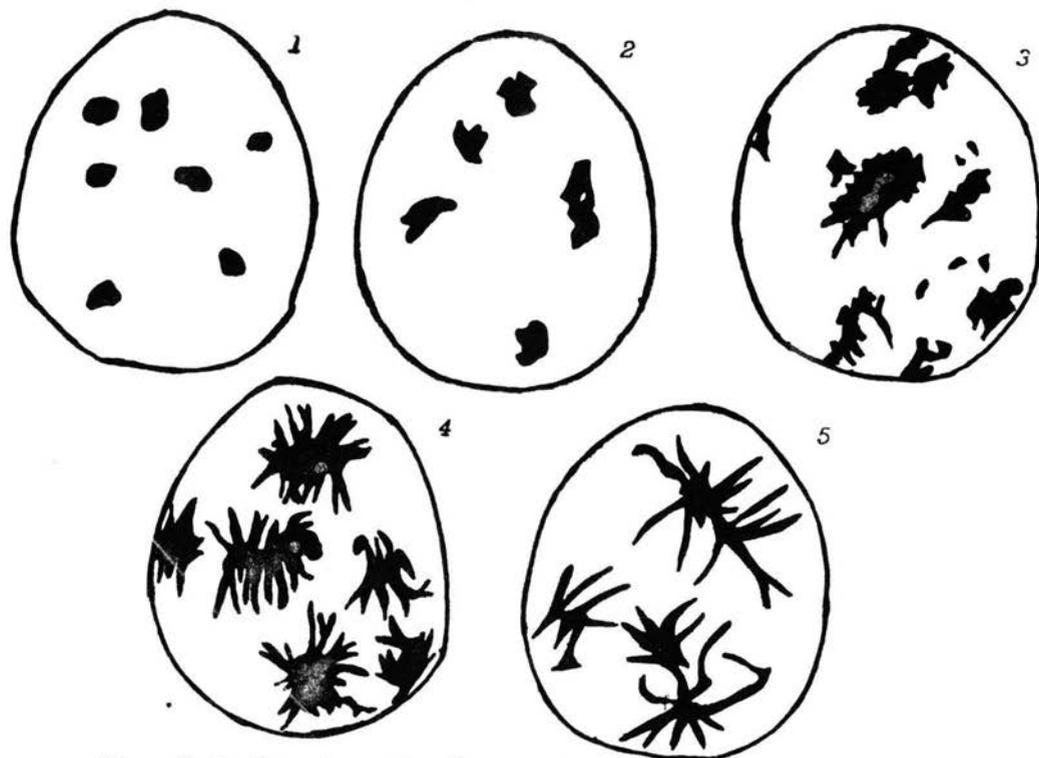
Durante la vida del renacuajo aparece el control del hipotálamo sobre la porción intermedia, los renacuajos jóvenes que carecen de esta regulación hipotálamica, adquieren una palidez característica cuando -

se les mantiene en obscuridad (Bagnara, 1963). Esta respuesta se atribuye a la liberación de melatonina - por la glándula pineal, que es un poderoso agente de agregación (Lerner 1958) que aparece ampliamente en - los vertebrados, tanto en las formas inferiores como en aves y mamíferos. Esta substancia provoca la agregación de los granúlos de melanina en melanóforos idérmicos y la reducción citoplásmica de sus ramificaciones dendríticas en larvas que no poseen control hipotalámico sobre la porción intermedia, como en aquellas que ya lo tienen, siendo posible también una respuesta controlada por MSH en cuanto a la dispersión de granúlos de melanina. Tanto la melatonina como la MSH pueden contribuir así a las respuestas de agregación y dispersión de granúlos de melanina en larvas que poseen control hipotalámico sobre la porción intermedia. Por lo que se dice que la acción de la melatonina es exclusivamente larvaria, puesto que carece de influjo significativo en las respuestas de los adultos, y estos no suelen palidecer en la obscuridad, sin embargo, el papel de la pineal en la respuesta de los melanóforos es todavía poco conocida (Hedley y Bagnara, 1975).

Los estudios del cambio de color en anfibios se

han centrado sobre todo en las respuestas coordinadas de los adultos (en los que hay regulación hormonal) al medio y a la iluminación. Los que se producen cuando se traslada a los animales (generalmente Rana o Xenopus) a tres tipos de medio: blanco iluminado, negro iluminado y totalmente oscuro (es decir, no iluminado). Young (1962) menciona que Hoghen y Slone, introdujeron una medida cuantitativa a fin de reducir el elemento subjetivo que interviene en la apreciación de la palidez y obscurecimiento relativo, con la distinción de cinco fases de los melanóforos, comprendidas entre el totalmente disperso y el completamente agregado. A cada fase se le da un número arbitrario, pudiendo expresarse así la situación media de los melanóforos de un individuo por un índice de melanóforos (MI), entre el 1 y el 5 (ver figura 0).

Actualmente el movimiento de los gránulos de melanina dentro de los melanóforos en anfibios, se considera que está bajo control hormonal y la MSH es la principal hormona reguladora (Terlou, 1974 citado por Saxena, 1981). Sin embargo un efecto establecido del tratamiento de larvas o adultos de anfibios con extractos de pinal, es el palidecimiento de su piel como resultado de la agregación de melanina en los --



*Fig. 0 Índice de melanóforos (melanocitos) de Hogben
y Slome (de Young 1962)*

melanóforos (Mc Cord y Allen, 1917); Beall y col. en 1937 encontraron que esta substancia responsable del aclaramiento era una base nitrogenada insaturada; posteriormente Lerner y col. en 1958 la aislaron de la glándula pineal pulverizada de res llamándola melatonina, esta substancia posee el 95% de la actividad biológica recuperable después del paso cromatográfico en el procedimiento de aislamiento (Novales, 1965), - su estructura fue dilucidada por Lerner en 1959 quién también demostró que era N-acetil-5-metoxi-triptamina y en 1960 observó que el compuesto sintético tiene idénticas propiedades que la substancia natural. La melatonina es aproximadamente 100 000 veces más potente que la noradrenalina, la cual era considerada anteriormente como el agente aclarador más activo.

Sin embargo, la significancia fisiológica de éste fenómeno es todavía poco clara, Bagnara en 1963 obtuvo evidencias que favorecen la idea de que la pineal está involucrada en la reacción de aclaramiento -- del cuerpo de larvas de Xenopus en la oscuridad; Simmonet y col. en 1952 y 1954 encontraron que al extraer la pineal (epifitsectomía), se produce obscurecimiento en la Rana esculenta, pero el hecho de que el tratamiento con extracto de pineal no incrementa la -

palidez producida por epifisectomía, argumenta contra la importancia de este efecto en el control de melánoforos normales (Novales, 1965).

En la comadreja (Mastela erminea bangsi) Rust y Meyer en 1962 sugieren que la liberación de melatonina actúa sobre el hipotálamo, resultando en la inhibición de la liberación de MSH; Kastin y col. en 1972 proponen una completa interacción en un llamado axis "pineal-hipotálamo-hipófisis", y que la MSH inhibe la secreción de melatonina.

Hadley y Bagnara en 1969, observaron que la melatonina y norepinefrina sólo invierten débilmente la acción de oscurecimiento de MSH en piel de Rana pipiens, y causan sólo agregación de melanina exclusivamente dentro de un pequeño número de melánoforos dermales; por el contrario, en ausencia de MSH la melatonina provoca una completa concentración de la melanina en los melánoforos dermales. Esto sugiere que la melatonina solo es efectiva en la ausencia de MSH, Bagnara y Hadley en 1970, Charlton en 1966 y Sarena en 1981, consideran la agregación de gránulos de melanina en melánoforos dermales, como el resultado de la acción directa de melatonina y no de la inhibición de MSH por el hipotálamo o la hipófisis.

Además, se ha probado que la melanina se concentra por efecto de la melatonina en sistemas *in vitro*, (Lerner y Case, 1960a; Seldenrijk, 1979 y 1982), de lo que se concluye que la melatonina actúa directamente sobre los melanóforos dermales, ya que estas células aisladas del control nervioso también responden a la melatonina, aunque a un grado menor de aclaramiento que los melanóforos en un sistema *in vivo*. Y aún cuando en el presente estudio se pretende observar la concentración de melanina en melanóforos viscerales por acción de la hormona melatonina, la posibilidad de -- que ésta hormona aclaradora inhiba la liberación de MSH de la porción intermedia de la hipófisis, en respuesta a la fotoestimulación de la glándula pineal, -- no puede ser completamente descartada.

Por último, se ha visto que la melatonina produce contracción de melanóforos profundos sobre vasos sanguíneos y nervios, así como algunos órganos que no fueron especificados en estudios de Baganara en 1960, y en el tegumento de Xenopus laevis, Ambystoma opacum y Rana pipiens, utilizando concentraciones de -- 0.01 mg de melatonina por un ml de agua; y que en la reacción de aclaramiento del cuerpo de larvas Xenopus en donde hay liberación de melatonina, la concentra --

ción de la melanina de los melanóforos empieza alrededor de los 15 min. posteriores a esta liberación a temperatura de laboratorio (23° C), y la máxima palidez ocurre aproximadamente a los 30 min., por lo que se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

Si la melatonina es un potente agente aclarador, concentrando la melanina contenida en melanóforos profundos, entonces inyecciones intraperitoneales de esta hormona, traerán como consecuencia la concentración de melanina en melanóforos localizados en el hígado de Rana montezumae.

