



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas**

ÁREA TEMÁTICA EN ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN

TESIS

**Descripción histológica y funcional del complejo pineal del pez  
vivíparo *Skiffia multipunctata* (Pellegrin, 1901)**

**QUE PRESENTA**

**BIOL. ZAIRA MARÍA JERONIMO GRANADOS**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DIRECTORA DE TESIS

DRA. REBECA ANELI RUEDA JASSO

CODIRECTOR

DR. CARLOS CRISTIAN MARTÍNEZ CHÁVEZ

MORELIA MICHOACÁN, NOVIEMBRE 2015

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN.....   | 1  |
| ABSTRACT.....  | 2  |
| I. INTRODUCCIÓN.....   | 3  |
| II. ANTECEDENTES.....  | 6  |
| 2.1 Sensibilidad a la luz.....   | 6  |
| 2.2 Fuentes de producción de melatonina.....   | 6  |
| 2.2.1 Glándula pineal.....   | 7  |
| 2.2.2 Percepción no visual en vertebrados mayores.....   | 9  |
| 2.3 Ritmos biológicos.....   | 11 |
| 2.4 Peces vivíparos.....   | 12 |
| 2.4.1 <i>Skiffia multipunctata</i> .....   | 13 |
| III. JUSTIFICACIÓN.....  | 15 |
| IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....  | 16 |
| 4.1 Pregunta general.....  | 16 |
| 4.2 Preguntas específicas.....   | 16 |
| V. HIPÓTESIS.....  | 16 |
| VI. OBJETIVOS.....   | 16 |
| VII. RESULTADOS.....   | 17 |
| VII. CAPITULO 1. DESCRIPCIÓN ANATÓMICA HISTOLÓGICA DEL COMPLEJO PINEAL DEL PEZ VIVÍPARO <i>Skiffia multipunctata</i> ..... | 17 |
| 7.1 RESUMEN.....   | 17 |
| 7.2 INTRODUCCIÓN.....  | 17 |
| 7.3 MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 19 |
| 7.4 RESULTADOS.....  | 20 |
| 7.4.1 VESICULA PINEAL.....   | 20 |
| 7.4.2 TALLO PINEAL.....  | 21 |
| 7.4.3 El saco dorsal. Habénula.....  | 21 |

|  |    |
|--|----|
| 7.5 DISCUSIÓN.....   | 28 |
| VII. CAPITULO 2. REVISIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MELATONINA. ELECCIÓN DE UNA TÉCNICA ADECUADA PARA CUANTIFICAR MELATONINA EN CUERPOS COMPLETOS DE <i>Skiffia multipunctata</i> ..... | 30 |
| 7.1 RESUMEN.....   | 30 |
| 7.2 INTRODUCCION.....  | 30 |
| 7.2.1 Determinación de la melatonina en muestras biológicas.....   | 31 |
| 7.2.2 Inmunoensayo.....  | 33 |
| 7.2.3 Radioinmunoensayo.....   | 34 |
| 7.2.4 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).....   | 35 |
| 7.2.5 HPLC acoplado a la detección electroquímica y la fluorescencia.....  | 35 |
| 7.2.6 Espectrometría de masas.....   | 36 |
| 7.3 RESULTADOS.....  | 37 |
| 7.3.1 TÉCNICAS USADAS.....   | 37 |
| 7.4 DISCUSIÓN.....   | 39 |
| VII. CAPITULO 3. CUANTIFICACIÓN DE MELATONINA PRODUCIDA POR EL COMPLEJO PINEAL EN CUERPO ENTERO DE <i>Skiffia multipunctata</i> .....  | 40 |
| 7.1 RESUMEN.....   | 40 |
| 7.2 INTRODUCCIÓN.....  | 40 |
| 7.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 41 |
| 7.3.1 Obtención del material biológico.....  | 41 |
| 7.3.2 Diseño experimental.....   | 41 |
| 7.3.3 Condiciones experimentales.....  | 42 |
| 7.3.4 Adaptación de la técnica de Franke S. <i>et al.</i> 2013.....  | 43 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 7.4 RESULTADOS.....          | 45 |
| 7.5 DISCUSIÓN.....           | 46 |
| VIII. DISCUSIÓN GENERAL..... | 48 |
| IX. CONCLUSIÓN.....          | 50 |
| X. REFERENCIAS.....          | 51 |

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Biosíntesis de la melatonina y su relación luz vs oscuridad (Falcón 2007).....8
- Figura 2. Modelo sugerido de la evolución de la regulación de la síntesis de melatonina pineal por el eje circadiano en teleósteos el círculo azul representa la presencia de un sincronizador biológico (Tomado y modificado de Migaud et al. 2007).....11
- Figura 3. Descripción general de la región pineal de un pez teleósteo. La mayoría de los peces óseos poseen un órgano pineal y un órgano parapineal (Tomado y modificado de Peter Ekström y Hilmar Meissl 2010).....19
- Figura 4. Diferentes cortes de la vesícula pineal (PV) de *Skiffia multipunctata*. a) Sección transversal H & E bar 100µm; b) sección sagital H & E bar 100µm. c) Vesícula Pineal (PV) H & E bar de 50 micras.....22
- Figura 5. a) Sección sagital de la cabeza donde la vesícula pineal (PV) y tallo pineal (Pst) se observan cerca de la ventana pineal (Pw) H & E bar 50µm. b) Vista cercana de la vesícula pineal, donde se observan dos tipos de células (pinealocitos con núcleos redondos y citoplasma más púrpura además las células gliales, que tiene núcleos redondos y citoplasma pálido) H & E bar 20µm.....23
- Figura 6. a) Sección de la vesícula pineal (PV) de *S. multipunctata* adscrita al cartílago (C) por el tejido conectivo. En la ventana pineal el hueso es delgado, dos capas se solapan y se observa la piel con algunos cromatóforos dispersos H & E bar 100µm. B) Vesícula Pineal unida directamente al cartílago H & E barra de 50 micras.....24
- Figure 7. a) Sección transversal del tallo pineal (PSt), (accidentalmente fragmentado), se observa parte de la vesícula pineal (Pv). H & E barra de 50 micras. b) Ampliación del tallo pineal, en el cual se observa en el lumen (\*), las multicapas y el epitelio no-plegado de la vesícula H & E bar 20µm.....25
- Figura 8. Corte de la sección sagital del cerebro de *S. multipunctata*. En el área izquierda se encuentra el telencéfalo (Te) y el diencefalo en la parte inferior (De), seguido por el lóbulo óptico o mesencefalos (Ot). Entre ellos se ubica una habénula

(Hab) y hacia arriba del cerebro se identifica el tallo pineal (PSt); siguiendo hacia arriba del PSt se observa la vesícula pineal (PV) cerca de la ventana pineal (Pw) H & E bar 100µm.....26

Figura 9. Diferentes secciones del saco dorsal a) (100µm) b) (50µm) c) (100µm).El saco dorsal (DS) está entre los dos lóbulos ópticos unido a las habenulas (HAB). c) d) Células columnares en el saco dorsal (\*) (100µm).....27

Figura 10. Diseño experimental para la toma de muestras (organismos) durante 24 h.....43

Figura 11. Técnica ELISA en diferentes tiempos.....44

Figura 12. Curva estándar del Kit ELISA. Los puntos rojos representan los datos obtenidos de los estándares, los puntos azules muestran los controles (estándares y controles son dados por el Kit de melatonina IBL); y los datos en color verde son las muestras analizadas de *S. multipunctata*.....45

Figura 13. Melatonina producida por *S. multipunctata* de noche y de día. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas (ANDEVA y análisis de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ )).....46

Tabla 1. Métodos de extracción usados en *Skiffia multipunctata*.....38



## RESUMEN

Experimentos de laboratorio han permitido la adquisición de conocimientos básicos sobre la acción biológica de la luz en la producción de melatonina de los peces. Esta hormona es clave en la sincronización de la fisiología de vertebrados con el medio ambiente. Este trabajo presenta la primera aproximación una estrategia experimental para estudiar la acción biológica de la luz sobre un pez vivíparo *Skiffia multipunctata*.

En el primer capítulo, se describe la anatomía histológica del complejo pineal (CP), en la cual se identifica la vesícula pineal, el tallo pineal y saco dorsal para esta especie y se compara con el CP de peces teleósteos ovíparos.

En el segundo capítulo, se resume una revisión bibliográfica referente a la búsqueda de la técnica de extracción de melatonina de origen pineal en el cuerpo entero del pez. Lo anterior debido a que los organismos adultos de esta especie tienen una talla promedio de 7 cm, lo cual hace complicada la extracción de sangre. Además de a revisión de las diferentes técnicas se comentan las metodologías probadas y las adaptaciones realizadas para lograr obtener mediciones de melatonina en *S. multipunctata*.

A partir de esta nueva técnica, en el tercer capítulo, se determinaron los niveles basales de melatonina bajo la influencia de un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad. Los resultados mostraron diferencias significativas entre las muestras de día 24.1 pg/mL y 54.1 pg/mL noche asemejándose a lo observado en teleósteos ovíparos.

**Palabras Clave:** Peces vivíparos, melatonina, complejo pineal, fotoperíodo.

## **ABSTRACT**

Laboratory experiments have allowed the acquisition of basic knowledge about the biological action of light on fish, through the melatonin hormone. This hormone is the key of the synchronization of the vertebrates at the environment. This work presents (to our knowledge) an experimental strategy to study the biological action of light over a viviparous fish (*Skiffia multipunctata*). In the first chapter, the histological anatomy of the pineal complex (PC) is described, in which the pineal vesicle, the pineal stalk and the dorsal sac were identified and compared with PC of oviparous teleost.

In the second chapter, biological revision related to the searching of the pineal origin melatonin extraction technique in the entire fish body, is summarized. The above it's caused due to the adults of this specie have a size of 7 centimeters, which makes the blood extraction complicated. Besides the review of the different techniques, the revision of approved methodologies and the adaptation made in order to obtain melatonin measures is *S. multipunctata*.

From this new technique, the third chapter, the basal levels of melatonin under the influence of a photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of darkness were determined. Results showed significant differences between day samples 24.1 pg/ml and night 54.1 pg/ml this resembling to teleost oviparous.

**Keywords:** viviparous fishes, melatonin, pineal complex, photoperiod.

## **I. INTRODUCCION**

En general, todos los seres vivos se han adaptado a las variaciones diarias y estacionales de luz. La percepción de las horas de luz (L) y obscuridad (O) conocida como fotoperiodo, informa al organismo sobre el momento más adecuado para realizar diversos procesos fisiológicos (Bromage *et al.*, 2001). Por lo tanto, el fotoperiodo es la principal variable ambiental responsable de la sincronización del organismo con el medio ambiente. Adicionalmente, la temperatura, disponibilidad de alimento, precipitación y salinidad del agua también participan en dar forma a estos ritmos (Ekström y Meissl, 1997).

En los peces así como en otros seres vivos, los ciclos (también llamados ritmos o patrones) diarios pueden verse reflejados en diferentes aspectos fisiológicos tales como: a) la reproducción, b) la actividad locomotora, c) el consumo de oxígeno, d) la termorregulación y e) la ingesta de alimentos (Falcon *et al.*, 2007). Por otro lado, otro tipo de funciones fisiológicas pueden presentar ritmos estacionales, sobre todo en peces como los salmónidos que viven en climas templados y árticos. Dichos patrones estacionales pueden verse reflejados en aspectos como la migración, el crecimiento y la reproducción (Paul *et al.*, 2008).

En algunos organismos, los ritmos diarios y anuales son sólo la respuesta al fotoperiodo y la temperatura, pero en otros organismos estos ritmos son controlados por un reloj interno y se ejecutan en un periodo de 24 h (ritmos circadianos) o a lo largo de un año (ritmos circanual) (Bradshaw y Holzapfel, 2007).

Ambos ciclos se perciben por todos los componentes del organismo capaces de recibir la información fótica del ambiente (duración, intensidad, etc.) y traducirla en una señal biológica. Por lo general, este proceso se inicia cuando la luz entra al organismo a través de fotoreceptores (no visuales) y ésta se transforma en una señal nerviosa y hormonal: la melatonina (ME) (Falcón *et al.*, 2007).

En vertebrados, la ME es la principal hormona que regula el ciclo circadiano, esta se produce en la glándula pineal durante periodos de oscuridad (Simonneaux y Ribelayga, 2003). El patrón diario de la secreción de melatonina presenta poca variación entre los vertebrados. Este se inicia con la captación de la luz a través de fotorreceptores no visuales de la retina y/o la glándula pineal y se libera en el torrente sanguíneo y líquido cefalorraquídeo. Los niveles de ME son altos por la noche y bajos durante el día (Falcón et al. 1994).

Entre los vertebrados la organización del sistema circadiano que controla el ritmo de producción de la melatonina ha evolucionado. En mamíferos, la información fótica es percibida a través de los ojos y se transfiere a través de un tracto retino-hipotalámico (RHT) al núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSH). Posteriormente, los relojes principales conectan las neuronas del NSH a la glándula pineal (Simonneaux y Ribelayga, 2003). En los teleósteos, los resultados de investigaciones recientes sugieren que la glándula pineal es sensible a la luz e independiente del NSH y de los ojos (retina). En algunas especies de peces la glándula pineal puede contener un oscilador endógeno que controla los ritmos de melatonina (Iigo et al. 2004).

En los peces vivíparos, como son los Goodeinos, se ha detectado que la amplitud del fotoperiodo modifica los procesos fisiológicos antes mencionados (Rueda-Jasso y Ayala-Bailón 2007, Pita-Zamudio 2011, Jeronimo-Granados 2012). No obstante, se desconoce la presencia y funcionamiento de la melatonina bajo condiciones normales (fotoperiodo 12 h luz y 12 h oscuridad), así como la presencia de ritmos endógenos. Dado que la melatonina es la hormona sincronizante principal, que influye directamente en las funciones fisiológicas de los organismos (crecimiento y reproducción) es esencial conocer los aspectos básicos de su estimulación y funcionamiento. En particular para peces vivíparos, donde no se cuenta con información al respecto. Por ello, el objetivo de este trabajo fue identificar la influencia del fotoperiodo en los ritmos circadianos de circulación de melatonina, utilizando como pez modelo al Goodeino *Skiffia multipunctata*. Para ello se describió

*Descripción histológica y funcional del complejo pineal del pez vivíparo Skiffia multipunctata  
(Pellegrin, 1901)*

---

la glándula pineal por medios histológicos, se determinó la técnica de medición de la melatonina y se cuantificaron los niveles basales de día y de noche.

## **II. ANTECEDENTES**

El fotoperiodo se define como el periodo de luz y oscuridad o la duración del día y la noche a lo largo de 24 h; esta constante ambiental ha influido directamente en la evolución de todos los organismos (Falcón et al. 2007). Los peces al igual que otros vertebrados regulan sus periodos reproductivos con base a los fotoperíodos, de esta manera los peces interpretan las señales fóticas y térmicas ambientales y sincronizan el periodo del año más apto para la reproducción. Esto tiene como objetivo que al nacer las crías se encuentren las condiciones óptimas para su supervivencia y crecimiento (Duston y Bromage 1991).

### **2.1 Sensibilidad a la luz**

Los peces perciben la luz, a través de la ventana pineal que se encuentra en el techo del cráneo (mediante la glándula/órgano pineal), por los ojos y posiblemente a través de otros fotorreceptores encontrados en cerebro. La intensidad y espectro de luz que alcanza al órgano pineal y cerebro dependen del grado de absorbancia a través de la piel y el cráneo, la cual varía de una especie a otra (Migaud et al. 2007). Una vez que la luz es captada por los fotorreceptores es traducida en una señal nerviosa y hormonal (ME), que es producida por la glándula pineal durante los periodos de oscuridad (Simonneaux y Ribelayga 2003). La ME sincroniza a los organismos con el ambiente y proporciona un orden temporal, por lo que regula directa e indirectamente los procesos como inhibición y estimulación de las hormonas de crecimiento y reproducción (Falcón et al. 2003).

### **2.2 Fuentes de producción de melatonina**

Las fuentes de producción de melatonina en el organismo varían: en la glándula pineal, la retina e intestino (Bubenik et al. 1997). No obstante, la glándula pineal es la principal fuente de melatonina en plasma circulante. En los tejidos de la retina de vertebrados no mamíferos, incluidos los peces existen mecanismos que impiden que la melatonina sea liberada en el torrente sanguíneo y que la melatonina

de otras fuentes pueda llegar a la retina. Esto debido a que la ME en retina tiene un rol antioxidante para la protección de esta (Gracia et al. 1991).

