

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Desarrollo y evaluación *in vitro* de un implante
hormonal de liberación prolongada para la inducción
del desove en peces**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Melanie Verónica Estrada Martínez

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Melanie Verónica Estrada Martínez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña



Dr. Roberto Cruz Flores

Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Pedro Negrete Regagnon

Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta Melanie Verónica Estrada Martínez requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Desarrollo y evaluación *in vitro* de un implante hormonal de liberación prolongada para la inducción del desove en peces

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

La acuicultura de peces marinos es una actividad productiva que ha adquirido gran importancia durante las últimas décadas; sin embargo, su desarrollo enfrenta diversas problemáticas. Dentro de las más importantes se encuentran las alteraciones en la reproducción durante el cautiverio, sobre todo en las hembras. Para resolver estos problemas, desde hace varias décadas se ha recurrido al uso de terapias hormonales en diversas especies. En la actualidad se utilizan análogos de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRHa) dado su resistencia a la degradación enzimática en comparación con la GnRH nativa. Sin embargo, aunque existen implantes para la liberación de GnRHa en peces, estos no son útiles para todas las especies de importancia comercial y los protocolos de preparación no son claros para su replicación en campo, lo que hace necesario el desarrollo de nuevos protocolos claramente descritos. El presente estudio tuvo como objetivo describir y comparar el perfil de liberación de GnRHa de implantes preparados con diferentes excipientes en pruebas *in vitro*: 1) colesterol-celulosa; 2) alginato- metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA) y 3) etilvinilacetato (EVAc). Para la elección de los implantes a probar en la liberación de GnRHa se elaboraron implantes con diferentes excipientes y se describió el perfil de liberación de albúmina de suero bovino (BSA) como proteína modelo. Todos los implantes estudiados mostraron una liberación tipo estallido que se presentó en diferentes tiempos. Por esta razón se eligieron los implantes que iniciaron la liberación después de 6 h y liberaron por un periodo más prolongado. Para los implantes de alginato adicionalmente se probaron diferentes recubrimientos: 1) 2-hidroxietilo de metacrilato (HEMA)- PEGMA y 2) EVAc; ambos recubrimientos redujeron significativamente ($p < 0.01$) el grado de hinchamiento de los implantes al compararlos con implantes sin cobertura. Se evaluó la liberación de GnRHa a partir de diferentes implantes: 1) 95% colesterol m/m, 5% celulosa m/m; 2) 1.5% alginato de sodio m/v-PEGMA v/v cubierto con EVAc m/m-inulina m/m, y 3) EVAc m/m. La cuantificación de las proteínas liberadas se hizo con el método del ácido bicinonínico (BCA). No se encontraron diferencias significativas en la magnitud de liberación tipo estallido entre los implantes de alginato y los de colesterol-celulosa, sin embargo, esta liberación se registró a las 6 y 48 h, respectivamente. El porcentaje acumulado liberado fue significativamente mayor (62.1%, $p = 0.003$) en los implantes de alginato. Los implantes de colesterol liberaron por 192 h, mientras que los de alginato liberaron por 72 h. La cuantificación de GnRHa liberada de los implantes de EVAc no fue precisa debido a que el método no era específico para GnRHa, sin embargo, se detectaron las proteínas liberadas hasta las 336 h después del inicio del ensayo. Finalmente, los implantes de 95% colesterol y EVAc resultaron con perfiles de liberación de GnRHa más prolongados comparados con el perfil de liberación de implantes de alginato, sin embargo, dado el potencial del alginato como excipiente, es conveniente continuar su evaluación incorporando otros componentes y coberturas para retrasar la liberación de compuestos activos.