MATERIAL Y METODO.-

Se utilizaron 40 ranas con un peso promedio de 40.65 gr de la especie Rana montezumae (Baird, 1854), que fueron identificadas con la ayuda del laboratorio de Herpetología del Instituto de Biología de la UNAM, utilizando una clave para anfibios de México (Hobart, 1966), los organismos fueron traídos de unos criaderos localizados en los Estados de Michoacán y Guanaquato en México.

Se utilizaron ranas sexualmente adultas para el estudio, los organismos se mantuvieron en observación durante una semana con el objeto de verificar su salud, y que no presentaran síntomas de alguna enfermedad como la de la "pata roja" muy frecuente en ranas mantenidas en cautiverio (Müller, 1976). Permanecieron en un acuario de plástico con tapa de malla y con agua electropura hasta un nivel que sólo cubriera la mitad de su cuerpo, el agua fue sustituida diariamente por agua fresca y el acuario fue provisto de piedras de río, que les permitiera a los organismos permanecer fuera del agua cuando lo quisieran, quedando constituido lo que se conoce como aquaterrarium ubi cándolo en un Bioterio.

Durante este tiempo los organismos estuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio tales como: temperatura ambiente de 25° a 27° C, períodos de 12 horas de luz natural y 12 horas de obscuridad y una alimentación básica que consistía en una mezcla de hígado de pollo crudo picado, revuelto con mosco seco molido, ésta se les daba manualmente dos veces por semana en forma directa.

Después de este período de observación se separaron 30 ranas en lotes de 5 ranas cada uno, de los cuales 3 se utilizaron como testigos y los otros 3 como experimentales. Se ensayaron tres dosis de la hormona melatonina pura cristalizada (Sigma Chemical), dichas dosis fueron 0.5, 1.0 y 1.5 mg que se pesaron en balanza analítica, para después disolverse en un ml de Ringer para anfibios e inyectarse intraperitonealmente, es importante mencionar que se intentó utilizar alcohol etílico en diferentes concentraciones para disolver la hormona, pero aunque formaba una solución homogénea el alcohol causaba un shock muy agudo a las ranas, por lo que se utilizó solo el ringer para anfibios.

Antes de iniciar el tratamiento las ranas fueron pesadas y para cada una de las dosis utilizadas se -

empleó un lote de 5 ranas con su respectivo lote testigo; a las ranas del lote experimental se les inyectaron 0.5 mg de melatonina disuelta en un ml de ringer para anfibios a temperatura ambiente, y el lote testigo correspondiente fue inyectado con un ml de ringer también a temperatura ambiente, después, cada una de las ranas de ambos lotes (testigo y experimental) fueron colocadas en diferentes acuarios y se dejaron transcurrir 15 minutos, observando a cada lote durante éstos. Al límite del tiempo fijado se les anestesió con cloroformo. La anterior se repitió para las dosis de 1.0 y 1.5 mg de la hormona.

Una vez anestesiadas se procedió a tomarles la longitud total midiéndoles desde el hocico a la punta del dedo más largo de la pata, así como la longitud de la punta del hocico al ano para determinar el sexo del organismo, la cual debe ser de un mínimo de 74 mm para las hembras y de 70 mm para los machos; el sexo puede también ser distinguido por las válvulas cloacales en las hembras las cuales están ausentes en el macho, a continuación se disecaron utilizando para éste efecto charolas con parafina y bajo un microscopio estereoscópico.

En esta primera parte se hicieron observaciones

generales de la mayoría de las estructuras con pigmento, obteniendo al mismo tiempo fotografía de la víscera en estudio a diferentes aumentos, en posición ventral y dorsal, se tomó nota de todos los aspectos de interés observados; durante la disección se revisaron los órganos reproductores para confirmar la revisión hecha en cuanto al sexo del individuo, después de esto, se extrajo el hígado completo colocando los lóbulos en frascos conteniendo formaldehído al 10%, en este punto se etiquetaron los frascos con los siguientes datos: número de lote al que pertenece el organismo, dosis utilizada, intervalo de tiempo transcurrido después de la inyección de melatonina, la fecha del experimento y una clave que está relacionada con la información que se tomó después de ser anestesiada la rana.

Al término de una semana en la que los órganos permanecieron en el fijador, se dejaron lavando en agua corriente durante un día, a continuación se procesaron las piezas en el histoquinette en el que se deshidrataron en alcoholes crecientes, se aclararon en cloroformo e impregnaron en parafina y finalmente se incluyeron en parafina. Una vez obtenidos los bloques de parafina con los órganos, se hicieron cortes

de 6 micras en un microtomo de rotación de tres secciones del hígado, 10 de la parte apical, 10 de la medial y 10 de la base de los cortes, desechando el resto de la pieza; a los cortes se les pusieron una gotas de alcohol al 30% para que se extendieran y se dijeron flotar en un baño maría a 54° C para eliminar el exceso de parafina, y al cual se le agregó previamente gretina para que los cortes se adhirieran al porta objetos. Después se colocaron las laminillas en canastillas y se metieron a la estufa a 40° C durante una noche, tras la cual se tiñeron con una tinción de rojo nuclear rápido (Kernechtrot), que se seleccionó por la cualidad que presenta de teñir en tonos claros, la tinción de hematoxilina-eosina tiñe los núcleos os curos, los cuales se podrían confundir con los pigmen tos de melanina.

En una segunda parte se hicieron observaciones de las laminillas utilizando un fotomicroscòpio Reich ert con cámara, obteniéndose a partir de diapositivas impresiones a color de la víscera que contiene pigmen tos, al mismo tiempo se hicieron notas de aspectos m orfológicos de las células que contenían los pigmen tos de melanina. Después se cuantificó el área ocupa

da por el pigmento revisando tres campos por cada corte de cada sección (apical, medial y basal), utilizando un ocular micrométrico de 20 cuadrículas por lado que fue calibrado con una rejilla micrométrica de 2mm de longitud, usando la lente objetiva de 10x y una lente ocular también de 10x, que al final nos daba un área real de 2500 micras cuadradas para cada cuadrícula de la rejilla a 100 aumentos.

Se calculó la media total de los 3 conteos (apical, medial y basal) por corte, resultando grupos de 30 medias para cada rana de los lotes testigo y experimental para cada una de las tres dosis revisadas; estos grupos de datos se procesaron en una computadora para obtener las estadísticas básicas (media aritmética, desviación standard, varianza y error standard) y la prueba de t Student; con los datos así obtenidos se hicieron gráficas, cuadros y tablas comparativas, para determinar si alguna de las dosis empleada tuvo el efecto esperado sobre los pigmentos de melanina, en las células del hígado de Rana montezumae.

RESULTADOS.-

De las observaciones al microscopio estereoscópico a 10 y 40 aumentos, de los hígados tratados con diferentes dosis de la hormona melatonina (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml), no se encontró cambio aparente en la distribución y cantidad de manchas melánicas, excepto en el tamaño de éstas con respecto a las de los testigos. En los hígados de las ranas inyectadas con 0.5 mg/ml de melatonina las manchas melánicas disminuyeron en un 30% aproximadamente del tamaño normal, en comparación con las de los hígados de las ranas no tratadas y que sólo fueron inyectadas con un mililitro de ringer para anfibios. (Ver figura 3 y 4)

Para la parte de micrometría se revisaron 30 cortes de un sólo lóbulo de cada hígado de rana, tanto experimental como testigo; se cuantificó el número de cuadros de la rejilla ocular ocupados por el pigmento de melanina en tres campos para cada corte, sabiendo que cada cuadro de la rejilla tiene un área real de 2.5 mm cuadrados a 100 aumentos al microscopio fotónico; se escogió este aumento para el conteo por la ventaja de que se revisa la mayor parte de la superficie del corte con un menor número de campos, ya que a otros aumentos los pigmentos de melanina ocupan la to

talidad del campo ocular, ver figura 7, sobrepasando el área cuadrículada de la rejilla ocular utilizada; de éstas observaciones se calculó que las células pigmentadas en el hígado de R. montezumae miden 0.03 mm en promedio.

Con los tres valores registrados de la revisión para cada corte se sacó un promedio, de tal forma que se obtuvieron de los 30 cortes por lóbulo, 30 datos de los cuales los 10 primeros correspondían a la zona apical del lóbulo, los 10 siguientes a la medial y los 10 restantes a la zona basal; a continuación cada grupo de estos datos se sumó y promedió para obtener solo un valor medio para cada región del lóbulo. Esto se hizo con el objeto de detectar alguna variación local en el efecto contractor de la melatonina, que se verificó haciendo un análisis estadístico aplicando la Prueba de t Student, en la que se comparó el valor obtenido de la suma de las medias apicales de los hígados testigo revisados, con el valor resultante de las medias apicales de los hígados tratados, lo mismo se hizo para las otras dos parejas de valores: el valor de las medias mediales de los testigo contra el valor de las medias mediales de los experimentales, y el valor de las medias basales de los testigo contra el valor de las medias basales de los experimentales,

para cada una de las dosis probadas.

Encontrándose, por un lado, que no hay variación estadísticamente significativa en el área ocupada por el pigmento a diferentes niveles en el lóbulo, ya que los resultados de las pruebas estadísticas nos conducen a aceptar la hipótesis nula donde $H_0: \bar{X}_{\text{testigo}} = \bar{X}_{\text{experimental}}$, es decir, que el área que ocupa el pigmento es similar no importando al nivel al que se encuentre (apical, medial y basal) para cualquiera de las tres dosis; y por otro lado, que el área que ocupa el pigmento en los lóbulos testigo es también similar a la ocupada por la melanina en los hígados tratados con las dosis de 1.0 y 1.5 mg/ml de melatonina. Como vemos solo se rechaza la hipótesis nula para el área que ocupa el pigmento en los hígados de las ratas inyectadas con 0.5 mg/ml de melatonina, aceptando se de esta manera la hipótesis alternativa que nos dice que el área que ocupa la melanina en los hígados testigo, es mayor que la ocupada en los hígados tratados con esta dosis de hormona melatonina ($H_a: \bar{X}_{\text{testigo}} > \bar{X}_{\text{experimental}}$).