### **2.2.1 Glándula pineal**

El órgano/glándula pineal es un detector de luz que proporciona información sobre la intensidad, contenido espectral y duración a lo largo del día. Los fotorreceptores de la glándula pineal (GP) son análogos estructurales a los conos de la retina (Ekström y Meissl 1997). La luz captada por estos fotorreceptores induce una hiperpolarización que se traduce en la inhibición de un neurotransmisor excitatorio (aspartato glutamato). En el órgano pineal, el neurotransmisor excitatorio alcanza directamente el ganglio que envía sus axones al cerebro. Por lo tanto, las señales que se transmiten al cerebro reflejan principalmente la respuesta de las células fotorreceptoras (Falcón et al.2007).

La ME se sintetiza a partir de triptófano tomado por las células pineales, este a su vez es catalizado por el triptófano hidroxilasa (TpOH), el cual permite la síntesis de hidroxitriptófano que conduce a la formación de serotonina. Después de otros dos pasos enzimáticos, la serotonina es transformada en melatonina; en el primer paso la arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) cataliza la formación de N-acetylserotonina y en el segundo paso la hidroxindol-O metiltransferasa (HIOMT) convierte la N-acetylserotonina en melatonina (Falcón et al.2007) (Fig. 1). Durante el día, los niveles de melatonina en circulación son basales, mientras que los de serotonina son altos y en la noche este proceso ocurre a la inversa (Zachmann et al. 1992).

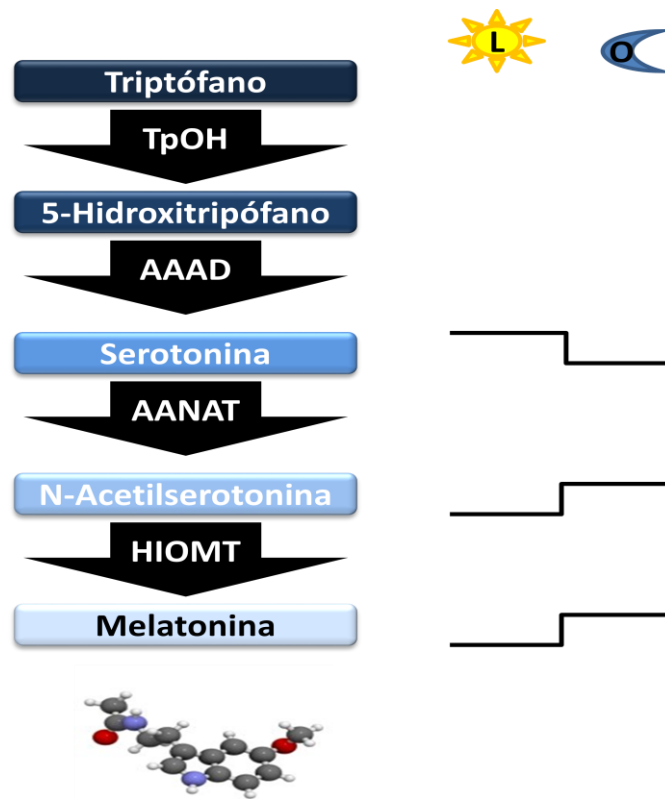


Figura 1. Biosíntesis de la melatonina y su relación luz vs oscuridad (Falcón 2007).

La producción nocturna de melatonina por la glándula pineal refleja un aumento de la actividad de la AANAT, mientras que la actividad de la HIOMT permanece constante durante todo el ciclo de luz y oscuridad, es decir a lo largo de 24 h (Falcón 1999). Los peces teleósteos poseen dos genes de AANAT (AANAT1 y AANAT2) probablemente como resultado de la duplicación del genoma (Falcón et al. 2007). EL gen AANAAT1 se expresa específicamente en la retina y cerebro, mientras que el gen AANAT2 únicamente se expresa en el órgano/glándula pineal (Coon et al. 2006). Esto tiene implicaciones en la regulación fótica de la producción de melatonina.

En los salmónidos, la luz inhibe la expresión del gen AANAT2 y por lo tanto, la liberación de la melatonina. En ausencia de luz, el gen AANAT2 se expresa y por lo tanto aumenta la producción de ME; generando un reflejo biológico fiel de la duración de la noche. En consecuencia un fotoperiodo de luz continua (LL) suprime la

producción de ME, mientras que en un fotoperiodo de oscuridad continua (OO) se ha relacionado con niveles altos de melatonina (Cahill 2002). No obstante, la mayoría de las especies de teleósteos no responden de la misma manera que los salmónidos, esto se debe a que la mayoría de estas especies controlan la liberación de melatonina por un sistema de reloj circadiano endógeno (reloj biológico), el cual se encuentra situado dentro de cada una de las células fotorreceptoras de la glándula pineal (Bollier et al. 1996).

Los peces responden de diferente manera a los cambios de luz, esto se debe a las adaptaciones específicas a su entorno, donde la luz varía en términos de cantidad (intensidad), calidad (composición espectral) y duración (fotoperiodo) (Boeuf y Le Bail 1999). La intensidad y la composición espectral son sensibles a las variaciones diarias, en particular bajo el agua, en función de la hora del día (amanecer y atardecer) y las condiciones climáticas o las fases de la luna. Estos parámetros probablemente afectan la amplitud de la señal de la melatonina a través de un control directo sobre la cantidad y actividad de la proteína AANAT2.

El estudio de la producción de melatonina y su relación con los factores internos ha recibido muy poca atención. Los datos disponibles se limitan a pocas especies (<15 de más de 25 mil especies de teleósteos) y las generalizaciones pueden ser erróneas.

### **2.2.2 Percepción no visual en vertebrados mayores**

En mamíferos la percepción de luz inicia en los ojos y se dirige a la glándula pineal, a través del reloj circadiano del NSQ (Klein et al. 1997). La liberación nocturna del neurotransmisor activa sinérgicamente los receptores adrenérgicos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  para estimular la secreción (nocturna) de melatonina. Esto se debe a que los pinealocitos de los mamíferos han perdido la fotosensibilidad directa y las propiedades del reloj circadiano y necesitan de la captación fótica de la retina (Falcón 2007).

Las aves presentan una situación intermedia, poseen tanto una relación directa como una indirecta de fotosensibilidad, donde la luz y la norepinefrina actúan

a través de receptores  $\alpha$  2-adrenérgico e inhiben la secreción de melatonina durante el día. La existencia de un control de norepinefrina en la secreción de melatonina ocurre en algunas especies de peces y podría reflejar la existencia de una evolución convergente de las rutas implicadas en el control de la producción de melatonina (Falcón. 2007).

Este último punto de vista cuenta con argumentos a favor, uno de ellos es la evidencia de por los menos tres mecanismos de percepción fótica no visual en peces, ya sea exclusivamente por la glándula pineal, por los ojos o ambos (Migaud et al. 2007) (Fig 2). En el primer caso, tanto para el salmón del Atlántico como para la trucha, la información lumínica entra de manera directa a la glándula pineal estimulado la producción de melatonina en ausencia de luz (Ceinos et al. 2008). El segundo caso se ve representado en la lubina, la cual también percibe la luz directamente a través de la pineal, pero ésta contiene un reloj biológico endógeno capaz de mantener los ritmos y niveles de melatonina en condiciones de obscuridad continua (donde no se ve inhibido por la luz). El tercer mecanismo fue recientemente descubierto en la tilapia del Nilo; en este, la luz no afecta directamente a la glándula pineal, sino que la información se capta a través de los ojos (Martínez-Chávez et al. 2008). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual la luz llega a la glándula pineal y donde se encuentra el reloj biológico que permite sobrellevar el tiempo en ausencia de variables fóticas. Este último mecanismo sugiere que la producción de ME por la glándula pineal depende de la retina como en el caso de los mamíferos (Migaud et al. 2007).

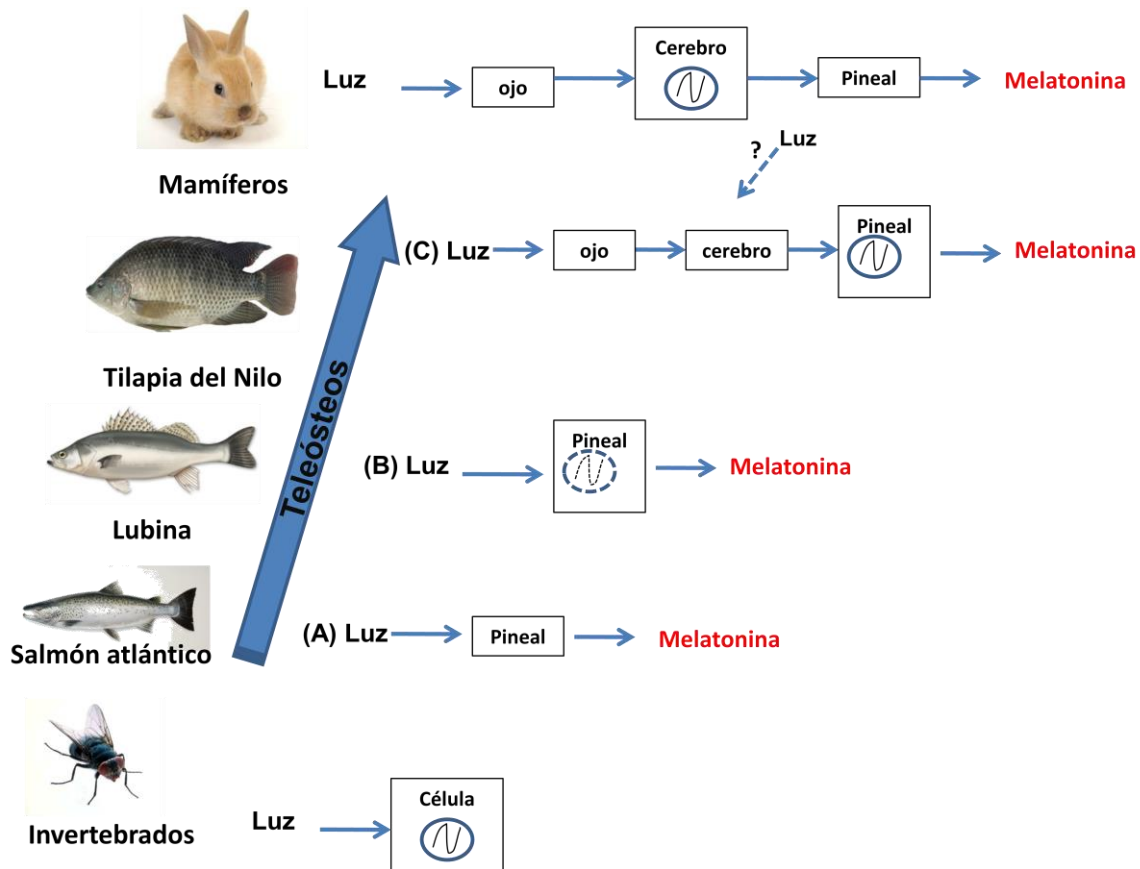


Figura 2. Modelo sugerido de la evolución de la regulación de la síntesis de melatonina pineal por el eje circadiano en teleosteos el círculo azul representa la presencia de un sincronizador biológico (Tomado y modificado de Migaud et al. 2007).

### 2.3 Ritmos biológicos

Los ritmos biológicos son la forma en que se sincronizan los peces con el medio ambiente. A pesar de su importancia, estos procesos prácticamente aún se desconocen. La fisiología de los peces se sincroniza con los cambios estacionales y las variaciones cíclicas del medio ambiente, ambos determinan el período más favorable para la reproducción y para generar la mayor supervivencia de la progenie. Por consiguiente, los peces tienen mecanismos de predicción, en los cuales utilizan el fotoperiodo como una señal ambiental confiable para anticipar y activar la gametogénesis mucho antes del desove (ritmo endógeno) (Bromage et al. 2001).

Para poder demostrar que un ciclo biológico es controlado por un ritmo biológico debe cumplir con una serie de criterios. Primero, este se debe mostrar al menos durante dos ciclos completos; asimismo debe ser sincronizado por un estímulo (zeitgeber) ambiental, siendo el fotoperiodo el “zeitgeber” por excelencia (Gwinner, 1986). La demostración de un reloj biológico es de suma importancia para entender completamente la fisiología de las especies y para elaborar estrategias que permitan hacer más eficiente el crecimiento y la reproducción ya sea alargando o acortando sus períodos reproductivos mediante la manipulación de la luz.

#### **2.4 Peces vivíparos**

El grupo de los peces teleósteos cuenta con de 27,977 especies descritas (Nelson,2006). Dentro de esta diversidad, solo 5% de los peces han desarrollado el vivíparismo (Rosas-Molinar y Burke, 2002). La reproducción vivípara incluye aspectos conductuales y fisiológicos como la realización de un cortejo, la copulación y la fertilización interna. Para ello, los Goodeinos cuentan con dimorfismo sexual, con machos que además de un patrón de coloración más marcado que el de las hembras, cuentan con una estructura modificada, llamada gonopodium, la cual está ubicada en la aleta anal. Esta modificación permite la formación de un símil de pene necesario para colocar en el poro genital de la hembra un paquete espermático y que pueda efectuarse la fertilización interna (Rosen y Gordon 1953). En las hembras de peces vivíparos, las modificaciones anatómicas se pueden distinguir del común de los vivíparos vertebrados, en los cuales la ovulación se realiza hacia el lumen ovárico, en lugar de ocurrir hacia el celoma, ya que la posición interna del epitelio germinal limita al lumen ovárico, por lo que la fertilización y el desarrollo embrionarios son internos (Rosen y Gordon 1953).

El ovario de los peces vivíparos difiere de otros vertebrados debido a que no solamente es el sitio de producción de huevos, sino también es el espacio donde ocurre la fertilización intrafolicular y la gestación, que se lleva de forma intraluminal (Uribe et al. 2004). Posterior a la liberación del embrión dentro del lumen ovárico se forma un símil de cordón umbilical llamado trofotenia que tiene la función de

intercambio entre madre-embrión. A través de éste se realiza el aporte de anticuerpos y nutrientes como vitaminas, carbohidratos y proteínas globulares por parte de la madre, así como la expulsión de desechos por parte del embrión (Lombardi, 1985).

Dentro de los peces que se han adaptado a una reproducción vivípara se encuentra la subfamilia Goodeinae. Este grupo de peces de origen neártico, se distribuye de manera natural exclusivamente en de la mesa central de México. Este carácter endémico da gran importancia al grupo, el cual está constituido por 19 géneros y 45 especies (Domínguez, 2008).

#### **2.4.1 *Skiffia multipunctata***

*S. multipunctata* es un miembro de la subfamilia Goodeidae. La distribución de la especie ocurre en zonas con un clima tropical en un intervalo de temperatura de 25 a 28°C (Domínguez, 2008; Jelks et al. 2008). *S. multipunctata* se encuentra listada como especie “en peligro crítico” en la NOM 059 SEMARNAT en tanto que Jelks et al. (2008) la consideraron como una especie “en peligro”.

Los individuos de la especie se caracterizan por presentar una coloración olivo-grisáceo con el vientre claro, a lo largo de los costados presentan manchas negras de diferentes tamaños y formas (de ahí el nombre en latín con muchos puntos). Estos varían según el organismo, por ejemplo en algunas ocasiones la aleta dorsal está bordeada por una coloración amarilla intensa y ocasionalmente la aleta anal está bordeada con tonos verdes. Las hembras poseen solamente algunas manchas en el cuerpo, de menor tamaño que los machos. La coloración del cuerpo es olivo-grisáceo en su mayor parte, pero a diferencia de los machos, las aletas de las hembras son transparentes.

Los machos alcanzan un tamaño aproximado de 5.5 cm y las hembras alrededor de 7 cm. Esta especie se puede alimentar en cautiverio con cladóceros, copépodos, *Artemia* y alimento balanceado en hojuela (Domínguez, 1999).

En general los goodeinos al tener tamaño pequeño y carecer de estructuras o colores llamativos son de poca importancia comercial (como alimento u ornamento). En consecuencia se les ha dedicado poca atención, por lo que los estudios realizados con este grupo son escasos. No obstante, los estudios de fotoperiodo para *S. multipunctata* han mostrado que esta especie responde a los cambios de fotoperiodo y produce cantidades similares de crías en condiciones de verano e invierno, aunque la supervivencia de las crías es mayor en el fotoperiodo de invierno (Jeronimo-Granados y Pita-Zamudio 2012).