Palabras clave: reproducción, peces, GnRHa, colesterol, alginato, EVAc

Abstract of the thesis presented by Melanie Verónica Estrada Martínez as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Development and in vitro evaluation of a prolonged release hormonal implant for the induction of spawning in fish

Abstract approved by:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Thesis Director

Marine fish aquaculture is a productive activity that has acquired great importance during the last decades; however, its development faces several problems. Among the most important are reproductive alterations during captivity, especially in females. To solve these problems, hormonal therapies have been applied for several decades in various species. Currently, gonadotropin-releasing hormone analogues (GnRHa) are used because of their resistance to enzymatic degradation compared to native GnRH. However, although implants for GnRHa release in fish exist, they are not useful for all commercially important species and preparation protocols are not clear for field replication, what makes it necessary the development of new clearly described protocols. The present study aimed to describe and compare the GnRHa release profile of implants prepared with different excipients in in vitro tests: 1) cholesterol-cellulose; 2) alginate-polyethylene glycol methacrylate ether (PEGMA) and 3) ethylene vinyl acetate (EVAc). For the choice of implants to be tested on GnRHa release, implants with different excipients were prepared and the release profile of bovine serum albumin (BSA) as a model protein was described. All the implants studied showed a burst-like release occurring at different times. For this reason, the implants that initiated release after 6 h and released for a longer period were chosen. For the alginate implants additionally, different coatings were tested: 1) 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)- PEGMA and 2) EVAc; both coatings significantly ($p < 0.01$) reduced the degree of implant swelling when compared to uncoated implants. GnRHa release from different implants was evaluated: 1) 95% cholesterol m/m, 5% cellulose m/m; 2) 1.5% sodium alginate m/v-PEGMA v/v coated with EVAc m/m-inulin m/m, and 3) EVAc m/m. Quantification of the released proteins was done with the bicinchoninic acid (BCA) method. No significant differences were found in the magnitude of burst-type release between alginate and cholesterol-cellulose implants; however, this release was recorded at 6 and 48 h, respectively. The cumulative percentage released was significantly higher (62.1%, $p = 0.003$) in the alginate implants. Cholesterol implants released for 192 h, while alginate implants released for 72 h. Quantification of GnRHa released from EVAc implants was not accurate because the method was not specific for GnRHa, however, released proteins were detected up to 336 h after the start of the assay. Finally, 95% cholesterol and EVAc implants resulted in longer GnRHa release profiles compared to the release profile of alginate implants; however, given the potential of alginate as an excipient, it is desirable to continue its evaluation by incorporating other components and coatings to delay the release of active compounds.

Keywords: reproduction, fish, GnRHa, cholesterol, alginate, EVAc

Dedicatoria

A mi mamá

A mis hermanas, Brenda y Nadia

A mis abuelitos Demetrio y Elena

A mi tío Anselmo

A mi amor José A.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Departamento de Acuicultura por permitirme estudiar y desarrollar mi trabajo de tesis en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría con el número de apoyo 753361.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla por aceptarme como su estudiante, por ser un excelente director, por el apoyo incondicional antes y durante el desarrollo de este proyecto, por ser un excelente profesor con una dedicación envidiable, por todas las enseñanzas a lo largo de mi formación, por los consejos y palabras de aliento en todo momento. Gracias.

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez por aceptar formar parte de mi comité de tesis, por ser una profesora excelente y con gran dedicación, por el préstamo de equipos para la realización de este proyecto y por el apoyo constante.

A la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña por aceptar formar parte de mi comité de tesis, por ser de gran apoyo en la realización de este proyecto, por el entusiasmo, por la donación de reactivos y literatura para mis ensayos preliminares.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por el préstamo de materiales y reactivos que fueron utilizados en este proyecto.

Al la M. en C. Yanet Guerrero Rentería por la cotización de reactivos usados en este proyecto, por el préstamo de material y por su ayuda en el uso del criostato.

Al M. en C. Abelardo Campos Espinoza por el préstamo de reactivos y por ayudarme en la utilización del liofilizador.

A mi compañerito y novio José Alberto por su apoyo académico incondicional, por ayudarme en mis experimentos y quedarse siempre conmigo así fuera hasta la madrugada, por escucharme y abrazarme en esos días de estrés, pero sobre todo por su amor y cariño incondicional.