De lo anterior se concluye que de las tres dosis de la hormona melatonina revisadas, la de 0.5 mg/ml tuvo el efecto esperado, y que la disminución en el área que ocupa este pigmento se lleva a cabo en todo el lóbulo.

bulo del hígado, y no sólo en zona superficiales.

Los valores de las estadísticas básicas sacadas para los datos de número de cuadros totales ocupados por el pigmento melanina en hígados de ranas testigo e hígados de ranas inyectadas con melatonina se concentran en la tabla 1, en la que se puede observar - que se reunieron en una media poblacional, ambas de 5 individuos para cada una de las dosis, los valores promedio de cada lóbulo-rana y que representan la sumatoria de las tres medias (apical, basal y medial), revisada para cada uno. A continuación se hicieron histogramas con estos valores, en los que en el eje de las "y" se graficó el área ocupada por el pigmento en mm^2 , la cual se obtuvo de multiplicar el número de cuadros que ocupa el pigmento en las poblaciones testigos y en las experimentales de cada una de las dosis, por el valor en mm^2 de cada una de las cuadrículas, que como ya se mencionó es igual a $2.5 mm^2$; y en el eje de las "x" se graficaron las dosis de melatonina probadas.

La gráfica 1 corresponde a las áreas de los datos testigo y en la 2 se encuentran los de los datos experimentales, de la comparación de ambos histogramas se detecta que sólo en los hígados tratados hormonalmente con $0.5 mg/ml$, hay una disminución en el área

área, mientras que en las otras dos dosis las medias experimentales de ambas, caen dentro de los errores estándar de las medias poblacionales testigo, lo cual indica que para dichas medias no hay diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos aplicando la prueba de *t Student*, que se utilizó para verificar si había alguna diferencia estadísticamente significativa entre poblaciones testigo y experimentales tratadas con tres diferentes dosis de la hormona melatonina. Como se puede observar y como ya se mencionó anteriormente, sólo para el caso de la dosis de 0.5 mg/ml se rechaza la hipótesis nula, cuyo valor de *t analítico* igual a 2.45323 es mayor al valor de tablas a 95% de confiabilidad y 9 grados de libertad que corresponde a 1.8331 (Tablas de Wayne W. Daniel), de esta forma se acepta por lo tanto la hipótesis alternativa.. (Ver tabla 2)

En los otros dos casos, ambos valores de *t analíticos* son menores al valor de tablas, luego entonces, no existe diferencia estadísticamente significativa entre la población testigo y la experimental para ninguna de estas dosis.

Es importante indicar que el valor de tablas es igual para los tres casos, ya que se utilizó el mes

mismo número de organismos para cada caso. (10 orgs) por lo que los grados de libertad son 9 para los tres análisis de *t* Student ($L = N - 1$, $L = 10 - 1 = 9$), y a 95% de confiabilidad en todo el experimento nos da un valor de 1.8331 para la *t* de tablas.

Ante estos resultados se repitió el experimento utilizando sólo la dosis efecto (0.5 mg/ml) en otros dos lotes de 5 ranas cada uno, un lote experimental y otro testigo, de nueva cuenta se cuantificó el área ocupada por el pigmento melanina siguiendo la secuencia descrita anteriormente para el primer ensayo. Los datos de este segundo ensayo, se reunieron con los primeros como se puede observar en la tabla 3 para el testigo y en la tabla 4 para los experimentales, aumentando por consiguiente nuestras poblaciones a 10 individuos cada una; al igual que los primeros datos, se les sacaron sus estadísticas básicas y se obtuvo la sumatoria para cada columna de datos. El promedio de las medias aritméticas y sus errores standard se multiplicó por 2.5 mm para calcular el área real y ser graficados como se observa en la gráfica 3, encontrándose que aparentemente las medias son iguales resultado contrario al que esperaríamos encontrar basándonos en el primer ensayo, pero al comparar ambas poblaciones (testigo y experimental) en una prueba de *t*

Student, se encuentra un valor analítico de 1.04984 que es mayor al valor de tablas igual a 0.68, lo que nos lleva a rechazar la hipótesis nula que propone que las medias son iguales, por lo tanto aunque de forma gráfica se observa que aparentemente no hay diferencia significativa entre las medias testigo y experimental, el análisis estadístico mostró que dichas medias no son iguales (Ver gráfica 3).

Al analizar los valores promedio para cada hígado-rana de ambos ensayos, nos llama la atención la heterogeneidad en las medias de la población experimental, ver tabla 4, encontrándose valores desde 2.62 hasta 13.09. por otra parte se detecta que los valores bajos corresponden a hígados de ranas hembras y los altos a hígados de ranas machos; lo que nos sugiere que las medias del área que ocupa el pigmento en la población de ranas tratadas con 0.5 mg/ml de melatonina, son diferentes para cada sexo, por lo que se prosiguió a separar los datos en grupos atendiendo al sexo del organismo, de esta manera se formaron los siguientes 4 grupos: hembras testigo (1), machos testigo (2), hembras experimentales (3) y machos experimentales (4), ver tabla 5; esto se hizo con el objeto de comparar estos grupos entre sí, de lo que esperaríamos encontrar que el grupo 1 y 2 son

iguales entre sí y diferentes de los 3 y 4, que a su vez son iguales entre sí. Con este objetivo se hizo primero un análisis de Varianza, el cual no indicaría la similitud o diferencia de estas medias entre sí, y cuya hipótesis nula por lo tanto es igual a $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$; pero como el valor calculado de la razón de varianzas (R.V) 14.555 es mayor que el valor de F 3.24 se rechaza esta hipótesis, y la hipótesis alternativa se acepta $H_a: \mu_i \neq \mu_j$ luego entonces por lo menos una de las medias de los 4 grupos es diferente, ver tabla 6. A continuación para conocer cual o cuales medias son diferentes al resto se hizo una prueba de Scheffe, en la que se comparó siempre que se comparó al grupo de hembras experimentales (3), con cualquiera de los otros (1, 2 ó 4), se rechazó la hipótesis de que ambas medias fueran iguales; y en los casos en los que se compararon el resto de los grupos entre sí, la hipótesis nula no se rechazó, ver tabla 7. De lo que se concluye que el único grupo diferente fue el de las hembras experimentales, por lo tanto podemos suponer que el efecto contractor de la hormona melatonina, sólo es positivo en las hembras de R. montezumae.

La figura 1 muestra como se observan los pigmentos negros de melanina, en un lóbulo normal de hígado de R. montezumae hembra a 100 aumentos al microscópio estereoscópico, en ella se distinguen los pigmentos distribuidos homogéneamente y en diferentes niveles del órgano, como también se puede notar sólo se aprecian los pigmentos en la superficie y primeras capas inmediatas a ésta. Sin que por esto se diga que sólo están presentes en estas regiones, si no que son difíciles de observar a niveles más profundos por el grosor del tejido, además de que éste se encuentra muy vascularizado.



Fig. 1 Pigmento melanina (pm) en hígado de R. montezumae hembra.

Las figuras 2 y 3 nos muestran un panorama general de un hígado testigo inyectado con un mililitro de ringer y otro experimental tratado con 0.05 mg/ml de melatonina, ambos de ranas hembras, vistos a 100 aumentos al microscopio estereoscópico; en la figura 2 se pueden distinguir las manchas oscuras del pigmento melánico en la superficie y capas profundas de la víscera, que comparadas con las del hígado experimental en ésta se observan un poco más pequeñas dándole un aspecto de palidez al hígado, sin observarse cambio aparente en la distribución de éstas manchas en ambas muestras.

Esta diferencia, en cuanto a el área ocupada por los pigmentos, se hace más evidente a 400 aumentos si comparamos la figura 4 de un hígado testigo con la figura 5 de uno con tratamiento hormonal, y que corresponden a las mismas regiones ya descritas arriba, donde además se aprecia la malla de pequeñísimos vasos sanguíneos que irrigan a este órgano.

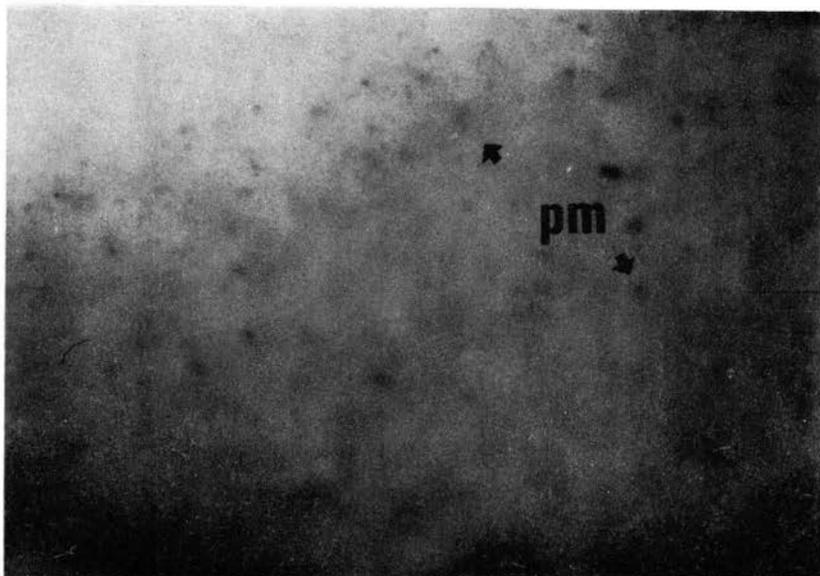


Fig. 2 Aspecto general de un hígado testigo hembra a 100x, donde se observan sus pigmentos de melatonina claramente (pm).