Para una comprensión más detallada de las respuestas de ésta especie al fotoperiodo es necesario investigar la producción de melatonina y de los ritmos endógenos. Por ello, el conocimiento que se aporte en este tema será de utilidad para entender la regulación de su actividad hormonal. Esta información puede ser de utilidad para la crianza en cautiverio, lo cual es importante si se tiene en cuenta su estatus de conservación en peligro.

### III. JUSTIFICACIÓN

La organización del sistema circadiano se ha modificado como resultado de los procesos adaptativos/evolutivos de los organismos. Recientemente se ha demostrado la similitud del sistema circadiano de algunos peces ovíparos con aquella presente en mamíferos (Migaud et al. 2007). No obstante, en peces vivíparos los componentes básicos de este sistema como la glándula pineal y los niveles basales de melatonina en estas especies no se han descrito. La melatonina sincroniza importantes procesos fisiológicos como el crecimiento y la reproducción en vertebrados, por ello es de suma importancia conocer algunos aspectos básicos de su funcionamiento, para así tener una mejor comprensión de la fisiología de los peces vivíparos. Lo anterior adquiere mayor relevancia debido a que en estos peces existe una relación muy estrecha entre la madre y sus crías, las cuales pueden verse afectadas (inmediatamente o a futuro) por el ambiente al que está expuesta la madre. Por lo tanto, la información básica de los mecanismos de sincronización por fotoperiodo es necesaria para evaluar el efecto de la luz en la fisiología de peces vivíparos y así sentar las bases para un adecuado manejo (bajo condiciones controladas) de especies como *S. multipunctata*. Por ello, el objetivo de este trabajo es describir anatómicamente la glándula pineal, así como identificar la influencia del fotoperiodo en el perfil de melatonina corporal en el pez vivíparo *S. multipunctata*.

#### **IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

##### **4.1 Pregunta general**

¿Cuál es la morfología del complejo pineal y cuál es su relación con la producción de melatonina de origen pineal en peces vivíparos?

##### **4.2 Preguntas específicas**

- 1.- ¿Qué elementos componen al complejo pineal de *S. multipunctata*?
- 2.- ¿El patrón de producción de la melatonina corporal producida en el complejo pineal bajo un fotoperiodo de 12 h luz 12 h oscuridad en peces vivíparos (*S. multipunctata*) es similar al observado en otros peces?

#### **V. HIPÓTESIS**

- 1.- La anatomía del complejo pineal del vivíparo *S. multipunctata* es similar a la descrita para peces teleósteos ovíparos.
- 2.- El patrón de producción de melatonina circulante en *S. multipunctata* es bajo durante el día y alto durante la noche como en otras especies de peces.

#### **VI. OBJETIVOS**

- 1.- Describir anatómicamente por medio de técnicas histológicas la glándula pineal de *S. multipunctata*.
- 2.- Estudiar el patrón de producción de melatonina corporal producida en el complejo pineal bajo la influencia de un fotoperíodo de 12L:12O

## **VII. RESULTADOS**

### **VII. CAPITULO 1**

#### **Descripción anatómica histológica del complejo pineal del pez vivíparo *Skiffia multipunctata*.**

##### **7.1 RESUMEN**

El complejo pineal de los vertebrados no mamíferos es una estructura que contiene células fotorreceptoras similares a las de la retina. Este juega un papel clave en la organización temporal de los procesos fisiológicos y de comportamiento. El presente trabajo se realizó con organismos juveniles del pez vivíparo *S. multipunctata*, a los cuales se les realizó un análisis histológico del complejo pineal. Se logró tener un primer acercamiento a la estructura tisular del complejo pineal y sus componentes. Esta información es de gran relevancia para los peces vivíparos y en especial para los Goodeinos ya que no existen antecedentes al respecto y por lo tanto el conocimiento generado sienta las bases para futuros estudios.

##### **7.2 INTRODUCCIÓN**

El órgano pineal en peces teleósteos funciona como un fotorreceptor, el cual contribuye al control fisiológico funcional y comportamiento de procesos como la alimentación, locomoción, crecimiento, etc. El epitelio pineal contiene fotorreceptores, los cuales son células que se asemejan a los conos de la retina, tanto, en estructura y función. Los fotorreceptores de cono establecen contacto sináptico con las células ganglionares (o neuronas de segundo orden) que conectan sus axones al cerebro (Falcón, 2001). Los fotorreceptores liberan durante la noche un neurotransmisor excitatorio en las uniones sinápticas con las células ganglionares. Esta información nerviosa responde a cambios en la iluminación ambiente. Un segundo mensajero melatonina se produce durante la noche por los fotorreceptores y es liberado en el líquido y sangre-cerebro-espinal mediante el órgano pineal. La estructura de éste

aparece generalmente como una vesícula que se conecta al epítalamo dorsal por un tallo (Falcón et. al. 2007).

En lampreas y en los peces óseos más complejos, la glándula pineal tiene dos componentes: un órgano pineal y un órgano parapineal. Los elasmobranquios, poseen generalmente sólo un órgano pineal (epífisis cerebri). Algunos taxones de vertebrados, incluyendo los mixinos y rayas eléctricas, al parecer han perdido ambos componentes durante su proceso adaptativo-evolutivo (Vollrath, 1981).

La clase Elasmobranchii posee sólo un órgano pineal, que contiene células fotorreceptoras y neuronas para la transmisión de la información fótica al cerebro. El órgano pineal de tiburones suele ser muy largo y consiste en una región del tallo largo que termina en un extremo pequeño-vesícula (Vollrath, 1981). El órgano pineal actúa como un detector de luminiscencia que transmite la información fótica al cerebro a través de un tracto pineal (Hamasaki y Streck, 1971).

La mayoría de los peces óseos poseen tanto un órgano pineal y un órgano parapineal (Fig. 3). Cuando está presente, el órgano parapineal es siempre muy pequeño y permanece situado cerca del núcleo habenular, mientras que el órgano pineal es más grande y de morfología muy variable. Durante el desarrollo temprano, el órgano pineal se convierte en parapineal y se desplaza lateralmente, por lo general hacia el lado izquierdo (Ekström y Meissl, 1997). El órgano pineal presenta variedades morfológicas en teleósteos, que van desde tubular simple, sacular y sacular ampliamente plegada a estructuras parenquimatosas compactas (Hafeez, 1971).

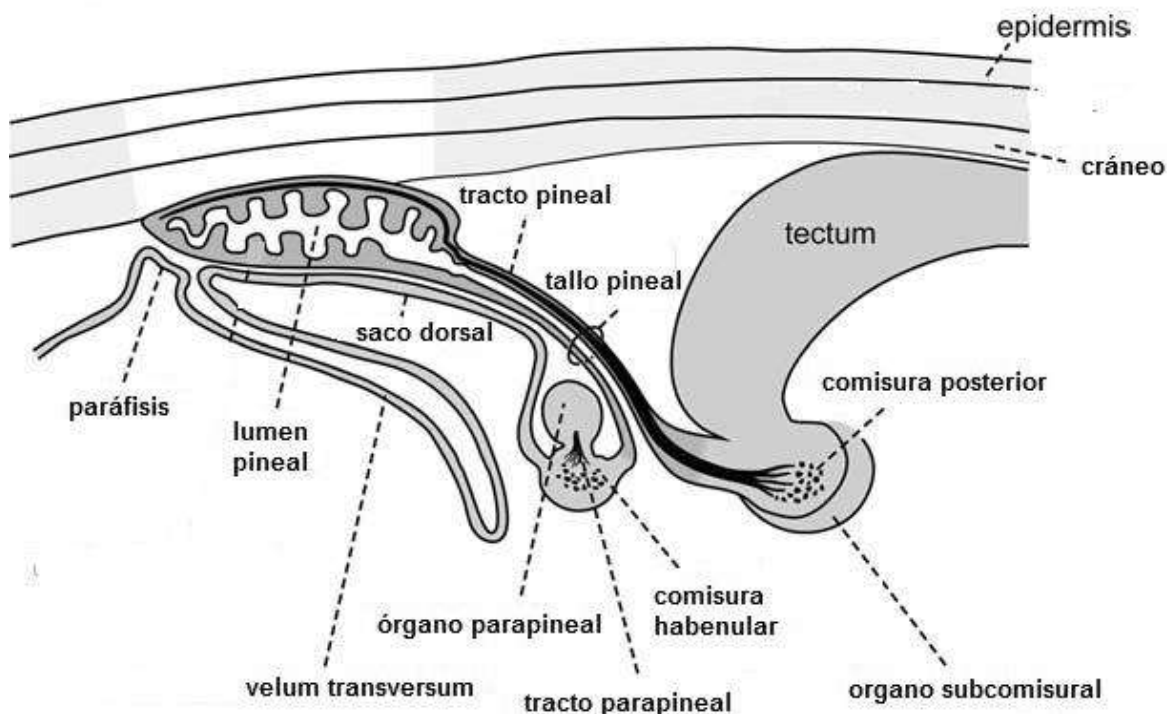


Figura 3. Descripción general de la región pineal de un pez teleosteo. La mayoría de los peces óseos poseen un órgano pineal y un órgano parapineal (Tomado y modificado de Peter Ekström y Hilmar Meissl 2010).

### 7.3 MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este experimento se utilizaron organismos juveniles de *S. multipunctata*, los cuales se produjeron para experimentación en condiciones controladas. Los padres de estos forman parte del “Programa de conservación, preservación y manejo de Goodeidos Mexicanos” del laboratorio de Biología Acuática de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Los organismos juveniles fueron anestesiados con benzocaína y sacrificados mediante decapitación, con el fin de mantener el complejo pineal en la misma posición. Para ello se procesaron las cabezas enteras. Las muestras obtenidas se fijaron en Bouin (HT10132, SIGMA) durante 24 h en la oscuridad, después se hizo un enjuague con alcohol al 70% (4 veces). Posteriormente los organismos fueron refrigerados, en un

refrigerador convencional (4°C). Las muestras se colocaron en un procesador de tejidos (Sakura, Japón). Se realizaron dos inmersiones en alcohol al 70% durante 90 min cada uno. Para el procesamiento de los tejidos e inclusión en parafina, se realizaron dos inmersiones en alcohol al 80, 96, 100%, xilol y parafina con polímeros altamente puros (K93091409-Histosec, MERCK KGaA, Darmstadt, Germany) y una duración de 90 minutos cada una.

Con los tejidos procesados se hicieron los bloques de parafina para cortar a 6 micras en un microtomo (Jung-Histocut 820, Leica, Leider Lane, Buffalo Grove, IL 60089 USA). Una vez realizados los cortes, se colocaron en un portaobjetos y se montaron usando alcohol al 70%, sobre una parrilla eléctrica. Se utilizó la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina Floxina (Hattori et al. 2009). La cual consiste en sumergir dos veces en xilol durante 5 minutos cada portaobjetos. Posteriormente los portaobjetos se sumergieron diez veces en alcohol al 100, 96, 80, 50%, agua destilada y Hematoxilina de Harris por 20 minutos. Seguidamente se aplicó agua de la llave por 5 miny enseguida cada portaobjetos fue sumergido rápidamente en alcohol ácido, luego se aplicó agua por 2 min. Cada portaobjetos fue sumergido 20 veces en agua amoniacal, en seguida se realizó un enjuague con agua de llave por 5 minutos y una en alcohol al 80%. Durante dos minutos el portaobjetos fue sumergido en Eosina y para finalizar se sumergió nuevamente diez veces en alcohol al 96, 100% y Xilol. Las muestras fueron analizadas en un microscopio óptico.

## **7.4 RESULTADOS**

### **7.4.1 Vesícula Pineal**

La vesícula pineal (PV) surge con el tallo pineal, entre el telencéfalo (cerebro anterior) y el mesencéfalo (lóbulos ópticos) y se proyecta en dirección de la ventana pineal como se observa en las figuras 4a, 4b, 4c. En la figura 4a (sección transversal) la PV se encuentra directamente sobre los dos lóbulos cerebrales, en la figura 4b sección sagital, se observa debajo de la ventana pineal (Pw) una sección alargada de la vesícula pineal apoyada por tejido conjuntivo seguido por su tallo pineal cerca del

telencéfalo. En la figura 4c se puede apreciar la forma de vesícula pineal cóncava, bajo el cartílago craneal.

La ventana pineal, muestra una posición vertical casi todo el tiempo. La vesícula pineal es de tamaño pequeño, rodeado por una cápsula delgada y bien vascularizada. Por lo que se puede apreciar un lumen, no hay muchos pliegues (Figuras 4a, 4c y 5a, 5b). El neuroepitelio de la vesícula se pseudoestratifica y se observa que se encuentran dos tipos de células: pinealocitos con núcleos redondos y citoplasma más púrpura además las células gliales, que tiene núcleos redondos y citoplasma pálido (Figura 5b).

La vesícula pineal se puede apreciar de forma triangular, cóncava o alargada (Figuras 4a, 4b y 4c), pero siempre es pequeña y nunca va más allá de la ventana pineal. Asimismo, se puede observar que está sostenida por tejido conectivo, el cual la une al techo del cráneo (Figura 6a). En ocasiones la PV se encuentra directamente unida al cartílago del cerebro (Figura 6b). Por su parte, la ventana pineal también carece de cartílago en ella se observan algunos melanóforos (Figura 5a).

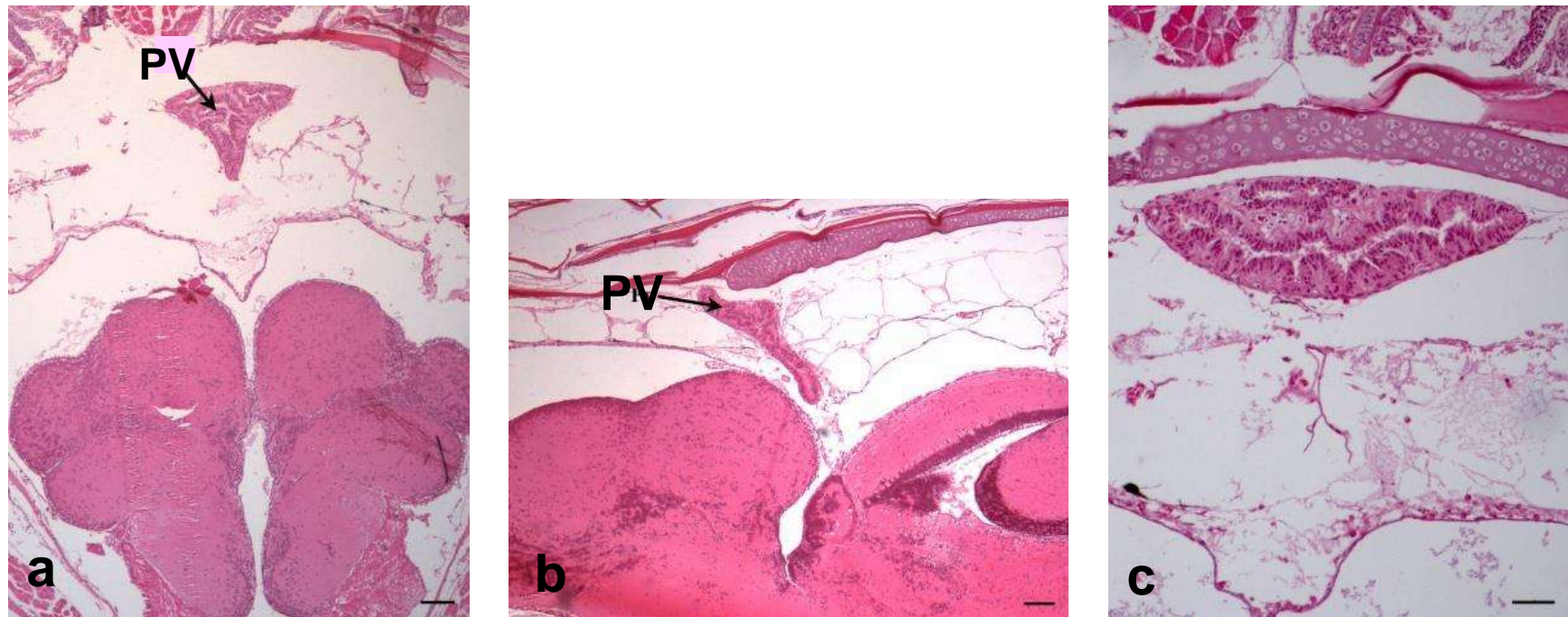
#### **7.4.2 Tallo Pineal**

El tallo pineal (PST) es una estructura tubular, que desciende casi en línea recta en dirección hacia los hemisferios cerebrales y a la comisura habenuar (Figura 7 a). La parte anterior del tallo pineal, que se encuentra cercano a la sección caudal de la vesícula pineal, es un epitelio de múltiples capas con lumen no plegado (Figura 7 b).