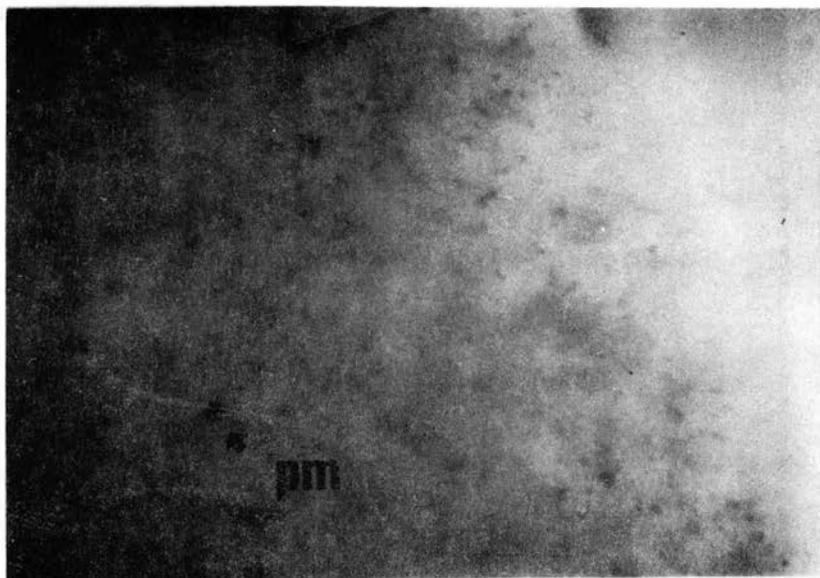


Fig. 3 Muestra un hígado de una rana hembra tratado con 0.05 mg/ml de melatonina, con sus pigmentos (pm) un poco reducidos en tamaño vistos a 100x.



Fig. 4 Fotografía de un hígado testigo de rana hembra donde se observan los pigmentos de melanina - (pm) y algunos vasos sanguíneos (vs), a 400x.

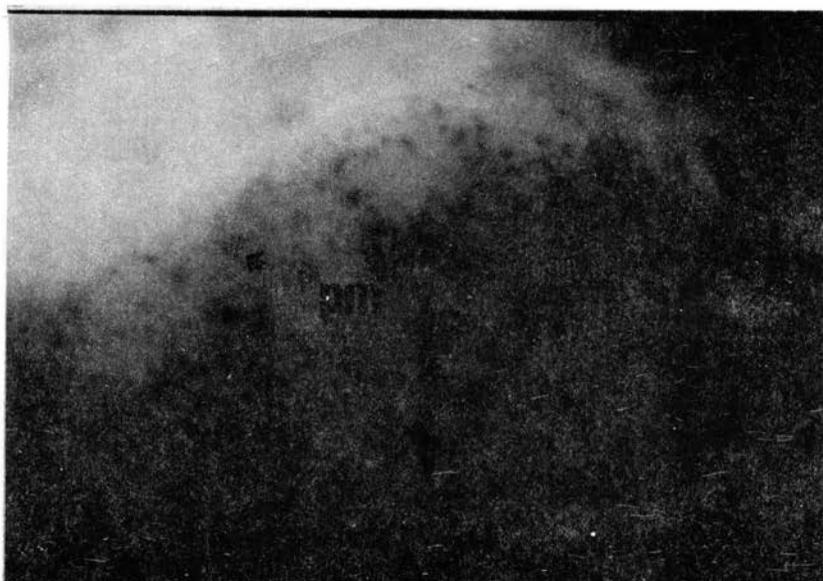


Fig. 5 Fotografía a 400x de un hígado experimental de rana hembra, nótese la apariencia pálida del - órgano comparado con el de arriba, debida al a glutinamiento de melanina (pm).

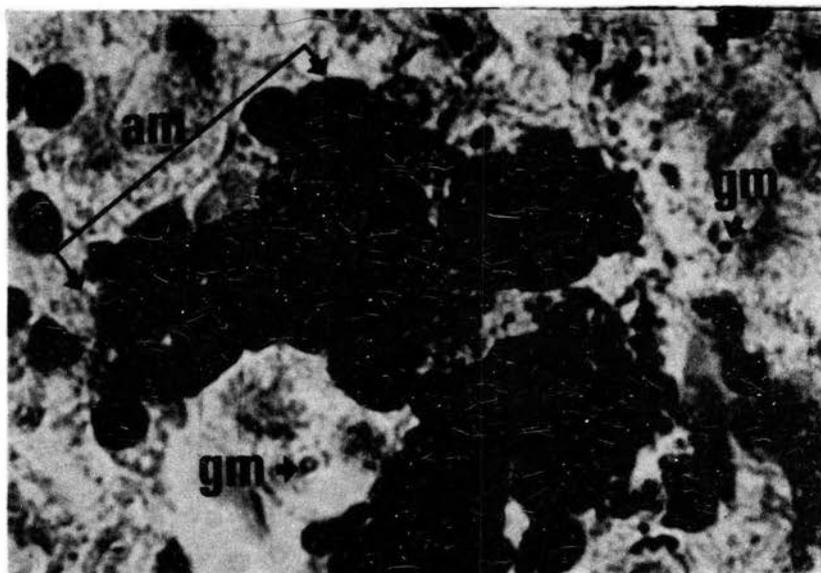


Fig. 3 Corte de hígado a 630x, donde se observan los acúmulos de melanóforos (am) y algunos gránulos de melanina extracelulares (gm).

En observaciones de los cortes hechos a 6 micras, vistos a 630 aumentos al microscopio fotónico, figura 6, se observa que la mayoría de los pigmentos están dispuestos en grupos o acúmulos de melanóforos (am) de forma redondeada y localizados entre los hepatocitos (intercelulares). Además se localizan algunos gránulos de melanina (gm) dentro de las células del hígado, así como fuera de ellas.

La figura 7 corresponde a un corte representativo de los hígados de ranas hembras testigo, en ella se observa como los gránulos de melanina se encuentran dispersos en todo el citoplasma de los melanóforos, sin poder apreciar por esto el núcleo. Algunos se ven más electrodensos que otros, debido quizás a que estos últimos son melanosomas en formación o a la posición que guardan dentro del corte; pero independientemente de donde se encuentren, los gránulos de melanina presentan la forma característica del gránulo de melanina de los melanocitos de la piel de mamíferos, ésta es ovoidal y con pocas variaciones en su tamaño, también se alcanza a identificar en esta fotografía la membrana celular de un melanóforo.

A diferencia de la figura 7, en la figura 8 que es un corte representativo de los hígados de ranas hembras experimentales, encontramos que los gránulos del pigmento se acumulan o concentran en espacios más reducidos, en éste caso se observan los melanóforos con el pigmento muy electrodenso, el número de gránulos excéntricos es menor y no se observa cambio alguno en la estructura celular de las células hepáticas; de lo que se deduce que los melanosomas se agregaron dentro de los melanóforos por efecto de la melatonina, sin alterar el resto del tejido hepático.

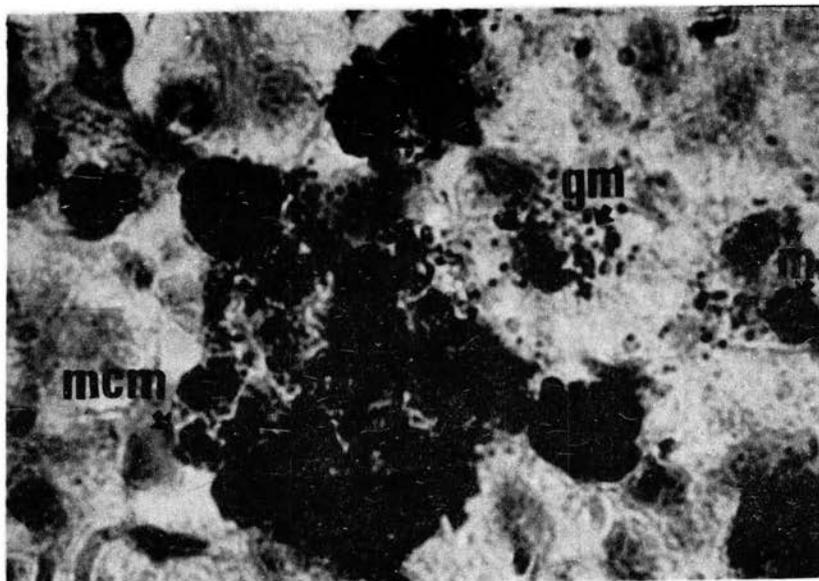


Fig. 7 Corte de hígado testigo hembra, donde se observan los gránulos de melanina (gm) dispersos dentro de melanóforos (m), así como la membrana celular de un melanóforo (mcm), a 630x.

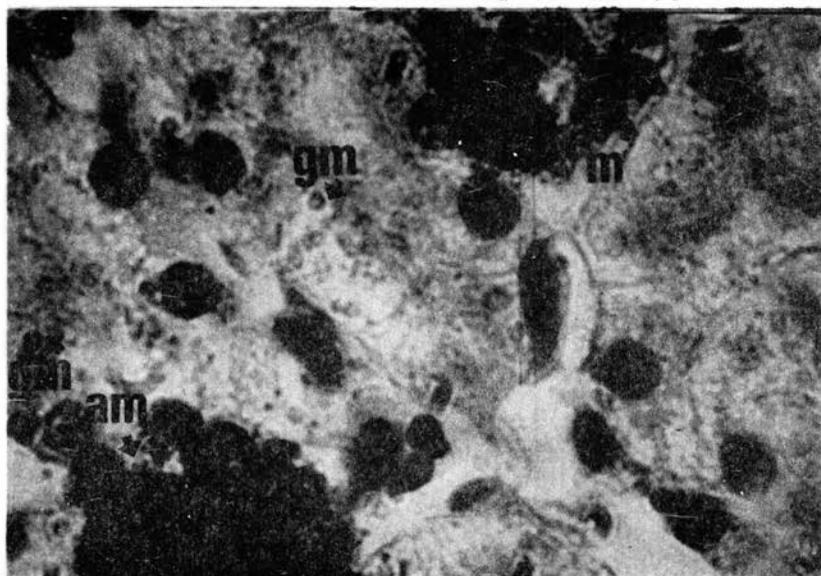


Fig. 8 Corte de hígado experimental de una rana hembra con los gránulos melánicos (gm) agregados dentro de las células que los contienen, 630x.

Por último se muestran en la figura 9 y 10 los cortes representativos de un hígado testigo y experimental inyectado con 0.05 mg/ml de melatonina respectivamente, de ranas macho en las que no se observan cambios en la distribución y área ocupada por el pigmento melanina; en estas fotografías también se distinguen acúmulos de melanóforos y melanóforos solitarios, así como el hecho de que no se observa algún lugar específico dentro de la estructura del tejido que sea siempre ocupada por células pigmentadas, si no que la distribución es mas bien al azar; también notamos claramente a este aumento (100x) recordando que éste fue el que se utilizó para el conteo con la rejilla ocular, los núcleos de los hepátocitos en color rojo, su citoplasma en tono rosa y los sinusoides, los cuales no se vieron afectados por el tratamiento hormonal al igual que en las hembras.

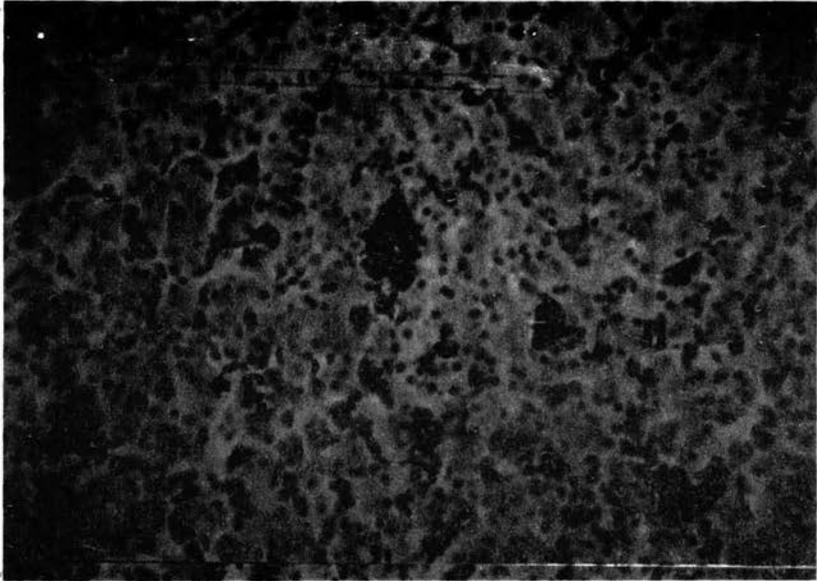


Fig. 9 Corte de *6* de hígado de rana testigo macho, teñido con rojo nuclear rápido, se observan el núcleo (n), citoplasma (c) y sinusoides de los hepatocitos. (s).

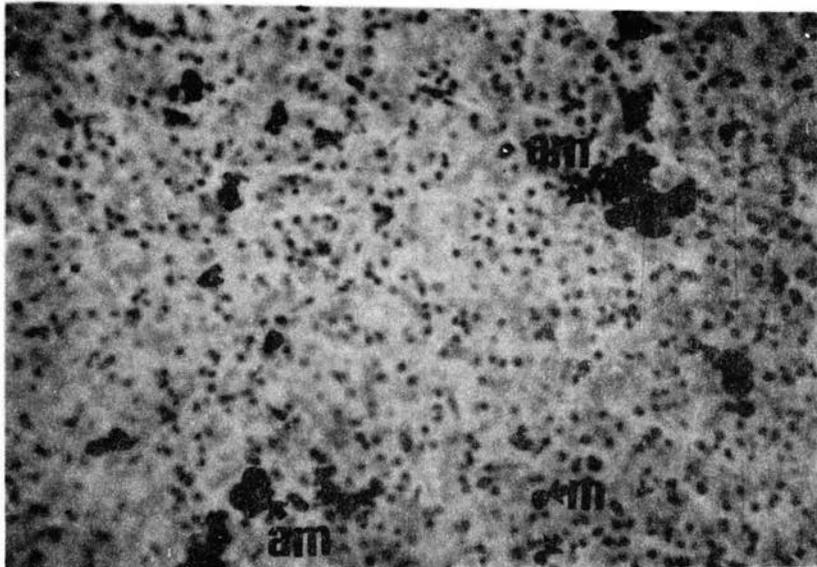


Fig. 10 Corte de hígado experimental de rana macho, tratado con 0.05 mg/ml de melatonina, se observan acúmulos de melanóforos (am) y algunos melanóforos vistos a 100x, misma tinción.

DISCUSION.-

Los resultados del presente estudio concuerdan con los obtenidos en piel y algunos órganos por Lerner en 1958 y Bagnara en 1963, respectivamente, al agregar melatonina en el agua del acuario de los anfibios, y por Kay Diesert en 1971 al inyectarles la misma hormona; no obstante encontramos que de las tres dosis inyectadas intraperitonealmente de melatonina (0.5, 1.0 y 1.5 mg/ml), que se calcularon a partir de la dosis utilizada en trabajos de Bagnara (0.01 mg/ml) la cual fue aumentada cien veces más, sólo la de 0.5 mg/ml tuvo el efecto esperado. En las otras dos dosis no se observó concentración del pigmento melanina, pudiendo encontrarse la explicación en los siguientes estudios: se tienen evidencias de que inyecciones intraperitoneales de melatonina disminuyen significativamente la temperatura media seleccionada para la tortuga Terrapene carolina triunguis (Erskine, 1981), que como sabemos es un poiquiloterma al igual que los anfibios; por otra parte Noble en 1927, dice que las temperaturas bajas provocan la expansión de los melanóforos en piel y vasos sanguíneos de anfibios, de ésta manera estos dos fenómenos pudieron haberse conjugado y ocultar la respuesta contractora de melatonina a estas dosis en el hígado, y aunque también se reporta que las bajas tempera-

turas resultan en una disminución del área ocupada - por el pigmento en algunas vísceras de R. montezumae, no es el caso del hígado (Cuspinera et al, 1982).

De este tipo de trabajos, en los que se integran la temperatura, la melatonina y los pigmentos de melanina, es importante seguir estudiando ya que parece - ser que el órgano pineal y la melatonina están involucradas en el funcionamiento de un reloj endógeno, controlando la termorregulación conductual y fisiológica en anfibios (Hutchinson y Erskine, 1979), además de - que la regulación hormonal de los pigmentos pueda tener otras funciones importantes en estos animales, al encontrarse significativos descensos en la cantidad de pigmento visceral, en estudios que examinan el papel de la melanina en la termorregulación de anfibios (Cuspinera et al, 1982).

Se pensó como otra posibilidad para explicar la ausencia de respuesta contractora de melatonina con las dosis de 1.0 y 1.5 mg/ml, el que ésta haya sido rápidamente metabolizada, pero desde que se encontró una respuesta positiva para la concentración más pequeña al concentrarse el pigmento en el hígado la posibilidad se descarta, esto además es apoyado por lo dicho anteriormente, es decir, que si consideramos que los efectos de baja temperatura y expansión del pigmento se

sucedieron siguiendo las inyecciones intraperitoneales de melatonina, el pensar en la inactivación de la hormona en corto tiempo supondría la ausencia de los efectos de baja temperatura y expansión. Esto también de alguna manera se ve apoyado por trabajos de Kopin et al, 1961; Uzi Weinberg, 1981 y Beck en el mismo año, en los que inyectando intraperitonealmente melatonina marcada en ratas, se encontró aún actividad de melatonina en el hígado a los 30 minutos de haberse inyectado.

Por otra parte al encontrar una disminución del área ocupada por el pigmento melanina debida a la melatonina, sólo en hígados de ranas hembras a la dosis más baja, nos habla quizás de una mayor sensibilidad por parte de las hembras a ésta hormona, si tomamos en cuenta que existen diferencias en el patrón de secreción hormonal entre los sexos, fenómeno que no es exclusivo de los anfibios ya que tales diferencias se observan ampliamente en el reino animal, así tenemos que la melatonina bloquea la ovulación y liberación de LH en ratas (Clemens et al, 1980); además del hecho comprobado de la participación de la melatonina en la regulación de la función gonadal (Wrtman, 1965), sin que por esto se deseche la posibilidad de que haya concentración del pigmento melanina en hígados de R. monte

zumae machos, a otras concentraciones de la hormona.