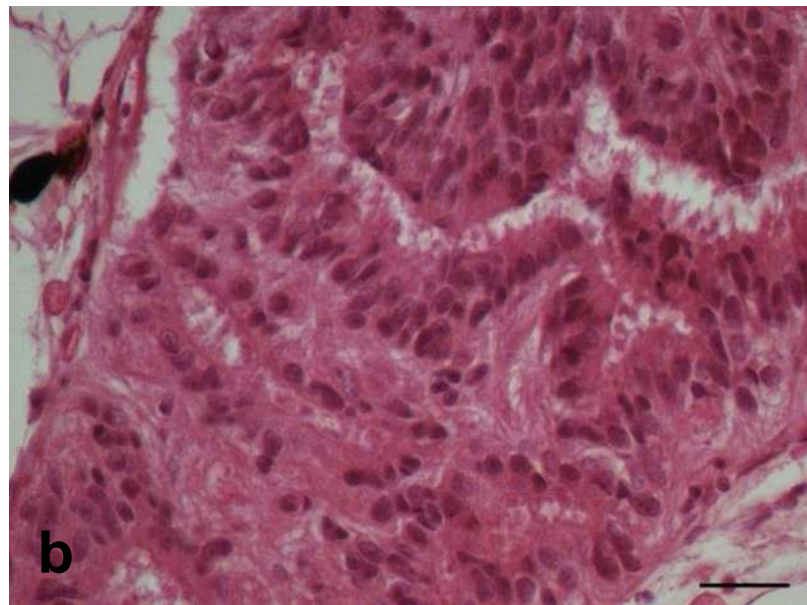
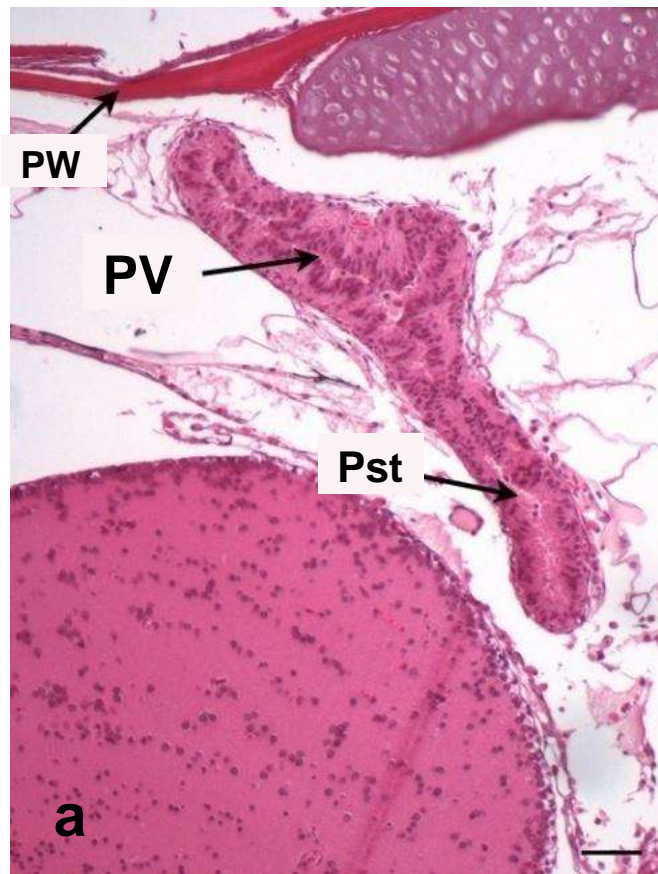
#### **7.4.3 El saco dorsal. Habénula**

En la figura 7 se muestra la sección transversal del tallo pineal, se distingue el saco dorsal, que está unido a los dos lóbulos ópticos.

La habénula se encuentra al lado del lóbulo óptico. Esta a su vez se encuentra abajo del tallo pineal. En tanto que en la sección sagital del cerebro se observa entre el telencéfalo y el lóbulo óptico (Figura 8) en dirección al cerebro, las habenuas pasan la comisura habenuar. El saco dorsal continúa como una estructura plegada (Figura 9 a, 9b) dispuesta en una monocapa columnar. El tallo pineal contiene dos tipos de células redondas, células con luz color eosinofílica y células más oscuras (Figura 9 c).



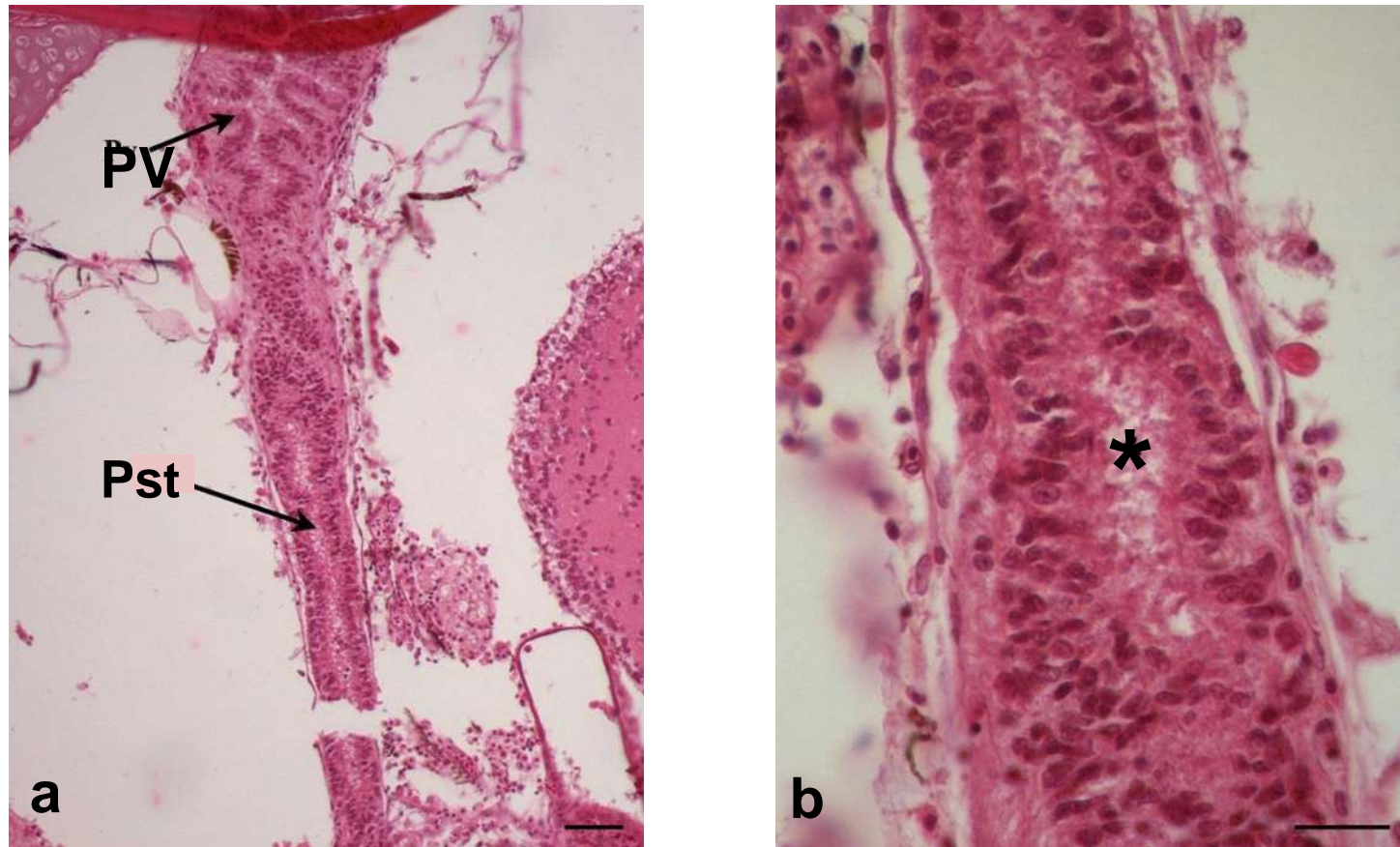
**Figura 4.** Diferentes cortes de la vesícula pineal (PV) de *Skiffia multipunctata*. a) Sección transversal H & E bar 100µm; b) sección sagital H & E bar 100µm. c) Vesícula Pineal (PV) H & E bar de 50 micras.



**Figura 5.** a) Sección sagital de la cabeza donde la vesícula pineal (PV) y tallo pineal (Pst) se observan cerca de la ventana pineal (Pw) H & E bar 50 $\mu$ m. b) Vista cercana de la vesícula pineal, donde se observan dos tipos de células (pinealocitos con núcleos redondos y citoplasma más púrpura además las células gliales, que tiene núcleos redondos y citoplasma pálido) H & E bar 20 $\mu$ m.



**Figura 6.** a) Sección de la vesícula pineal (PV) de *S. multipunctata* adscrita al cartílago (C) por el tejido conectivo. En la ventana pineal el hueso es delgado, dos capas se solapan y se observa la piel con algunos cromatóforos dispersos H & E bar 100µm. B) Vesícula Pineal unida directamente al cartílago H & E barra de 50 micras.



**Figure 7. a)** Sección transversal del tallo pineal (PSt), (accidentalmente fragmentado), se observa parte de la vesícula pineal (Pv). H & E barra de 50 micras. **b)** Ampliación del tallo pineal, en el cual se observa en el lumen (\*), las multicapas y el epitelio no-plegado de la vesícula H & E bar 20µm.

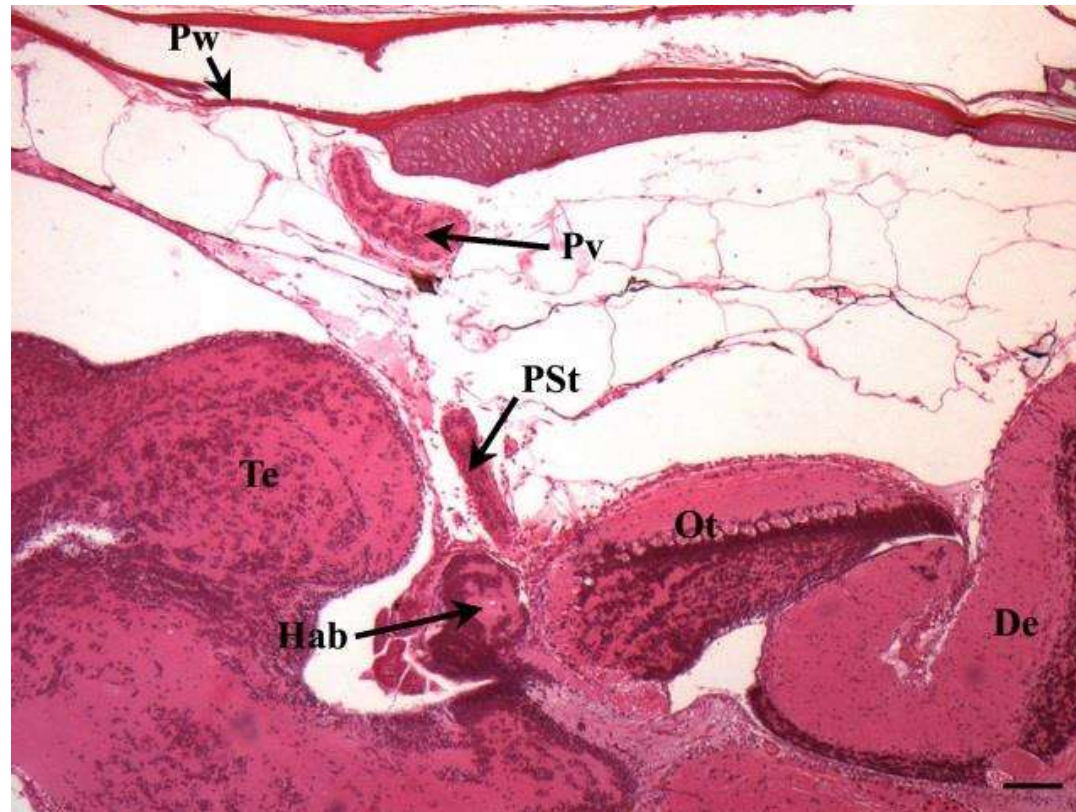
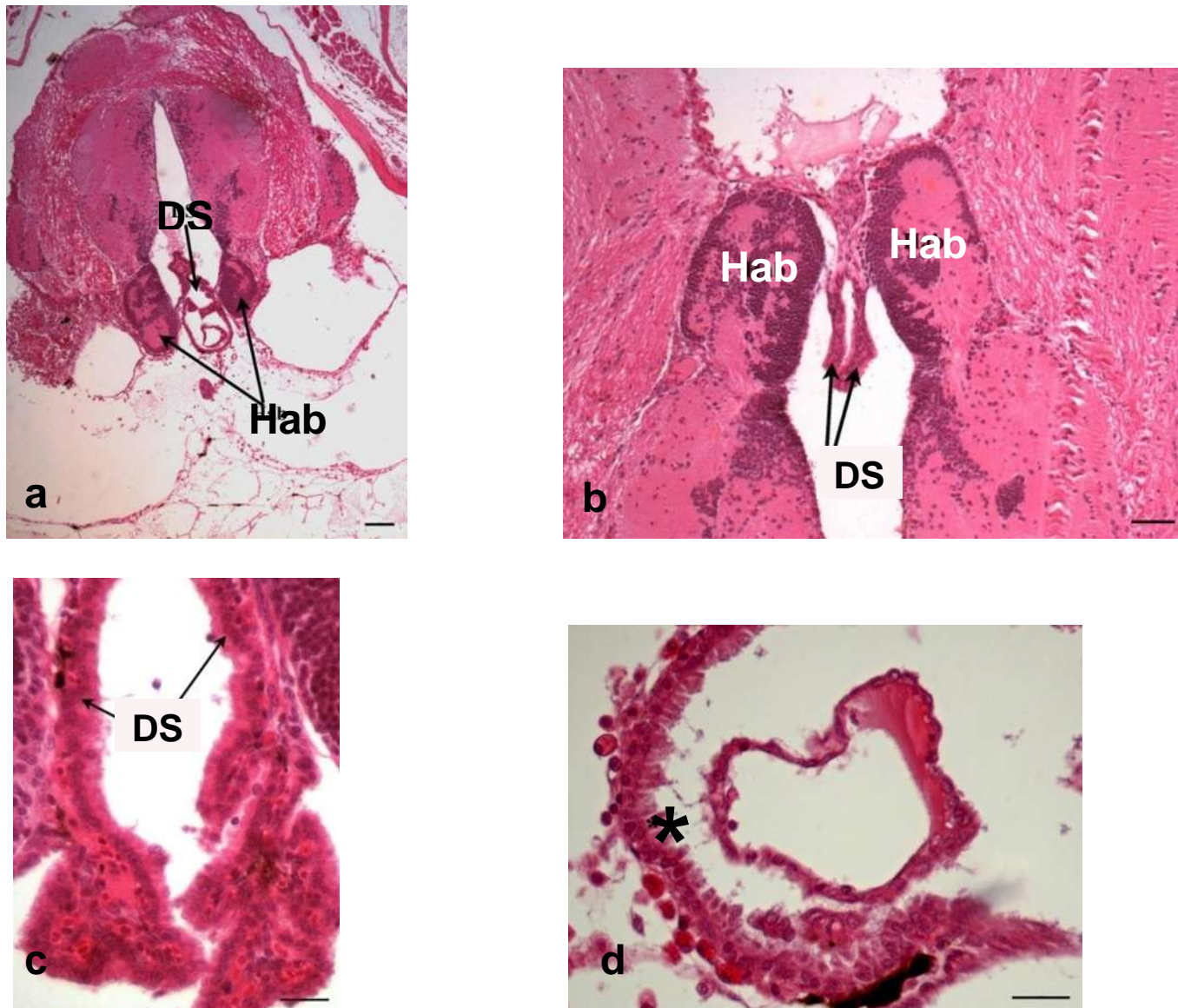


Figura 8. Corte de la sección sagital del cerebro de *S. multipunctata*. En el área izquierda se encuentra el telencéfalo (Te) y el diencefalo en la parte inferior (De), seguido por el lóbulo óptico o mesencéfalos (Ot). Entre ellos se ubica una habénula (Hab) y hacia arriba del cerebro se identifica el tallo pineal (PSt); siguiendo hacia arriba del PSt se observa la vesícula pineal (PV) cerca de la ventana pineal (Pw) H & E bar 100µm.