De los resultados globales, incluyendo las medias del área ocupada por el pigmento en hígados de hembras y machos, se observa en el primer ensayo para la dosis efecto (0.5 mg/ml) ver gráfica 1 y 2, que la diferencia entre las medias testigo y experimental es bien notoria, lo que no sucede al repetir el experimento y aumentar la cantidad de individuos experimentales tanto hembras como machos. Esta desigualdad se debió a que los datos de los machos, en los cuales como ya sabemos los pigmentos de sus hígados no respondieron a ninguna de las dosis probadas, ocultaron la disminución en el área ocupada por melanina en hembras al graficarse el valor promedio experimental, obtenido de los datos más bajos (los correspondientes a las hembras), y los más altos (los de machos). hecho que no se encontró en el primer ensayo ya que la cantidad de hembras en éste era más alta que la de machos. En el caso del segundo ensayo la cantidad de individuos de cada sexo fue igual (ver tabla 3), posteriormente todas estas observaciones vinieron a ser reforzadas por el análisis de varianza y la prueba de Scheffe hechos a los grupos de datos separados por sexo (ver tabla 2).

Finalmente es importante recordar, como ya se -

mencionó en los antecedentes, que los estudios sobre el cambio de color fisiológico en anfibios a diferentes medios ambientes, cada vez aportan más evidencias que favorecen la participación de solo una hormona en el fenómeno, la hormona estimulante de los melanocitos (MSH). Estudios que se pueden recopilar en los siguientes pasos más destacados:

- 1.- La pinealectomía no tiene efecto en la respuesta de cambio de color a medios ambientes claros.
(Charlton, 1966; Bogenschultz, 1967 y Saxena, - 1981)
- 2.- La inyección de extractos pineales, y más recientemente de melatonina, en animales oscuros ya sea por haber sido tratados con MSH ó por que estén en medios oscuros, produce blanqueamiento.
(Diesert, 1971 y Kastin, 1966)
- 3.- El incremento en las funciones gonadales, debida a la exposición de muchas especies de vertebrados, entre ellas los anfibios, a la iluminación continua resulta en una disminución en la síntesis de melatonina dentro de la pineal.
(Owens, 1980; Rollag, 1980 y Delgado, 1983)

CONCLUSIONES.-

Se encontró que la concentración de 0.5 mg de la hormona melatonina, tiene el efecto fisiológico de agregación del pigmento a corto plazo que se conoce en melanóforos de piel de anfibios, en el hígado de R. montezumae hembra. Se acepta la hipótesis propuesta.

El comportamiento de los gránulos de melanina en los melanóforos de piel, es igual al que se observó en las células que contienen melanina en el hígado de la especie estudiada, bajo las condiciones experimentales consideradas.

Cuantificando la variación del área ocupada por la melanina debida a la melatonina, en hígados de ranas hembras, se calculó una disminución del 30%.

No se detectó ninguna alteración morfológica en la víscera con el tratamiento hormonal para ninguno de los sexos de la rana.

Las dosis que se probaron de melatonina, no tuvieron efecto en los pigmentos del hígado de las ranas macho de R. montezumae.

TABLA 1. Resultados de las estadísticas básicas de los valores poblacionales obtenidos en # de cuadros ocupados por la melanina, a diferentes dosis de melatonina.

dosis mg/ml	número de orgs.	media aritmeti ca	varianza	desv. standard	error standard
D A T O S T E S T I G O					
0.5	5	8.35470	5.71197	2.14858	0.50043
1.0	5	10.03311	7.14387	2.73570	0.58325
1.5	5	11.31692	5.57189	2.40723	0.47210
D A T O S E X P E R I M E N T A L E S					
0.5	5	6.13826	2.45080	1.57914	0.33284
1.0	5	9.99296	1.36891	1.20393	0.28377
1.5	5	10.88359	2.41439	1.58460	0.31077

TABLA 2. Resultados de las pruebas de t Student, en la que se comparan los valores testigos contra los experimentales, para cada una de las dosis de melatonina revisadas.

dosis de melatonina empleada	valor de t analítico	valor de t tablas t.95	regla de decisión	hipótesis alternativa
0.5	2.45323	1.8331	$H_0: \bar{x}_t \neq \bar{x}_e$	$H_a: \bar{x}_t > \bar{x}_e$
1.0	0.4352	1.8331	$H_0: \bar{x}_t = \bar{x}_e$	
1.5	0.48489	1.8331	$H_0: \bar{x}_t = \bar{x}_e$	

TABLA 3. Resultados de las estadísticas básicas del área ocupada por el pigmento, en # de cuadros de la rejilla ocular, en hígados de ranas testigos inyectadas con un mililitro de ringer.

D A T O S T E S T I G O					
org.	sexo	media aritmetica	varianza	desv. standard	error standard
1	♀	7.59367	4.78149	2.17912	0.39785
2	♂	6.02417	3.19023	1.74695	0.32595
3	♀	8.77462	4.00913	1.99482	0.39122
4	♂	8.19672	2.63827	1.55463	0.50353
5	♀	11.18431	13.94074	3.26737	0.88359
6	♂	9.51636	3.23556	1.78990	0.52831
7	♂	8.08075	2.31677	1.51014	0.47664
8	♂	5.66752	1.80034	1.32475	0.24187
9	♀	6.77625	3.41549	1.87810	0.36833
10	♀	8.27369	2.47715	1.53220	0.48579
Σ		8.00881	2.68507	1.63862	1.295

TABLA 4. Resultados de las estadísticas básicas del área ocupada por el pigmento, en # de cuadros de la rejilla ocular, en hígados de ranas experimentales inyectadas con 0.5 mg/ml de melatonina.

D A T O S E X P E R I M E N T A L E S					
org.	sexo	media aritmetica	varianza	desv. standard	error standard
1	♀	3.31804	1.02271	0.99129	0.24042
2	♀	5.11552	1.73529	1.29731	0.25442
3	♀	3.88992	1.36729	1.63334	0.23409
4	♂	8.74666	2.68227	1.60145	0.49476
5	♂	9.62116	5.44645	2.37233	0.44053
6	♀	4.49289	1.43582	1.15859	0.35790
7	♀	2.62401	0.52159	0.72116	0.23992
8	♂	13.09333	7.79024	2.75640	0.83561
9	♂	8.58977	1.73972	1.34153	0.24493
10	♂	11.21732	13.40778	3.67124	0.67027
\bar{x}		7.07086	11.95285	3.64430	1.15243

TABLA 5. Grupos de medias, tomando en cuenta el sero de las ranas, testigo y experimentales, éstas últimas inyectadas con 0.5 ng/ml de melatonina

grupo	sezo	# de orgs.	Valores de c/grupo					media total
1	♀ testigo	5	8.59367	8.77462	11.18431	6.77625	8.35	8.536
2	♀ testigo	5	6.02417	8.19672	9.51636	8.08075	5.66752	7.49711
3	♀ exp.	5	3.31804	5.11552	3.88992	4.49289	2.62401	3.88808
4	♂ exp.	5	8.74666	9.62116	13.09333	8.58876	11.21732	10.2534

TABLA 6. *A n á l i s i s d e V a r i a n z a*

<i>f u e n t e d e v a r i a c i ó n</i>	<i>s u m a d e c u a d r a d o s</i>	<i>g r a d o s d e l i b e r t a d</i>	<i>c u a d r a d o m e d i o</i>	<i>F . R .</i>
<i>Entre</i>	108.464	3	36.155	14.555
<i>Dentro</i>	39.745	16	2.484	
<i>Total</i>	148.208	19	7.800	

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

Se rechaza al nivel de 0.05

Promedio de grupos:

- 1 8.536
- 2 7.497
- 3 3.888
- 4 10.253

14.555 > 3.24

razón de varianza > *valor de F*

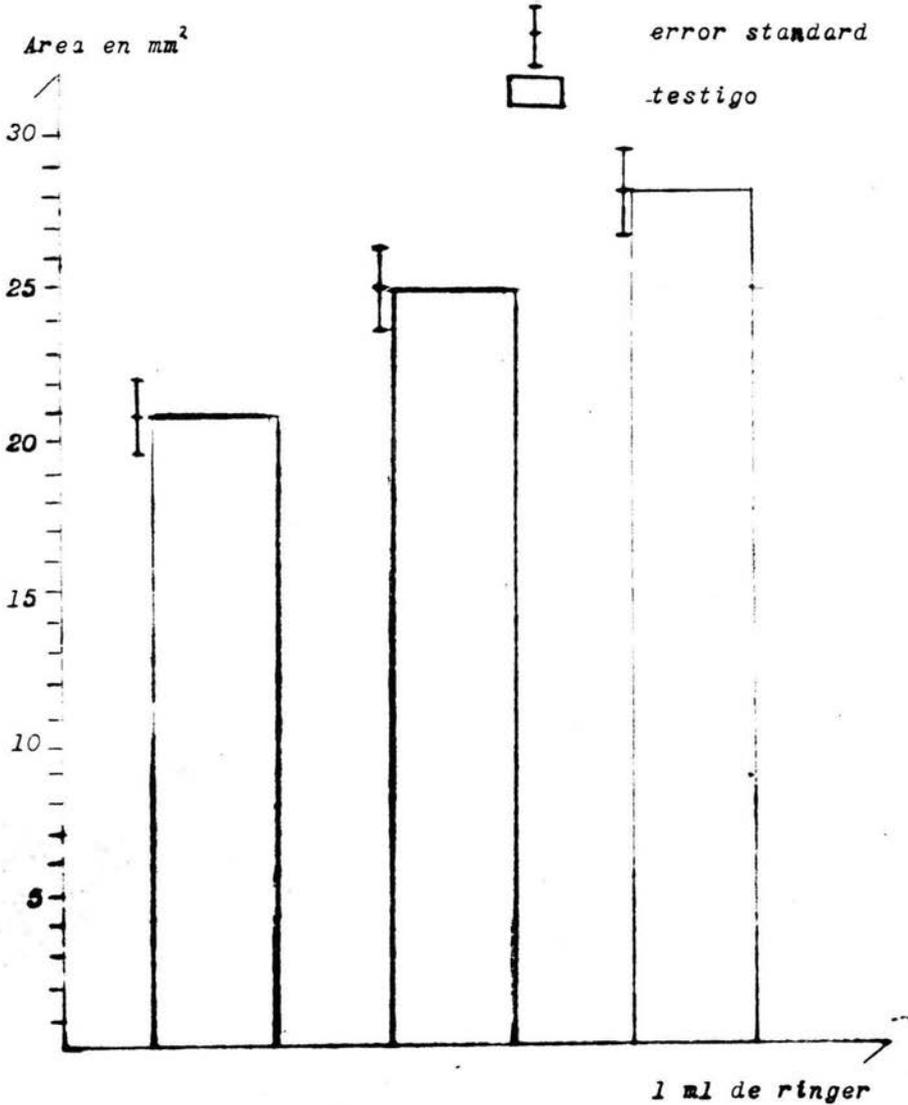
∴ se acepta $H_a: \mu_i \neq \mu_j$

TABLA 7.

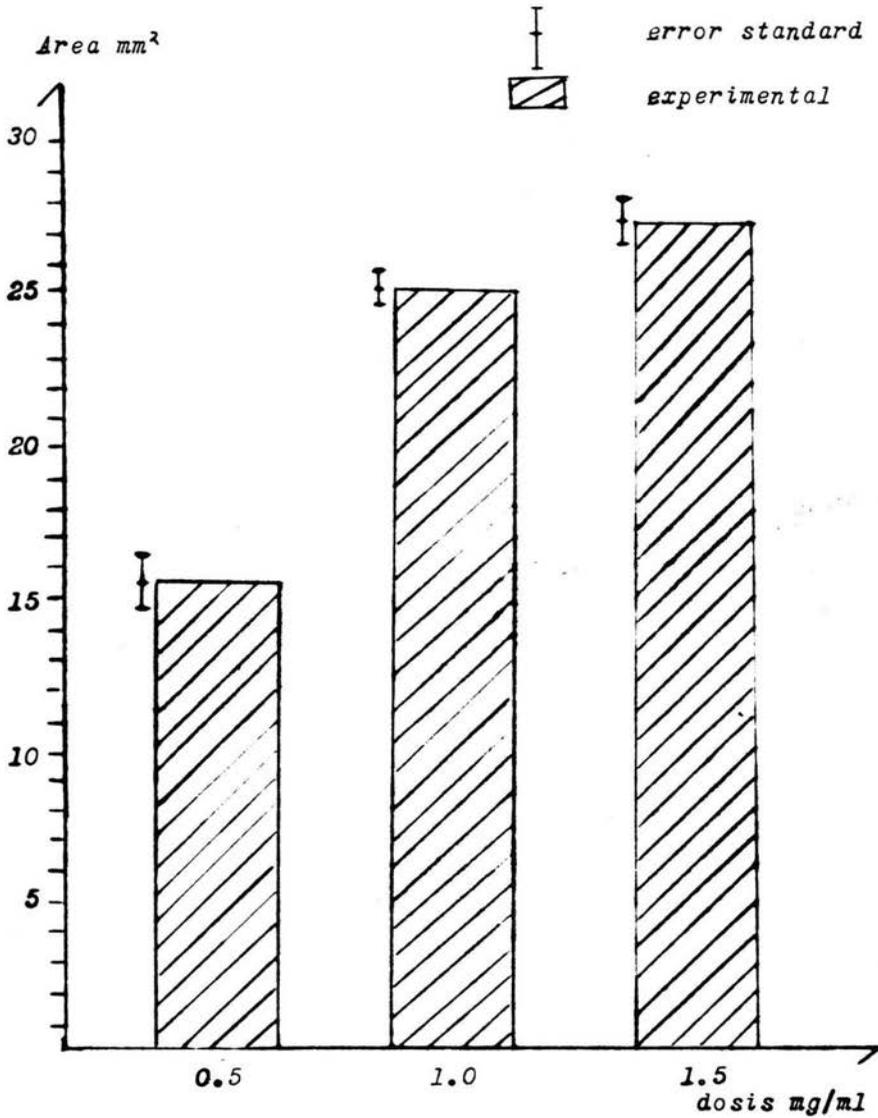
P R U E B A D E S C H E F F E
para comparaciones múltiples y contrastes

comparación $M(I) \text{ \& } M(M)$	diferencia de medias	error standard	estadística de Prueba	valor tablas	conclusión
4 & 3	6.365	0.9968	6.3858	3.1108	se rechaza
1 & 2	2.756	0.9968	2.7652	3.1108	no se rechaza
1 & 3	4.648	0.9968	4.6626	3.1108	se rechaza
2 & 3	3.609	0.9968	3.6206	3.1108	se rechaza

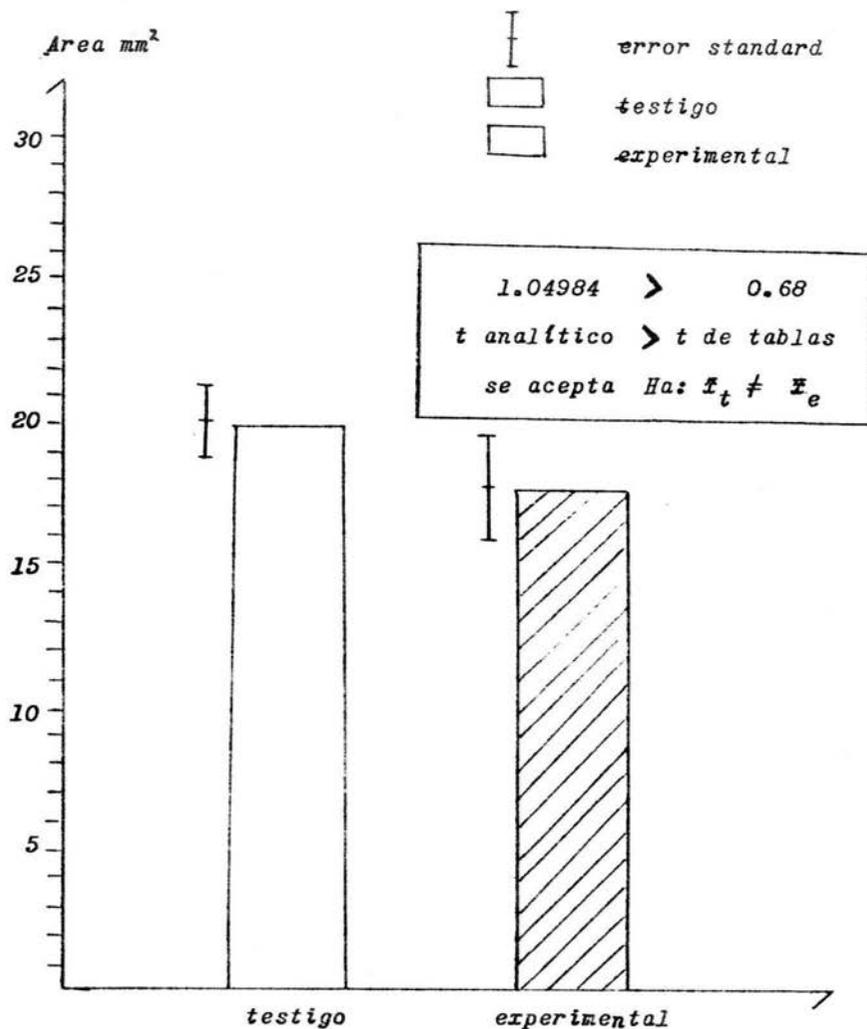
GRAFICA 1. Medias en mm^2 de las áreas ocupadas por los pigmentos de los hígados de ranas testigo inyectadas sólo con un ml de ringer.



GRAFICA 2. Medias en mm^2 de las áreas ocupadas por los pigmentos de los hígados de las ranas experimentales, inyectadas con melatonina.



GRAFICA 3. Medias poblacionales de las áreas en mm^2 , ocupadas por los pigmentos en hígados de ranas testigo y experimentales, para 0.5 mg/ml de melatonina.