**Figura 9.** Diferentes secciones del saco dorsal a) (100µm) b) (50µm) c) (100µm).El saco dorsal (DS) está entre los dos lóbulos ópticos unido a las habenulas (HAB). c) d) Células columnares en el saco dorsal (\*) (100µm).

## 7.5 DISCUSIÓN

El presente estudio se enfocó a conocer la función de la glándula pineal a partir de la estructura histológica en especies vivíparas nativas de México. Para ello se utilizó como modelo biológico a *Skiffia multipunctata*, la cual pertenece a la subfamilia Goodeinae. El resultado muestra la histología y morfología general del complejo pineal de esta especie.

El órgano pineal en todos los peces es un órgano fotorreceptor, que resulta de una evaginación del cerebro anterior y está conectado al cerebro por un tallo pineal (Falcon et al. 2009). En la mayoría de los peces poiquilotermos, el complejo pineal tiene dos componentes, la glándula pineal y órgano parapineal (ArieñnsKappers, 1965). Sin embargo, en los organismos juveniles de *S. multipunctata* no se observó la glándula parapineal, lo cual pueda deberse a que está presente en etapas embriológicas de desarrollo, pero desaparece en peces adultos.

La ventana pineal en *S. multipunctata* es como en muchos peces un área transparente para percibir la luz y transmitir la información sobre los ciclos diarios y anuales de la luz. Esta información es necesaria para promover la función de los ciclos circadianos y para estimular la producción de melatonina. La ventana pineal de esta especie no tiene cartílago, está cubierta por una capa de hueso muy delgado y una capa de piel delgada que tiene pocos pigmentos dispersos o carece de ellos. Resultados similares a lo observado en el presente trabajo se encontraron en el cráneo de la lubina (*Dicentarchus labrax*) (Herrera-Pérez et al.2011).

La vesícula pineal es pequeña, triangular o de forma cóncava en función del corte. Su ubicación es inferior a la ventana pineal, con la cual se encuentra alineada pero ligeramente a la izquierda. Esta está unida a la ventana pineal translúcida; sólo es más ancha en la parte superior de la vesícula. La glándula pineal está conectada directamente al tercer ventrículo, a través de un largo tallo. Trabajos previos han demostrado que las glándulas pineales de algunos peces, como los salmones son más sensibles debido a la transparencia de ventana pineal (Migaud et al. 2006).

En los cortes revisados, se pudieron apreciar tres diferentes tipos de células, las cuales fueron reconocidas en la vesícula pineal, se llegó a la conclusión que son a) los pinealocitos con núcleos redondos y citoplasma más púrpura, b) las células gliales, que tiene núcleos redondos y citoplasma pálido y c) las neuronas. No obstante, es necesario realizar más estudios con la aplicación de otras técnicas de tinción histológica para comprobar los componentes celulares y no celulares específicos

La vesícula pineal en *S. multipunctata* está altamente vascularizada penetrando en el parénquima y se observa claramente dentro de la vesícula. Otros autores han encontrado que los vasos sanguíneos no penetran en el parénquima, pero quedan fuera la lámina basal en el espacio perivascular (Takahashi y Kasuga, 1971; Falcón, 1979a, b; McNulty, 1979; Herwig, 1980).

Con este estudio se logró tener un primer acercamiento a la estructura tisular del complejo pineal y sus componentes de la especie vivípara *S. multipunctata*. No obstante, es recomendable realizar más estudios para confirmar las células observadas y complementar la información adquirida en este trabajo. Esta información es de gran relevancia, toda vez que para los peces Goodeinos no existen antecedentes al respecto y por tanto el conocimiento generado sienta las bases para futuros estudios.

## **VII. CAPITULO 2**

**Revisión de métodos de extracción y cuantificación de melatonina. Elección de una técnica adecuada para cuantificar melatonina en cuerpos completos de *Skiffia multipunctata*.**

### **7.1 RESUMEN**

El ritmo circadiano de la melatonina es la respuesta a las variaciones ambientales de luz y oscuridad, regula importantes procesos fisiológicos como crecimiento y reproducción, entre otros. La comprensión de los ritmos de melatonina es importante para lograr mayor conocimiento acerca de la fisiología de los organismos. Una forma de profundizar en los ritmos de melatonina se da a través de la evaluación de la producción de dicha hormona. Para poder extraer y cuantificar la melatonina existen diferentes métodos, ya sea mediante la saliva, plasma o tejido. Cada método presenta ventajas y desventajas y cada uno es más adecuado para determinar la concentración de melatonina en función del tejido que se evalúa. Este capítulo describe algunos los métodos de extracción de melatonina probados exitosamente en otros organismos, los cuales fueron adaptados para la extracción de melatonina en el pez goodeino *Skiffia multipunctata*. La mayoría de los métodos de extracción no fueron adecuados para estos peces, sin embargo, se logró hacer una extracción correcta utilizando acetato de etilo.

### **7.2 INTRODUCCIÓN**

La melatonina (N-acetecetil-5-metoxitriptamina) es una hormona secretada en la glándula pineal, pero es sintetizada por otros tejidos y células como la retina (Liu et al. 2004), células de médula ósea humanas y murinas (Conti et al. 2000), plaquetas (Champier et al. 1997), tracto gastrointestinal (Bubenik, 2002), piel (Slominski et al. 2005) o linfocitos (Carrillo-Vico et al. 2004). Debido a los diferentes sitios de formación y a la presencia de receptores de melatonina en diversas ubicaciones, se ha determinado que la melatonina participa en diversos procesos fisiológicos y cumple distintos roles

(sincronizador biológico, antioxidante, estimula y protege el sistema inmune) (Srinivasan et. al 2005).

Aunque los estudios *in vitro* pueden proporcionar información importante sobre los efectos de la melatonina, los estudios de las fluctuaciones de la concentración de melatonina en los fluidos y tejidos del cuerpo generalmente han tenido mayor relevancia para la comprensión de su función en los organismos (Hardeland, 2009).

### **7.2.1 Determinación de la melatonina en muestras biológicas**

La presencia de bajos niveles de melatonina representa un problema analítico que impide su correcta determinación, por lo tanto es necesario desarrollar técnicas de extracción y determinación de melatonina en muestras biológicas que sean suficientemente sensibles aún para bajas concentraciones de esta hormona. En muestras de suero, la ME puede ser extraída por líquido simple o procedimientos líquidos, tales como la adición de diclorometano (1:1 v/v). Para ello, las muestras se mezclan para obtener una fase acuosa y orgánica. Con este procedimiento, la melatonina se obtiene en la fase acuosa de diclorometano, con una tasa de recuperación satisfactoria, generalmente mayor a 70%. Esta técnica también se puede aplicar a tejidos homogenizados en solución buffer. No obstante, con la aplicación de esta técnica se ha reportado una baja precisión cuando se determina la concentración de la melatonina a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detector de fluorescencia (Rizzo et al. 2002). Para múltiples análisis de la melatonina y sus precursores o metabolitos, se han realizado extracciones líquido-líquido más completas y se han descrito usando una combinación de diferentes solventes (Harumi y Matsushima, 2000).

En investigaciones más antiguas, el cloroformo (triclorometano) se utilizaba sobre todo para la extracción de la melatonina y todavía hoy en día está en uso. Aunque este método es eficaz, se prefiere el diclorometano ya que provoca menor toxicidad. Generalmente, el metano clorado debe contar con la más alta pureza y protección de la luz y a compuestos redox-activo, ya que es de suma importancia para

evitar la formación de reactivos intermedios que pueden destruir la melatonina (Alves et al. 2011).

La preparación de la muestra depende del método utilizado para el análisis, ya que la presencia de otros compuestos en la muestra puede interferir con la señal de la melatonina. El grado de purificación de la melatonina a partir de muestras biológicas puede, en algunos casos, ser fundamental para la sensibilidad del método utilizado.

Logana et al. (1995) describieron un procedimiento de extracción para muestras en suero a través de un cartucho LC-18, además de un cartucho de Carbohydrate con una recuperación que va desde 86.3 hasta 91.7% para concentraciones de 10 a 200 pg/mL de melatonina. La técnica consistió en pasar 2 mL de muestra de suero a través de un cartucho de LC-18, para enseguida lavar con 2 mL de agua y 2 mL de la mezcla metanol-agua (90:10, v/v). La melatonina se eluyó de la columna con metanol puro, se secó y resuspendió (Sieghart et al. 1987). Otra técnica que también resultó exitosa, logró purificar la melatonina por elución con 2 mL de metanol-agua (40:60, v v) (Lagana et al. 1995). Para esta técnica, el cartucho se lavó con 10 mL de metanol y 3 mL de metanol-diclorometano (80:20, v/v) y la melatonina se eluyó finalmente con 1,5 mL de metanol-diclorometano (10:90, v/v). El eluyente se evaporó a sequedad bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y se resuspendió en 100 µL de metanol-agua (75:25, v/v) para los análisis.

El procedimiento descrito anteriormente permite la detección de melatonina con alta sensibilidad y sin interferencia de otros componentes en la muestra (Lagana et al. 1995). De igual forma se ha demostrado que la homogeneización en 10 vol de ácido perclórico (0,1 M) enfriado con hielo, también puede representar un medio preciso para la extracción y posterior determinación por HPLC de la melatonina en los tejidos. Este método se ha acoplado a la detección electroquímica o de fluorescencia (Harumi et al. 1996). En este caso, el homogeneizado es centrifugado a 10.000 × g durante 20 min a 4° C y el sobrenadante resultante se puede inyectar directamente en el sistema HPLC. También se ha sugerido que 90 µL de la fracción sobrenadante, mezclada con 10 µL de fosfato de sodio (1 M, pH 4,3) pueden lograr una mejor resolución de los picos (Harumi et al. 1996).

Dependiendo del método utilizado, puede ser necesario un tratamiento adicional de los extractos de melatonina. La cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) como métodos para la detección de la melatonina requieren la derivatización de la muestra para la volatilización de melatonina, por ejemplo, el uso de anhídrido pentafluoropropiónico o heptafluorobutirilo imidazol (Degen et al. 1972).

Sin embargo, en el caso de las muestras de plasma humano se han inyectado directamente y evaluado en un sistema de HPLC con detección de fluorescencia sin extracción o purificación previa. En dichas muestras se pudo detectar la ME con un límite de detección de 1 ng por mL de plasma humano (4 pmol/ml) (Bechgaard et al. 1998). No obstante, se ha confirmado que la derivatización de la melatonina con carbonato de sodio y peróxido de hidrógeno aumenta la sensibilidad casi 10 veces para la medición en sistemas de HPLC acoplados a detectores de fluorescencia (Tomita et al. 2003).

### **7.2.2 Inmunoensayo**

Para la cuantificación de la melatonina en fluidos biológicos, el uso de métodos inmunológicos es el método más común. Actualmente varios kits comerciales basados en estos métodos están disponibles para la determinación de la melatonina. Algunos de estos métodos son altamente sensibles y simples de usar (con un límite inferior de detección de 0,5 pg/mL), pero pueden sufrir de un riesgo potencial de reactividad cruzada con compuestos estructuralmente similares, si la melatonina no se extrae correctamente (Di et al. 1998).

El aspecto más importante del inmunoensayo es la preparación de un antisuero. Debido a que la molécula de melatonina es pequeña, no es capaz de producir su propio antisuero, por lo que debe ser acoplada a una proteína antigénica. En tal conjugado, la sustancia de menor peso molecular se llama hapteno. El antisuero resultante se une tanto a la proteína como al hapteno, más una porción de la proteína adyacente. El hapteno tiene pocos determinantes antigénicos con respecto a la proteína. Los estudios de especificidad de los antisueros producidos por conjugados de proteína-esteroides han demostrado que los antisueros no son capaces de discriminar diferencias

estructurales en el hapteno que se encuentran inmediatamente en o cerca del sitio de acoplamiento (Grotta et al. 1981).

### **7.2.3 Radioinmunoensayo**

El principio del método de Radioinmunoensayo (RIA) para la medición de melatonina, se basa en que una cantidad conocida de la melatonina radiactiva (2-yodo melatonina I125- o 3 H-melatonina) que se mezcla con una cantidad fija del anticuerpo generado contra la melatonina. Las concentraciones crecientes de melatonina no marcada se añaden a la mezcla, que competirá con la melatonina marcada provocando su desplazamiento desde el anticuerpo. La melatonina marcada libre se separa entonces de la melatonina radiactiva restante unida al anticuerpo y es a esta que se le mide la radiactividad. Al aumentar la concentración de melatonina no marcada en la mezcla, la competencia por los anticuerpos también aumenta y la melatonina marcada disminuye. Una curva de calibración construida a partir de cantidades conocidas de melatonina marcada y no marcada permite la determinación de las concentraciones de melatonina desconocidos en muestras biológicas (Fraser et al. 1983).

En este mismo trabajo se describe un protocolo para la medición de la melatonina por RIA en el plasma (Fraser et al. 1983), el cual que ha sido adoptado por varios investigadores, algunos con ligeras modificaciones. Brevemente se puede resumir que a 200  $\mu$ L del anticuerpo (diluido 1000 veces) se añaden 500  $\mu$ L de soluciones que contienen diferentes cantidades de melatonina estándar (2,5 a 250,0 pg). Una vez que la solución se homogeniza en vórtex y se mantiene a temperatura ambiente durante 30 min.  $^3$ H-melatonina se añade a los tubos (100  $\mu$ L, 4000 cpm), se mezcla y se guarda a 4° C durante 18 h. Entonces, se añade 0,5 mL de solución de carbón vegetal recubierto de dextrano y la solución se centrifuga durante 15 min a 1500  $\times$  g y 4° C, con el fin de separar la melatonina unida al anticuerpo de la fracción libre. La fracción sobrenadante se decanta finalmente en 10 mL de fluido de centelleo y la radiactividad se cuenta en un contador de centelleo beta.

La purificación previa de melatonina de plasma mediante cromatografía de columna de fase inversa reduce en gran medida los problemas de reactividad cruzada

(Sieghart et al. 1987). Por otra parte, Rolčik et al. (2002) utilizaron cromatografía de inmunoafinidad empleando antisueros específicos para muestras de proceso antes del análisis HPLC-MS. Sin embargo, se debe reconocer que incluso una débil reactividad cruzada puede ser un problema, si la molécula de reacción cruzada está presente en grandes cantidades. Por lo tanto, la validación independiente del procedimiento es esencial cuando se ensaya una matriz diferente.

#### **7.2.4 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)**

Las pruebas realizadas con ELISA para la cuantificación de melatonina emplean antisueros idénticos a los utilizados en el RIA. Uno de ellos es el suero de albúmina absorbido en esferas de poliestireno. Este compete con la melatonina por una cantidad fija de anticuerpo marcado con peroxidasa IgG (Ferrua y Masseyeff. 1985).

Un estudio comparativo de un RIA y un ELISA comercial evidenció que el kit ELISA requiere una etapa de purificación para ser válido cuando se aplica a suero humano. Este era un paso que no era parte del procedimiento recomendado por el fabricante (Chegini et al. 1995). Dado que la prueba no requería la purificación con la etapa de extracción, el ensayo tenía claras ventajas; los ensayos enzimáticos tienen importantes ventajas como que el conjugado enzimático sea estable, además es más conveniente que  $^3\text{H}$  o  $^{125}\text{I}$  y no presenta ningún problema con la eliminación de los residuos radiactivos. Adicionalmente, no es necesario centrifugar, si se utilizan placas de microtitulación (Yamada et al. 2002)

#### **7.2.5 HPLC acoplado a la detección electroquímica y la fluorescencia**

En muchos estudios, la metodología RIA ha sido reemplazada por HPLC con detección electroquímica y la fluorescencia para la evaluación de la melatonina, debido a su gran sensibilidad y especificidad. Este procedimiento es más adecuado para la melatonina sola y no para las mezclas de varias índoles, tales como la serotonina y triptamina entre otros, que pueden causar interrupciones en el ensayo. Esto puede causar perturbaciones en las separaciones cromatográficas que pueden hacer que la detección de la melatonina sea difícil. No obstante, para evitar la correlación entre

componentes (serotonina, triptamina, etc.) se debe de establecer adecuadamente la técnica de la cromatografía (Vitale et al. 1996).