BIBLIOGRAFIA.-

Aire, T. A. y Steinback, J.: Pigmentation of reproductive organs in the nigerian fowl. Poult. Sci. 52 :2356 - 2357 (1973)

Altschule, M. D.; D. W. y Hegedus, Z. L.: The importance of studying visceral melanins. Clin. Pharmacol. Ther. 19 (2): 124-134 (1976)

Azcoaga, J. E.: Melanina intraneural en el Sistema Nervioso del renacuajo. Arch. Histol. Buenos Aires, 7 :323-325 (1960)

Bagnara, J. T.: Pineal regulation of the body lightening reaction in amphibian larvae. Science 132 :1481-1488 (1960)

Bagnara, J. T.: The pineal and the body lightening reaction of larval amphibians. Gen. Comp. Endocrinol. 3 :86-100 (1963)

Bagnara, J. T. y Hadley, M. E.: Endocrinology of the amphibian pineal. Amer. Zoologist. 10 :201-216 (1970)

Baird, J.: Rana montezumae. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia. 7 :61 (1854)

Barrington, E. J. W.: *Endocrinología general y comparada*, 2a. Ed., Hermann Blume España, :233-247 (1977)

Beanll, D.; Shapiro, H. A. y Zwarenstein, H.: The melanophore contracting principle of the pineal. Chem. Ind. 56 :190 (1937)

Beck, O. y Jonsson, G.: In vivo formation of 5-methoxytryptamine from melatonin in rat. J. Neurochem. 36(6) :2013-2018 (1981)

Bogenshültz, II: *Über den farbwechsel von Rana esculenta nach epiphysektomie*. *Experientia* 23 :967-968 (1967)

Borghesan, E.: Nature of a pigmented substance in the labyrinth. *Acta Otolaring* 19 :288-293 (1957)

Charlton, H. M.: The pineal gland and colour change in Xenopus laevis. *Daudin. Gen. Comp. Endocrinol.* 7 :384-397 (1966)

Cicero, R.; Scalia, M.; Sinatra, F. y Zappala, C.: *Variazioni del contenuto di melanine nelle celu-*

le di kupffer di Rana esculenta L., indotte da somministrazione parenterale di emme. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.* 53 : 764-769 (1977)

Clemens, J. A.; Flaugh, M. E.; Parli, J. y Sawyer, B. D.: Inhibition of luteinizing hormone release and ovulation by 6-chloro and 6-fluoromelatonin. *Neuroendocrinology* 30 :83-87 (1980)

Cuspinera, M. E.: De Lara, G. S. y Rodríguez, Z. B.: Observación de las reacciones histoquímicas y distribución de los pigmentos y lipofuscina en algunas vísceras de las ranas Montezumae. *Archivos de Anatomía y Antrología de Río de Janeiro, Brasil* (1981a)

Cuspinera, M. E.: De Lara, G. S.; Rodríguez, Z. B. y Esquivel, M. P.: Características morfológicas de los pigmentos de melanina en las vísceras de las Rana montezumae. *Arch. Mexicanos de Anat.* 18(1) :19-28 (1981b)

Cuspinera, M. E.: de Lara, G. S. y Rodríguez, Z. B.: Disminución del pigmento melanina en la superficie de algunas vísceras de la Rana montezumae a 5 C. *Arch. Mexicanos de Anat.* 19(1) :11-20 (1982)

Dawson, A. B.: The occurrence of regional distribution of perivascular melanophores within the optic lobes of the frog Rana pipiens. Anat. Rec. 117 :37 (1953)

Delgado, M. J.: Gutierrez, P. y Bidate, M. A.: --- Effects of daily melatonin injections on the photoperiodic gonadal response of the female frog Rana ridibunda. Comp. Biochem. Physiol. 76(2) :238-392 (1983)

Diesert, D. K.: Landgrebe, F. W. y Mitchell, G. M.: Melanophore stimulating hormone-melatonin antagonism in relation to colour change in Xenopus laevis J. Endocr. 49 :573-580 (1971)

Erskine, D. J. y Hutchinson, V. H.: Melatonin and behavioral thermoregulation in the turtle, Terrapene carolina triunguis. Physiology and Behavior 26 :991-994 (1981)

Fitzpatrick, T. B.: The evolution of concepts of melanin biology. En: Biology of skin, editado por W. Montagna. Pergamon Press, London 1966

Hadley, M. E. Y Quevedo, M. C.: The role of epidermal melanocytes in adaptative, color changes in am-

phibians. En: *Biology of skin*, editado por W. Montagna. Pergamon Press, London :337-358 (1966)

Hadley, M. E. y Bagnara, J. T.: *Integrated nature of chlorotophore reponses in vitro frog skin bioassay*. *Endocrinology, Springfield* 84 :69-82 (1969)

Hadley, M. C. y Bagnara, J. T.: *Regulation of release and mechanism of reaction of MSH*. *Amer. Zool.* 15 :81-104 (1975)

Hebart, M.: *Smith y Taylor: Herpetology of México annotated checklists and keys to the amphibians and reptiles*, Ashton Marynland :96-99 (1966)

Hutchinson, V. H; Black, J. J. y Erskine, D.: *Melatonin and chlorpromazine: thermal selection in the in the mudpuppy, Necturus maculosus*. *Life Sci.* 25 :527-530 (1979)

Kastin, A. J. y Schally, A. V.: *In vivo assay for melanocyte lightening substances*. *Experientia* 22 :389 (1966)

Kastin, A. J.; Viosca, S.; Nair, R. M. G.; Schally, A. V. y Miller, M. C.: *Interactions between pineal hypotalamo and pituitary involving melatonin, MSH release inhibiting factor and MSH*. *Endocrinology*,

Springfield 91 :1323-1328 (1972)

Kopin, I. J., Pare, C. M. B.; Axelrod, J. y Weissbach, H.; The fate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem.* 236 :3072 (1961)

Lerner, A. B.: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes, *J. Am. Chem. Soc.* 80 :2587 (1958)

Lerner, A. B.; D. M.; D. Ph. y Case, J. D.: Pigmented cell regulatory factors. *J. Invest. Dermatol.* 32 :211-221 (1959)

Lerner, A. B.; Case, J. D. y Takahashi, Y.: Isolation of melatonin and 5-metoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal gland. *J. Biol. Chem.* 235(7) :1992-1997 (1960)

Lerner, A. B. y Case, J. D.: Melatonin, *Fedn Proc. Fedn. Am. Soc. Exp. Biol.* 19 :590-592 (1960a)

Lerner, A. B.: Hormones and skin color. *Sci. Amer.* 205 :98-108 (1961)

Mc Cord, C. P. y Allen, F. P.: Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* 23 :207-224 (1917)

- Muller, H. K.: *The frog as an experimental animal*
En: *Frog Neurobiology A. Handbark*, E. Linas and
W. Precht Springer, Verlag Berlin :1023-1034 (1976)
- Niu, N. C.: *Further studies on the origin of amphibian pigment cells.* *J. of Experimental Zool.* 125 :100-220 (1954)
- Noble, C.: *The Biology of the Amphibia.* New York, Dover Publ. 1 :317 (1921)
- Noda, K.: *Ultrastructural study on hepatic melanin in Xenopus laevis.* *Cell Res.* 185 :331-337 (1977)
- Novalés, R. R. y Novalés, B. J.: *Analysis y antagonisms between pineal melatonin and other agents -- which act on the amphibian melanophore.* *Prog. Brain Res.* 10 :507-519 (1965)
- Owens, D. W.; Gern, E. A. y Ralph, Ch. L.: *Melatonin in the blood and cerebrospinal fluid of the green sea turtle (Chelonia mydas).* *Gen. Comp. Endocrinol.* 40 :180-187 (1980)
- Pearse, E. A.: *Histochemistry theoretical and applied* 2a. Ed., Little Brown Boston, 919 pp. (1961)

Prota, G. y D. Ph.: Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* 75 (1) :122-127 (1980)

Raper, H. S.: The aerobic oxidases. *Physiol. Rev.* 3 :245-282 (1928)

Robin, C. P.: *Anatomie et physiologie cellulaire*, Bailliers et Fils, Paris (1873)

Rollag, M. D.; Panke, E. S.; Trakulrungrasi, W.; Trakulrungrasi, Ch. y Keiter, R. J.: Quantification of daily melatonin synthesis in the hamster pineal. *Endocrinology* 106(1) :231-236 (1980)

Rugh,,: The origin of amphibian pigment. *En: Experimental Embriology* :263-354 (1948)

Rust, C. C. y Meyer R. K.: Hair color, molt and testis size in male, shorttailed measel treated with melatonin. *Science, Washington* 165 :921-922 (1962)

Sarena, P. K.; Mastogi, R. K. y Chieffi, G.: Role of eyes and pineal gland in melanophore response in the green frog, *Rana esculenta*. *Anat. Anz. Jena.* 149 :127-132 (1981)

Seldnrijk, R.; Hup, D. R. W.; Graan, R. N. E. y van der Veerdonk, F. C. G.: Aspecto morfológicos y fisiológicos de melanóforos en cultivo primario de renacuajos de Xenopus laevis. *Cell and Tissue Research* 198 :397-409 (1979)

Seldenrijk, R.: Hugsman, K. G. H.; Henssen, A. M. A y van der Veerdonk: Estudio comparativo y ultraestructural en melanóforos de tipo silvestre y mutan-
albinos periodicos de Xenopus laevis. *Cell Tissue Research* 222 :1-9 (1982)

Simmonet, H.; Thieblot, L.; Melik, T. y Sigal, V. Nouvelles preuves de l'endocrinie epiphysaire. *Acta Endocr.* 17 :402-413 (1954)

Simminet, H. Thieblot, L y Sāgal, V.: Interrélation épiphysohypophysaire et effect expanso melanophorique. *Ann. Endocr.* 13 :340-344 (1952)

Van Woert, M. H.; Prasad, K. N. y Borg, D. .C.: Spectroscopic studies of substantia nigra pigment in human subjects. *J. Neurochem.* 14 :707-716 (1967)

Wayne, W. D.: *Bioestadística*, Limusa México :193-219 (1983)

Weinberg, V.: Evidence that melatonin retention by the neonatal rat is greatly increased as compared to the adult: a novel biochemical mechanism. *Brain Research* 217 :221-224 (1981)

Wolff, D.: Melanin in the inner ear. *Arch. of Otol.* 18 :195-211 (1931)

Wrtman, R. J. y Azerold, J.: The pineal gland. *Sci. Amer.* 213 (1) :50-60 (1965)

Young,.: *The life of vertebrates.* Clarendon Press, Oxford (1962)