Con respecto a la detección de fluorescencia, algunas metodologías altamente sensibles han sido reportadas para la detección de la melatonina en el nivel femtomol (Yang et al. 2002). La melatonina se puede separar en una columna C18 mediante el uso de 75 mM de acetato de sodio pH 5,0 y acetonitrilo (72:28, v/v) como fase móvil, la cual al ser bombeada isocráticamente a 1,0 mL/min. Enseguida la ME es detectada por la configuración del detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 275 nm y una longitud de onda de emisión de 345 nm (Rizzo et al. 2002).

### **7.2.6 Espectrometría de masas**

La técnica GC-MS es muy sensible y ofrece mayor especificidad que la HPLC con detectores electroquímicos o de fluorescencia. Una dificultad con esta técnica es la necesidad de derivatización y por lo tanto se ha sustituido gradualmente por procedimientos de cromatografía y espectrometría de masas en líquido. Por lo anterior, los métodos alternativos de HPLC-MS apropiados para su uso en temas biológicos se han desarrollado (Almeida et al. 2004). Cabe mencionar que este enfoque está limitado por la necesidad de estándares internos adecuados. Yang et al. (2002) describe una metodología que utiliza acetilriptamina como patrón interno, aunque varios factores hacen que método no sea muy aceptado. Lo más apropiado es utilizar un estándar interno que esté marcado y cuya estructura sea la misma del analito a excepción de la diferencia de masa. La adición de un estándar interno marcado isotópicamente antes del análisis mejora el nivel de confianza del método (Matoyama et al. 2004).

Por lo tanto, el desarrollo de métodos sensibles y selectivos para la detección precisa de esta hormona en tejidos y fluidos de animales es indispensable. Dicha determinación aumenta su grado de complejidad en función a su baja concentración y a la coexistencia de muchos otros compuestos endógenos en sangre. Por ello, la determinación de la melatonina ha sido un reto analítico.

Este capítulo describe algunas metodologías actuales empleadas para la detección y cuantificación de la melatonina en los fluidos y tejidos biológicos, las cuales fueron probadas para la determinación de ME en el pez vivíparo *Skiffia multipunctata*.

## **7.3 RESULTADOS**

### **7.3.1 TÉCNICAS USADAS**

Con el fin de realizar la extracción de melatonina corporal en *S. multipunctata* se utilizaron seis técnicas diferentes de extracción a fin de elegir la técnica que se ajustara mejor. Debido a que las técnicas usadas fueron diseñadas para determinaciones en plasma sanguíneo o tejido de pez, cada técnica se modificó de acuerdo a las características de esta especie.

Debido al pequeño tamaño de *S. multipunctata* (juveniles 3.38 cm  $\pm$ 0.4) se utilizó el cuerpo completo. Al aplicar las técnicas de extracción se presentaron algunas complicaciones en el proceso de medir la hormona. En las seis técnicas aplicadas y adaptadas a *S. multipunctata*, fue necesario adaptar los tiempos de centrifugado, secado, reconstitución de la muestra, temperatura, etc. debido a que no se encuentran experimentos publicados para esta especie. Cabe mencionar las primeras 5 técnicas usadas fueron repetidas continuamente hasta descartar la posibilidad de un error por parte del laboratorista. Con ninguna de de éstas técnicas se obtuvieron niveles detectables de la hormona en muestras de *S. multipunctata*.

En la tabla 1 se muestran las técnicas empleadas para la detección y cuantificación de la melatonina. Con las primeras técnicas los resultados no mostraron diferencias significativas entre las muestras del día y la noche. Sin embargo, la técnica propuesta y adaptada Steffen Franke et al. (2013) mostró diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ), por lo que se consideró apropiado aplicar está técnica para la detección de la hormona en el trabajo de investigación subsecuente.

**Descripción histológica y funcional del complejo pineal del pez vivíparo *Skiffia multipunctata* (Pellegrin, 1901)**

| <b>Autores/año</b>                                   | <b>Solvente/<br/>cantidad</b>   | <b>Aparato para<br/>Homogenizar,<br/>tiempo y vel.</b>                          | <b>Vel. para<br/>Centrifugar</b> | <b>Tiempo/<br/>Centrifugación<br/>(4°C)</b>   | <b>Solv.<br/>agregado</b>                             | <b>2ª<br/>centrifugación</b> | <b>Tiempo y<br/>temp. de<br/>evaporación</b> | <b>Solv. utilizado<br/>p/reconstitución de<br/>muestra</b> |
|--|---|---|----------------------------------|---|---|------------------------------|--|--|
| <b>Martinez-Chavez<br/>et al. 2008</b>               | Buffer de<br>Fosfatos/2.5<br>ml   | Precellys 24/ 5<br>seg vel 4  | 1200 g                           | 15 min  |   |                              |  |  |
| <b>Laganá et al.<br/>1995</b>                        | Cloroformo/<br>2.5 ml   | Precellys 24/ 5<br>seg vel 4  | 4472 g                           | 20 min  |   | 16 100 g<br>30 min/ 4°C      | 90 min / 50°C                                | 800 ul Buffer de<br>fosfatos + 800 ul<br>agua bidestilada  |
| <b>Adaptación de<br/>Laganá et al.<br/>1995</b>      | Ácido<br>perclórico/<br>2. MI   | Precellys 24/ 5<br>seg vel 4  | 4472 g                           | 20 min  |   | 10 000 g<br>20 mi/ 4°C       | 1180 min / 50<br>°C                          | 800 ul Buffer de<br>fosfatos + 800 ul<br>agua bidestilada  |
| <b>Adaptación Dun-<br/>Xian Tan et al.<br/>2014</b>  | Buffer de<br>fosfatos/ 2.5<br>ml  | Ultraturrax vel 3<br>(Reposar<br>durante 24 h a<br>4°C antes de<br>centrifugar) | 1760 g                           | 30 min  | Agregar 3 ml<br>de<br>cloroformo<br>*vortex 10<br>min | 780 g<br>10 min / 4°C        | 15 min/ 50 °C                                | 500 ul Buffer de<br>fosfatos                               |
| <b>Extracción de<br/>lípidos</b>                     | Cloroformo/<br>metanol 2:1<br>0.88% KCL<br>*Por cada<br>gramo se<br>agrega 16<br>ml | Ultraturrax vel 3<br>(reposar 1 h en<br>hielo)                                  | 400 g                            | 3 min<br>*Filtrar con filtros<br>whatman no.1 |   |                              | 180 min /<br>30°C                            | 500 ul Buffer de<br>fosfatos                               |
| <b>Adaptación<br/>Martinez-Chavez.<br/>2008</b>      | Buffer de<br>fosfatos 2.5<br>ml   | Ultraturrax vel 3   | 1200 g                           | 15 min  | Metanol 1 ml  | 120 g / 5min                 | 180 min/<br>30°C                             | 1700 ul Buffer de<br>fosfatos                              |
| <b>Adaptación<br/>Steffen Franke et<br/>al. 2013</b> | 2.5 ml<br>Buffer de<br>fosfatos   | Ultraturrax vel 3   | 1200 g                           | 15 min  | acetato de<br>etilo 1 ml                              | 120 g/ 5 min                 | 180 min/<br>30°C                             | 1700 ul buffer de<br>fosfatos                              |

Tabla 1 . Métodos de extracción usados en *Skiffia multipunctata*.

## **7.4 DISCUSION**

Los métodos más comunes para la determinación de la melatonina se realizan en muestras de sangre o saliva y se conocen como radio inmuno ensayos (RIAs) y ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA). Actualmente se encuentran disponibles varios kits comerciales para la realización de estos ensayos.

*S. multipunctata* es un pez de tamaño pequeño, y es sumamente complicado extraer plasma sanguíneo o tejido en cantidades adecuadas para hacer extracción de melatonina. Sin embargo, fue posible ajustar un método de extracción indicado para este tamaño de muestra, desde el solvente y su cantidad, hasta la velocidad y tiempos de centrifugado, así como la temperatura de secado. La técnica que se adaptó mejor a este tipo de muestras fue la modificación propuesta por Franke et al. (2013), en la que se utilizó acetato de etilo para extraer la hormona.

## **VII. CAPITULO 3**

### **Cuantificación de melatonina producida por el complejo pineal en cuerpo entero de *Skiffia multipunctata***

#### **7.1 RESUMEN**

Organismos juveniles de *Skiffia multipunctata* fueron expuestos a un fotoperíodo 12L:12O para determinar los niveles basales de melatonina de origen pineal durante un día. Se realizaron dos muestreos (diez organismos en cada uno), el primero a las 12 h y el segundo a las 24 h. Cada muestra fue analizada por triplicado en un kit ELISA, para ello se homogeneizaron las muestras de pez completo (sin ojos para evitar alteraciones en los resultados debido a la gran cantidad de melatonina contenida en ellos). Los resultados mostraron niveles de melatonina promedio de 54.1 pg/mL  $\pm$ 7.4 y 24.1 pg/mL  $\pm$ 5.8 en las muestras de noche y día respectivamente.

#### **7.2 INTRODUCCIÓN**

El fotoperíodo es la variable ambiental más estable y la principal interface de la sincronización del organismo con el medio ambiente. La mayoría de los organismos han adaptado su comportamiento y funciones fisiológicas a los cambios de luz durante el día, las cuales a su vez varían durante el año de acuerdo a la amplitud de la exposición de la luz y oscuridad (Ekström y Meissl 1997).

La melatonina es la hormona principal que sincroniza al organismo con el medio ambiente, esta se produce en la glándula pineal durante periodos de oscuridad (Simonneaux y Ribelayga 2003). El patrón diario de la secreción de melatonina es muy similar en todos los organismos, presenta poca variación entre los vertebrados. El proceso inicia cuando la luz es captada a través de fotorreceptores no visuales de la retina y/o la glándula pineal y se libera en el

torrente sanguíneo y líquido cefalorraquídeo. Los niveles de melatonina son altos por la noche y bajos durante el día (Falcón et al. 1994).

En los peces vivíparos, como son los Goodeinos, se ha detectado que la amplitud del fotoperiodo modifica los procesos fisiológicos (Rueda-Jasso y Ayala-Bailón 2007, Pita-Zamudio 2011, Jeronimo-Granados 2012). No obstante, se desconoce la presencia y funcionamiento de la melatonina, así como la presencia de ritmos endógenos. Dado que la melatonina es la hormona principal de cronometraje, la cual influye directamente en las funciones fisiológicas de los organismos (crecimiento y reproducción) es esencial conocer los aspectos básicos de su funcionamiento y producción, para que a través de esta información se pueda ampliar la comprensión de la fisiología de los peces Goodeinos. Lo anterior permitirá profundizar la información sobre los procesos fisiológicos que son el eje del funcionamiento del organismo.

El objetivo de este trabajo fue aplicar la técnica de extracción que se adaptó para *S. multipunctata* y cuantificar la melatonina producida por el complejo pineal para tener los niveles basales. Se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las muestras de día y noche.

### **7.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **7.3.1 Obtención del material biológico**

Para la realización de los experimentos, las crías de *S. multipunctata* se obtuvieron a partir de los reproductores que forman parte del “Programa de Conservación, Preservación y Manejo de Goodeidos Mexicanos” y que se encuentran en el laboratorio de Acuicultura. Estos peces fueron inicialmente colectados en la Presa La Luz en Jacona coordenadas 19° 57’ 22.2’ N y 102° 19’ 39 .3’ W, Michoacán.

#### **7.3.2 Diseño experimental**

Juveniles de *S. multipunctata* de aproximadamente 4 meses de edad se sometieron a un fotoperiodo 12L:12O para determinar los niveles de basales de

melatonina de origen pineal y obtener así una curva tipo en condiciones de luz y obscuridad en un ciclo de 24h.

### **7.3.3 Condiciones experimentales**

El experimento se realizó en un área aislada con control de iluminación y temperatura. Los recipientes de cultivo fueron recipientes rectangulares de polietileno de alta densidad de 75x50x45 cm largo, ancho y profundidad. La luz fue abastecida con dos lámparas de luz de día de 1.15 m de largo con una potencia de 120 watts c/u con una separación de 50 cm, a una distancia promedio 70 cm sobre la superficie del agua. Los recipientes de cultivo se colocaron de forma tal, que la cantidad de luz estuviera homogéneamente distribuida. La intensidad de luz se midió (iluminómetro Fisher Scientific mod-06-662-63, China) para evaluar un abastecimiento constante de la cantidad de luz y en caso de una disminución de la intensidad mayor a 20% se cambiaron las lámparas. Se utilizó una temperatura de 25°C (de acuerdo a resultados previos no publicados), para ello se utilizaron calentadores de titanio (AZOO). El agua usada para la manutención aclimatación y el experimento fue agua de la llave, la cual se filtro (50 um) y se mantuvo almacenada con aireación constante para eliminar el cloro residual.

Los peces se aclimataron a las condiciones de fotoperiodo por tres semanas. La luz se encendió a las 8 am y se apagó a las 8pm. Los peces se alimentaron a saciedad diariamente con hojuela balanceada (Wadley, México) en horario matutino y vespertino (9 am y 18 pm). Se utilizaron organismos juveniles con sexos mezclados y con biometrías similares. Los organismos se pesaron en húmedo (1.228 g  $\pm$ 0.39) (Balanza analítica Ohaus, 0.000 mg, China), se midieron en longitud estándar (3.38 cm  $\pm$ 0.47) (LS) (vernier digital Stainless Hardened mod-06-664, China) y se seleccionaron los individuos con pesos y tallas similares.

Cada 12 horas (12 y 24 h) se realizó el muestreo de 30 peces, los cuales se anestesiaron y sacrificaron mediante una sobredosis de anestesia (Fig. 10). Con el fin de evitar la mezcla de melatonina ocular, a cada organismo se le extirparon los ojos, esto se llevaron a cabo cortando la conjuntiva para levantar el ojo y cortando

el nervio óptico. Las muestras se colocaron en un recipiente de nitrógeno líquido para su congelación, posteriormente se pasaron a un ultracongelador a una temperatura de -70°C donde se guardaron hasta ser procesadas. Las muestras se analizaron de acuerdo a una adaptación de la técnica de “Study of Biological Action of Light on Fish” (Franke et al. 2013).

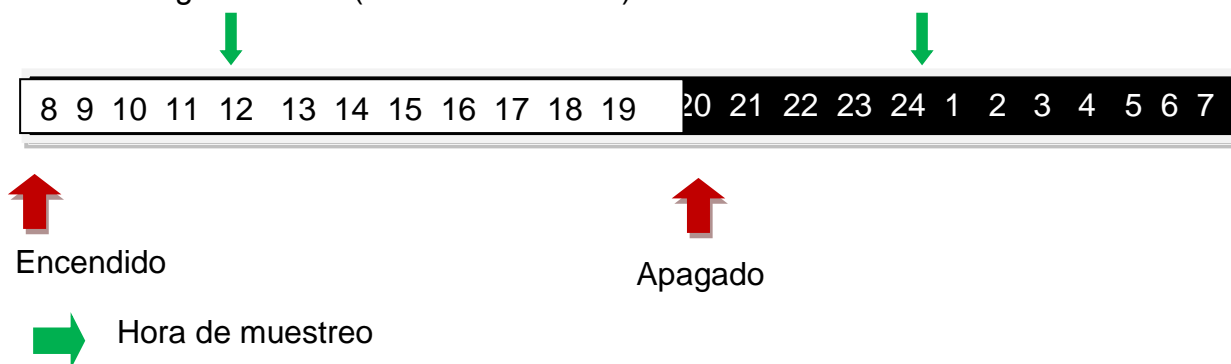


Figura 10. Diseño experimental para la toma de muestras (organismos) durante 24 h.

#### 7.3.4 Adaptación de la técnica de Franke S. et al. 2013

Las muestras (cuerpos completos sin ojos) se homogenizaron en ULTRATURRAX a una velocidad 3, con 2.5 mL de Buffer de Fosfatos y se centrifugó a 1200 xg durante 15 min. Posteriormente, las columnas del Kit ELISA se adicionaron con 1 mL de metanol y se centrifugaron (120 xg durante 1 min), luego se agregó 1 mL de agua bidestilada y nuevamente se centrifugó (a 120 xg durante 1 min) .A continuación se agrego 1mL de muestra de la muestra y se centrifugó (120 xg durante 1 min). Para la elución de la muestra se utilizó 1 mL de Acetato de Etilo, por último se centrifugó durante 5 min a 120 xg.

La muestra extraída se evaporó en Centrivap Concentrator (LABCONCO) a una temperatura de 30°C durante 180 min. Para reconstituir la muestra se utilizó 1700 ul de Buffer de Fosfatos y se agitó en el vórtex durante 1 min. Las muestras fueron analizadas en un Kit ELISA.

Los sueros obtenidos después de la reconstitución se analizaron mediante un kit ELISA (IBL, Hamburgo, Alemania) (Fig. 11). Todas las muestras se analizaron por

*Descripción histológica y funcional del complejo pineal del pez vivíparo Skiffia multipunctata (Pellegrin, 1901)*

triplicado para minimizar errores de pipeteo. Los resultados del espectrofotómetro fueron analizados en la página web <http://www.myassays.com> mediante el logaritmo 5 PL ( $1/y^2$ ) donde se obtuvo una curva estándar con controles, muestras y estándares incluidos (tabla 2).

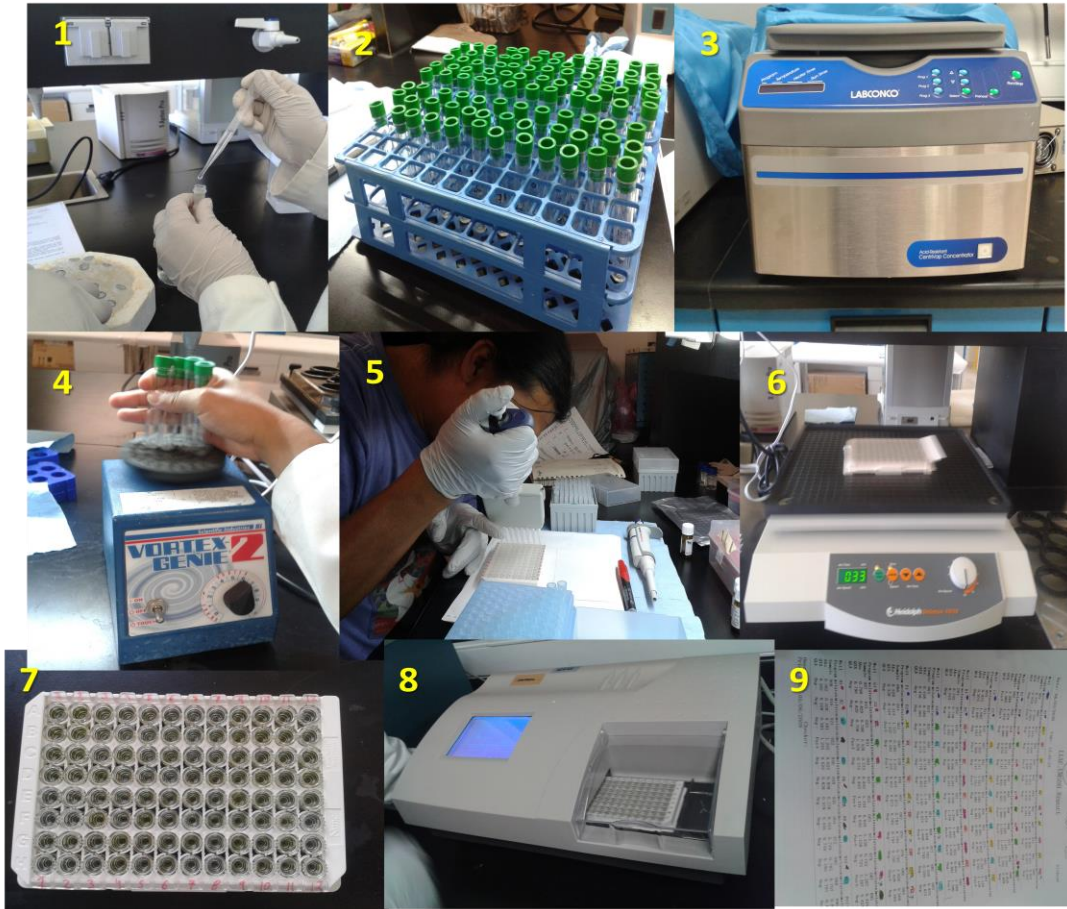


Figura 11. Técnica ELISA en diferentes tiempos.

## 7.4 RESULTADOS

Con ésta técnica se obtuvieron niveles de melatonina de 54.1 pg/mL  $\pm$ 7.4 y 24.1 pg/mL  $\pm$ 5.8 durante la noche y el día respectivamente (Tabla 3). Los resultados fueron estadísticamente significativos usando el ANDEVA y el análisis de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ )



Figura 12.. Curva estándar del Kit ELISA. Los puntos rojos representan los datos obtenidos de los estándares, los puntos azules muestran los controles (estándares y controles son dados por el Kit de melatonina IBL); y los datos en color verde son las muestras analizadas de *S. multipunctata*.

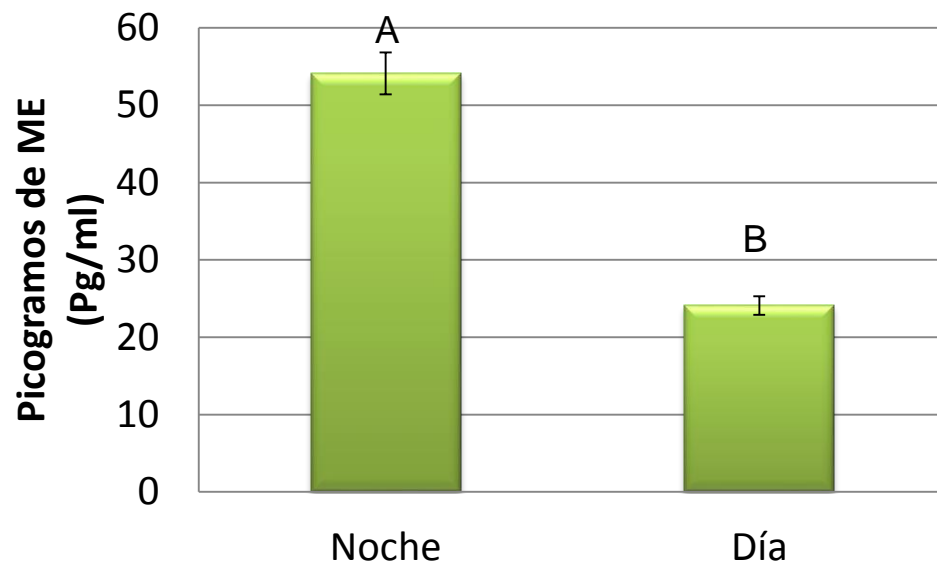


Figura 13. Melatonina producida por *S. multipunctata* de noche y de día. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas (ANDEVA y análisis de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ )).

## 7.5 DISCUSION

En vertebrados, la melatonina es la principal hormona que sincroniza los ciclos biológicos, esta se produce en la glándula pineal durante periodos de oscuridad (Simonneaux y Ribelayga, 2003). En este experimento con *S. multipunctata* se encontró un nivel más alto de melatonina circulante durante la noche que durante el día. Algo similar ocurre con el salvelino (*Salvelinus alpinus*), que es un pez de agua dulce del norte, que vive en hábitats con variaciones extremas tanto en la duración del día como de temperatura (Strand et al. 2008), las mismas diferencias se observaron en el salmón del atlántico, trucha y lubina (Migaud et al. 2007; Falcón. 2007; Ceinos et al. 2008).

En los peces en su hábitat natural, los cambios estacionales en la duración del día están acompañados por fluctuaciones en la temperatura del agua (Vera et al., 2007). Una interesante prueba complementaria a este trabajo sería realizar un

experimento con condiciones naturales de *S. multipunctata* para determinar los niveles basales en un fotoperíodo natural.

Cabe señalar que la técnica que se determinó como la más adecuada para el análisis de melatonina en esta especie fue realizada con un kit ELISA y generó resultados en los que se aprecia la presencia de melatonina. Sin embargo, se sugiere realizar más pruebas con otras técnicas, por ejemplo, técnicas de HPLC para comparar los niveles de melatonina con los de ELISA y corroborar los resultados obtenidos en este experimento.

Este trabajo es un estudio preliminar de los ritmos de melatonina en peces vivíparos, se sugiere continuar con análisis de la melatonina bajo diferentes condiciones para determinar el modelo de percepción fótica al que pertenece esta especie y para determinar si existe o no un reloj endógeno que controle la producción de esta hormona. Todo esto con la finalidad de tener una mejor comprensión acerca de los procesos fisiológicos de esta especie y tener panorama más amplio sobre la percepción fótica de peces vivíparos. Dado que estudios de este tipo son pioneros en peces vivíparos y en especial en peces Goodeinos, la información generada sienta las bases para futuros estudios.

## VIII. DISCUSIÓN GENERAL

El presente trabajo se enfocó al estudio del complejo pineal del pez vivíparo *Skiffia multipunctata*; para ello se realizó un trabajo histológico para conocer su anatomía. Los resultados obtenidos nos muestran la histología general y morfología del complejo pineal de esta especie. De manera tal que se pudo identificar al complejo pineal conectado al cerebro por un largo tallo, el cual a su vez se conecta directamente al tercer ventrículo.

En algunos peces se puede observar un órgano pineal y parapineal, el cual en algunas especies desaparece en edades adultas. En el caso de *S. multipunctata* no se observó el órgano parapineal, lo cual pueda deberse a que está presente en etapas embriológicas de desarrollo, pero desaparece en peces adultos.

La ventana pineal de esta especie es transparente sin cartílago, cubierta por una capa de hueso muy delgado y una capa de piel delgada que tiene pocos pigmentos dispersos o carece de ellos. Esta cumple la función de percibir la luz, lo que permite al organismo a sincronizarse con el medio ambiente para tener una percepción de tiempo. Esta información es necesaria para promover la función de los ciclos circadianos y para estimular la producción de melatonina.

Asimismo, se observó una vesícula pineal pequeña, ubicada bajo la ventana pineal, pero un poco más a la izquierda. Esta se encuentra unida a la ventana pineal translúcida. Se identificaron tres diferentes tipos de células las cuales fueron reconocidas en la vesícula pineal, se llegó a la conclusión que son: pinealocitos, células gliales y neuronas.

Para tener un mayor conocimiento acerca del complejo pineal y de la producción de melatonina, fue necesario realizar una búsqueda entre las técnicas de extracción de esta hormona, debido a que la mayoría de las técnicas son usadas en plasma, saliva o tejido. No obstante, *S. multipunctata* es una especie de tamaño pequeño y es difícil extraer plasma, por lo que fue necesario utilizar el

cuerpo de pez completo para la extracción de un suero el cual pudiera ser utilizado para medir la hormona. Se utilizaron seis diferentes técnicas de extracción, acondicionando tiempos de centrifugado, evaporación, temperatura, etc. debido a que no existe información publicada para esta especie en extracción de melatonina. Finalmente, se logró ajustar el método de extracción adecuado para esta especie, con diversas modificaciones que van desde el tipo de solvente y su cantidad, hasta la velocidad y tiempos de centrifugado, así como la temperatura de secado. La técnica que se adaptó mejor a esta especie fue la modificación de Franke et al. (2013) en la que se utilizó acetato de etilo para extraer la hormona.

Los niveles de melatonina no presentan mucha variación en vertebrados. En *S. multipunctata* se obtuvieron diferencias significativas entre las muestras de día y noche, niveles más altos durante la noche y más bajos durante el día. Lo cual concuerda con lo propuesto por trabajos previos con otros peces.

Con este estudio se logró tener un primer acercamiento a la estructura tisular del complejo pineal y sus componentes de la especie vivípara *S. multipunctata*. Este es un estudio preliminar de los ritmos de melatonina en peces vivíparos, se sugiere continuar con análisis de la melatonina bajo diferentes condiciones para determinar el modelo de percepción fótica al que pertenece esta especie y para determinar si existe o no un reloj endógeno que controle la producción de esta hormona. Todo esto con la finalidad de tener una mejor comprensión acerca de los procesos fisiológicos de esta especie y tener un amplio panorama acerca de la percepción fótica de peces vivíparos. Esta información es de gran relevancia, ya que para los peces Goodeinos no existen antecedentes al respecto y por tanto el conocimiento generado sienta las bases para futuros estudios.

## **IX. CONCLUSION**

Los resultados de esta investigación muestran la histología general y morfología del complejo pineal de esta especie en la cual se identifica la vesícula pineal, el tallo pineal y saco dorsal. La técnica que se adaptó mejor a *S. multipunctata* fue la modificación de Franke et al. (2013) en la que se utilizó acetato de etilo para extraer la hormona. Se obtuvieron diferencias significativas entre las muestras de día y noche, niveles más altos durante la noche y más bajos durante el día. Lo cual concuerda con lo propuesto por trabajos previos.

## **X. REFERENCIAS**

Ariëns Kappers, J. 1965. Survey of the innervations of the epiphysis cerebri and the accessory pineal organs of vertebrates. *Progress in Brain Research* 10, 87–153. doi:10.1016/S0079-6123(08)63448-2.

Bayarri, M.J., Rol de Lama, M.A., Madrid, J.A., Sanchez-Vazquez, F.J., 2003. Both pineal and lateral eyes are needed to sustain daily circulating melatonin rhythms in sea bass. *Brain Res.* 969, 175-182.

Bechgaard, E., Lindhardt, K., Martinsen, L. 1998. High-performance liquid chromatographic analysis of melatonin in human plasma and rabbit serum with on-line column enrichment. *J Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 712, 177-181.

Boeuf, G., Le Bail, P-Y. 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* 177, 129-152.

Boeuf, G., Falcón, J., 2001. Photoperiod and Growth in Fish. *Vie Et Milieu- Life and Environment* 51, 247-266. Bolliet, V., Ali, M.A., Lapointe, F.J., Falcón, J., 1996. Rhythmic Melatonin Secretion in Different Teleost Species: an in vitro Study. *J. Comp. Physiol. B* 165, 677-683.

Bolliet, V., Ali; M. A., Lapointe, F.J., Falcon, J., 1996. Rhythmic melatonin secretion in different teleost species: an in vitro study. *J. Comp. Physiol., B.* 15, 677-683.

Bradshaw, W. y Holzapfel, C., 2007. Evolution: Tantalizing timeless. *Science* 29, 1851- 1852.

Bromage N., Poter M., Randal, C. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed fishing with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197, 63-98

Bubenik, G.A., Pang, S.F. 1997. Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians, and a reptile. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 415-419.

Bubenik, G. A. 2002. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2336-2348.

Cahill, G. 2002. Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.* 309, 27-34.

Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., Abreu, P., Lardone, P. J., García-Maurino, S., Reiter, R., Guerrero, J. M. 2004. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: posible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 18, 537-539.

Ceinos, R.M., Polakof, S., Illamola, A.R., Soengas, J.L., Míguez, J.M. 2008. Food deprivation and refeeding effects on pineal indoles metabolism and melatonin synthesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 410-417.

Champier, J., Claustrat, B., Besancon, R., Eymin, C., Killer, C., Jouvet, A., Chamba, G., Fevre-Montage, M. 1997. Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sci.* 60, 2191-197.

Chattoraj, A., Seth, M., Maitra, S.K., 2008. Influence of serotonin on the action of melatonin in MIH-induced meiotic resumption in the oocytes of carp *Catla catla*. *Comp. Biochem. Physiol A* 150, 301-306.

Chegini, S., Ehrhart-Hofmann, B., Kaider, A., Waldhauser, F. 1995. Direct enzyme-linked immunosorbent assay and a radioimmunoassay for melatonin compared. *Clin Chem.* 41, 381-386.

Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markowka, M., Maestroni, J. M. 2000. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 28, 193-202.

Coon, S.L., Begay, V., Deurloo, D., Falcón, J., Klein, D.C., 1999. Two Arylalkylamine N-Acetyltransferase Genes Mediate Melatonin Synthesis in Fish. J. Biol. Chem. 274, 9076-9082.

Coon, S.L., Klein, D.C., 2006. Evolution of Arylalkylamine N-Acetyltransferase: Emergence and Divergence. Mol. Cell. Endocrinol. 252, 2-10.

Coon, S.L., Klein, D.C., Falcón, J., Ron, B., Gothilf, Y. 2007. Transcriptional Regulation of Arylalkylamine-N-Acetyltransferase-2 Gene in the Pineal Gland of the Gilthead Seabream. J. Neuroendocrinol. 19, 46 – 53.

Degen, P. H., DoAmaral, J. R., Barchas, J. D. 1972. A gas-liquid chromatographic assay of melatonin and indoleamines using heptafluorobutyryl derivatives. Anal. Biochem. 45, 634-644.

Di, W. L., Kadva, A., Djahanbakhch, O., Silman, R. 1998. Radioimmunoassay of melatonin in plasma. Clin Chem. 44, 304-3010.

Domínguez, S.H. 1999. Contribución al estudio de los peces de la familia Goodeidae de Michoacán. Tesis de Licenciatura Facultad de Biología, UMSNH. Morelia, Mich. 1-17.

Domínguez-Domínguez O. y Pérez Ponce de León G. 2007. Los Goodeidos peces endémicos del centro de México. Biodiversitas 75.12-15.

Domínguez, D. O. 2008. Filogeografía de *Zoogoneticus quitzeoensis*, *Xenotocavariata* y *Alloophorus robustos* (Cyprinodontiformes: Goodeidae) en el Centro de México: implicaciones taxonómicas y de conservación. Tesis de doctorado. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 241.

Dun-Xian, T., Zanghi, B. M., Manchester L. C., Russel, J. R. 2014. Melatonin identified in meats and other food stuffs: potentially nutritional impact. J Pineal Res. 57:213-218.

Duston, J. y N. Bromage. 1991. Circannual rhythms of gonadal maturation in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Biol. Rhythms* 6, 49–53.

Ekström, P., Meissl H. 1997. The pineal organ of fishes. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 7: 199-284.

Ekström, P., & Meissl, H. 2010. Pineal photoreception and temporal physiology in fish. *Biological clock in fish*. Science Publishers, 35-70.

Falcon, J. 1979. The pineal body Pike (*Esox lucius*, L.). II. Study in microscopic Electronique of differentiation and partial rudimentation of photoreceptors; the possible consequences of elaboration photo sensoriels messages. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 19: 661-688.

Falcon, J. y Collin, J. P. 1991. Pineal-retinal relationships: rhythmic biosynthesis and immunocytochemical localization of melatonin in the retina of the pike (*Esox lucius* L.). *Cell Tissue Res.* 265, 601-609.

Falcón J., Bolliet V., Ravault J.P., Chesneau D., Ali M.A., Collin J.P 1994. Rhythmic secretion of melatonin by the superfused pike pineal organ: thermo- and photoperiod interaction. *Neuroendocrinology* 60, 535–543.

Falcón, J., Galarnau, K.M., Weller, J.L., Ron, B., Chen, G., Coon, S.L., Klein, D.C. 2000. Regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase-2 (AANAT2, EC 2.3.1.87) in the fish pineal organ: Evidence for a role of proteasomal proteolysis. *Endocrinol.* 142, 1804-911 1813.

Falcón, J., Henderson R.J. 2001. Incorporation, distribution, and metabolism of polyunsaturated fatty acids in the pineal gland of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vitro. *Journal of Pineal Research* 31: 127–137.

Falcón J., Besseau L., Fazzari D., Attia J., Gaildrat P., Beauchaud M., G. Boeuf. 2003. Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinology* 144 (10), 46-48.

Falcón J., Besseau L., Sauzet S., Boeuf.G. 2007. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 81–88.

Falcón J., Migaud H., Muños J., M. Carrillo. 2009. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2-8.

Falcón, J., L. Besseau, M. Fuentès, S. Sauzet, E. Magnanou, G. Boeuf. 2009. Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1163: 101–111.

Ferrua, B., Masseyeff, R. 1985. Immunoassay of melatonin with enzyme-labeled antibodies. *J Immunoassay* 6, 9-94.

Fraser, S., Cowen, P., Franklin, M., Franey, C., Arendt, J. 1983. Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. *Clin Chem.* 29, 396-397.

Grace, M.S., Cahill, G.M., Besharse, J.C. 1991. Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Res.* 559, 56-63.

Grota, L. J., Snieckus, V. de Silva, S. O., Brown, G. M. 1981. Radioimmunoassay of melatonin in rat serum. *Prog. Neuropsychopharmacol* 5, 523-526.

Gwinner, E., 1986. *Circannual Rhythms*, Springer-Verlag, Heidelberg. Berlin, 154 pp.

Hafeez, M. A. 1971. Light microscopic studies on the pineal organ in teleost fishes with special regard to its function. *Journal of Morphology* 134, 281–313. doi:10.1002/jmor.1051340304

Hardeland, R. 2009. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* 35, 183-192.

Hardeland, R., Tan, D. X., Reiter, R. J. (2009). Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 47, 109-116.

Harumi, T., Akatsu, H., Matsushima, S. 1996. Simultaneous determination of serotonin, N-acetylserotonin and melatonin in the pineal gland of the juvenile golden hamster by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr. B Biomed. Appl.* 675, 152-156.

Harumi, T., Matsushima, S. 2000. Separation and assay methods for melatonin and its precursors. *J Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 747, 95-110.

Herrera-Pérez, P., Servili, A., Rendón, M. C., Sánchez-Vázquez, F. J., Falcón, J. & Muñoz Cueto, J. A. 2011. The pineal complex of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): I. Histological, immunohistochemical and qPCR study. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 41, 170–180. doi: 10.1016/j.jchemneu.2011.01.006

Iigo M, Fugimoto Y, Gunji-Susuky M, Yokosuka M, Hara M, Ohtani-Kaneko R, Tabata M, Aida K. 2004. Circadian rhythm of melatonin release from the photoreceptive pineal organ of a teleost, ayu (*Plecoglossus altivelis*) in flow-through culture. *J. Neuroendocrinol.* 16:45-51.

Hamasaki, D. I. and Eder, D. J. 1977 Adaptive radiation of the pineal system. In: *Handbook of Sensory Physiology, Vol. VII/5. The Visual System in Vertebrates*, pp. 497±548. Ed. F. Crescitelli. Springer verlag, Berlin.

Iuvone PM, Tosin G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia S.S. 2005. Circadian clocks, clock the pineal organ of salmonid teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.* 154:91-97.

Martínez-Chávez C. C., Al-Khamees S., Campos-Mendoza A., Penman D. J. Y H. Migaud 2008. Clock-controlled endogenous melatonin rhythms in Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 25 (1): 31-34

Jelks H.L., Burkhead N.M., Balderas S. C., Díaz-Pardo E., Hendrickson, D.A., Lyons J., Madrak N.E., McCormick F., Nelson J.S., Platania S.P. Porter B.A., Renaud C.B., Schmitter-Soto J.J., Taylor E.B., M.L. Warren. 2008. Conservation status of imperiled North American Freshwater and diadromous. *Fishes Fisheries* 33 (8), 424.

Jeronimo G.Z.M. 2012. Efecto del Fotoperiodo de Verano y tres temperaturas en crecimiento y éxito reproductivo de *Skiffia multipunctata* (Pellegrin 1901). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 42pp.

Kappers, J. A. y Schade, J. P. (ed.) 1965. *Structure and Function of the Epiphysis Cerebri*. New York: Elsevier Publishing Company

Klein, D. C., Coon, S.L., Roseboom, P.H., Weller, J.L., Bernard, M., Gastel, J.A., Zatz, M., Iuvone, P.M., Rodriguez, I.R., Begay, V., Falcón, J., Cahill, G.M., Cassone, V.M., Baler, R. 1997. The Melatonin Rhythm-Generating Enzyme: Molecular Regulation of Serotonin N-Acetyltransferase in the Pineal Gland. *Recent Program in Hormone Research* 52, 307-356.

Lagana, A., Pardo-Martinez, B., Marino, A., Fago, G., Bizzarri, M. 1995. Determination of serum total lipid and free N-acetylneuraminic acid in genitourinary malignancies by fluorimetric high performance liquid chromatography. Relevance of free N-acetylneuraminic acid as tumour marker. *Clin Chim acta* 243, 165-179.

Liu, C., Fukuhara, C., Wessel, J. H., III, Iuvone, P. M., Tosini, G. 2004. Localizatio of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ applications. *Anal. Chim. Acta* 455, 193.

Lombardi J. y J.P. Wourms 1985. The trophotaenia placenta of a viviparous goodeid fish. L Ultrastructure of the internal ovarian epithelium, the maternal component J. Morphol 184, 277-292.

Matoyama, A., Kanda, T., Namba, R. 2004. Direct determination of endogenous melatonin in human saliva by column-switching semi-microcolumn liquid chromatography/mass spectrometry with on-line analyte enrichment. Rapid Commun Mass Spectrom. 18, 1250-258.

Migaud, H., Taylor, J. F., Taranger, G. L., Davie, A., Cerda-Revert, J. M., Carrillo, M., Hansen, T. y Bromage, N. R. 2006. A comparative ex vivo and in vivo study of day and night perception in teleost species using the melatonin rhythm. Journal of Pineal Research 41, 42-52.

Migaud, H., Davie, A., Martinez Chavez, C.C. 2007. Differential photic regulation of pineal melatonin synthesis in Teleosts. 43, 327-335.

Nelson J. S. 2006. Fishes of the world. John Wiley and Sons, Inc. New York. 4<sup>th</sup> Ed. 601 p.

Paul, M.J., Zucker, I., Schwartz, W.J. 2008. Tracking the seasons: the internal calendar of vertebrates. Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B 363, 341-361.

Pita Z. M.V. 2011. Efecto de tres temperaturas y dos fotoperiodos en crecimiento y éxito reproductivo de *Xenotoca eiseni* (Ruter 1896) Tesis de Maestría Facultad de Biología Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 55.

Porter, M.J.R., Duncan, N.J., Mitchell, D., Bromage, N.R., 1998. The use of cage lighting to reduce plasma melatonin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its effects on the inhibition of grilising. Aquaculture 176, 237-244.

Rueda-Jasso, R.A. y J.M Ayala-Bailon. 2007. Efecto del fotoperiodo en el crecimiento del pez endémico mexicano (*Xenotoca eiseni*). Memorias en extenso

VI Congreso Internacional y XII Nacional de Ciencias Ambientales. UACH; ANCA (6 – 8 junio). Chihuahua, Chihuahua.

Rizzo, V., Porta, C., Moroni, M., Scoglio, E., Moratti, R. 2002 Determination of free and total (free plus protein-bound) melatonin in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 774, 17-24.

Rolcik, J., Lenobel, R., Siglerova, V., Strnad, M. 2002. Isolation of melatonin by immunoaffinity chromatography. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 775, 9-15.

Sauzet, S., Besseau, L., Herrera Perez P., Covès D., Chatain B., Peyric E., Boeuf G., Muñoz- Cueto J.A., Falcón, J. 2008. Cloning and retinal expression of melatonin receptors in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. 157, 186-195.

Sébert, M.E., Legros, C., Weltzien, F.A., Malpoux, B., Chemineau. P., Dufour, S. 2008. Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. *J. Neuroendocrinol.* 20, 917-929.

Sieghart, W., Ronca, E., Drexler G., Karall, S. 1987. Improved radioimmunoassay of melatonin in rats, sheep, and humans. *Clin chem.* 45, 690-692.

Simonneaux V. y C. Ribelayga. 2003 Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 55, 325–395.

Simonneaux V, Ribelayga C. 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 55:325-395.

Slater, C.H., Schreck, C.B.1998. Season and physiological parameters modulate salmonid leucocyte androgen receptor affinity and abundance. Fish Shellfish Immunol. 8,379-91.

Slominski, A., Fischer, T. W., Zmijewski, M. A., Wortsman, J., Semak, I., Zbytek, B., Slominski, R. M., Tobin, D. J. 2005. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. Endocrine. 27, 137-148.

Spieler, R. E., Circadian timing of meal feeding and growth in fishes 2001. Fisheries Science, 9:115-131.

Srinivasan, V., Maestroni, G. J. M., Cardinali, D. P., Esquifino, A. I., Perumal, S. P., & Miller, S. C. (2005). Melatonin, immune function and aging. Immunity & Ageing, 2(1), 17.

Steffen, F., Anika, B., Franz H., Werner K. 2013. Study of Biological Action of Light on Fish. J Light & Vis. Env. Vol. No. 4, 194:52-2.

Takahashi, H., & Kasuga, S. 1971. Fine structure of the pineal organ of the medaka, *Oryzias latipes*. Bulletin of the faculty of fisheries hokkaido university, 22(1), 1-9.

Taylor, J.F., Migaud, H., Porter, M.J.R., Bromage, N.R. 2005. Photoperiod influences growth rate and plasma insulin-like growth factor-I levels in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 142, 169-185.

Tricoire, H, Locatelli, A, Chemineau, P, Malpoux, B., 2002. Melatonin enters cerebrospinal fluid through the pineal recess. Endocrinology 143, 84-90.

Tomita, T., Hamase, K., Hayashi, H., Fukuda, H., Hirano, J., Zaitso, K. 2003. Determination of endogenous melatonin in the individual pineal glands of inbred mice using precolumn oxidation reversed-phase micro-high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 316, 154-161.

Uribe M.C., De la Rosa-Cruz G, Guerrero S.M., Garda-Alarcon. y M.E. Aguilar 2004. Estructura del ovario de teleósteos vivíparos. Gestación intraovarica: intraluminal en *Ilyodon whitei* (Goodeidae), e intrafolicular en *Poeciliopsis gracilis* (Poeciliidae). En: Lozano Vilano ML, Contreras Balderas A.J. (Eds.)UANL México, 31-45.

Vallone, D., Lahiri, K., Dickmeis, T., Foulkes, N.S.2005.Zebrafish Cell Clocks Feel theHeat and See the Light! Zebrafish 2, 171-187.

Vitale, A. A., Ferrari, C. c., Aldana, H., Affanni, J. M. 1996. Highly sensitive method for the determination of melatonin by normal-phase high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. J Cromatogr. B biomed. Appl. 681, 381-3384.

Vollrath, L. 1981.The Pineal Organ, VI/7, pp. 1±665.Springer Verlag, Berlin.

Vera, L.M., De Pedro, N., Gómez-Milán, E., Delgado, M.J., Sánchez-Muros, M.J.,Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J., 2007. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. Physiol. Behav. 90, 518–524.

Vuilleumier R., Boeuf G., Fuentes M., Gehring W.J., Falcón J.2007.Cloning and early expression pattern of two melatonin biosynthesis enzymes in the turbot (*Scophthalmus maximus*).European J. Neurosc. 25, 3047-3057.

Yamada, H., Swaab, D. F. 2005. The human pieal gland and melatonin in agig and Alzheimer´s disease. J Pineal Res 38, 145-152.

Yanez, J.H. y Messli, H. 1996.Secretion of the metoxyindolamines melatonin.5-metoxytriptohol, 5-metoxyindoleacetic acid, and 5-metoxytriptamine from trout pineal organs in superfusion culture: effect of light intensity. General and comparative Endrocrinology 101, 15-12.

Yang, S., Zheng, X., Xu, Y., Zhou, X., 2002. Rapid determination of serum melatonin by ESI-MS\_Ms with direct sample injection. J Pharm. Biomed. Anal. 30, 78-790.

Zachmann A., Falcón J. y S.C.M. Knijff. 1992. Effects of photoperiod and temperature on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*) in vitro. Gen. Comp. Endocrinolgy.86, 26–33.

Zapata, A.G., Varas, V.1992.Torroba M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. Immunol. Today 13,142-7.

Zilberman-Peled, B., Appelbaum L., Vallone D., Foulkes N.S., Anava S., Anzulovich, A., Coon, S.L., Klein, D.C., Falcón, J., Ron, B., Gothilf, Y.2007. Transcriptional Regulation of Arylalkylamine-N-Acetyltransferase-2 Gene in the Pineal Gland of the Gilthead Seabream. J. Neuroendocrinol. 19, 46 – 53.

Ziv, L., Levkovitz, S., Toyama, R., Falcón, J., Gothilf Y.2005. Functional development of the zebrafish pineal gland: light-induced expression of period is required for onset of the circadian clock, J. Neuroendocrinol. 17, 314–320