A Lorena por ser una gran amiga, por el apoyo que me brindó cuando lo necesité, por escucharme siempre, por todas las pláticas y risas siempre, pero sobre todo por la amistad incondicional que me diste, te quiero.

A David por brindarme siempre su amistad, por las tardes de juegos y risas y por su apoyo incondicional.

A mis buenas compañeras y amigas que tuve el gusto de conocer aquí: Erika y Brianda; gracias por esas bonitas pláticas y por las risas.

A mi familia, especialmente a mi mamá por apoyarme incondicionalmente y por todo tu amor. A mis hermanas por el apoyo y aliento que han brindado siempre, las tres son los pilares de mi vida. A mi tío Anselmo por el apoyo y cariño que siempre me ha brindado, a mis primos Clemente y Magaly por acogerme en su casa y todo su apoyo. ¡¡¡A todos ustedes muchas gracias!!!

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas	xii
 Capítulo 1. Introducción.....	 1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Endocrinología de la reproducción en peces	2
1.1.1.1 Control reproductivo en hembras.....	3
1.1.1.2 Control reproductivo en machos	3
1.1.2 Alteraciones en el proceso reproductivo de peces criados en cautiverio	4
1.1.3 Inducción al desove	5
1.1.4 Excipientes con potencial para la liberación prolongada de GnRHa.....	7
1.1.4.1 Colesterol	7
1.1.4.2 Celulosa	8
1.1.4.3 Etilvinilacetato (EVAc)	9
1.1.4.4 Inulina.....	9
1.1.4.5 Albúmina de suero bovino (BSA).....	10
1.1.4.6 Alginato de sodio.....	11
1.1.4.7 Reticulación del alginato de sodio	12
1.1.4.8 2- hidroxietilo de metacrilato (HEMA)	13
1.1.4.9 Metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA)	14
1.1.5 Formas farmacéuticas usadas para administrar tratamientos hormonales en peces.....	14
1.1.5.1 Implantes de colesterol.....	14
1.1.5.2 Implantes de etilvinilacetato (EVAc)	15
1.1.5.3 Microesferas biodegradables.....	16
1.1.6 Cinética de liberación de fármacos	18
1.2 Justificación	19
1.3 Hipótesis.....	20
1.3.1 Objetivo general.....	20

1.3.2 Objetivos específicos.....	20
Capítulo 2. Materiales y Métodos	21
2.1 Implantes de colesterol/celulosa	21
2.2 Elaboración de implantes de alginato	22
2.2.1 Cubierta HEMA- PEGMA para implantes de alginato.....	23
2.2.2 Cubierta de EVAc para implantes de alginato	23
2.2.3 Caracterización morfológica de implantes de alginato	24
2.2.4 Hinchamiento de implantes de alginato con sus diferentes coberturas	24
2.3 Elaboración de implantes EVAc.....	25
2.4 Perfil de liberación <i>in vitro</i> de implantes de colesterol/celulosa, alginato-PEGMA y EVAc.....	26
2.5 Análisis estadístico	27
Capítulo 3. Resultados.....	28
3.1 Liberación de BSA.....	28
3.1.1 Implantes de colesterol.....	28
3.1.2 Implantes de alginato	29
3.1.2.1 Implantes alginato- PEGMA (gelificación externa)	29
3.1.2.2 Implantes alginato- PEGMA (gelificación interna)	30
3.1.2.2 Implantes de alginato-PEGMA cubiertos con HEMA-PEGMA	31
3.1.2.3 Implantes de alginato-PEGMA con diferentes coberturas de EVAc.....	32
3.1.3 Caracterización morfológica de los implantes de alginato	34
3.1.4 Hinchamiento de implantes de alginato	35
3.1.5 Implantes de EVAc.....	39
3.2 Liberación de GnRHa	41
3.2.1 implantes de colesterol y alginato- PEGMA cubiertos EVAc/Inulina	41
3.2.3 Implantes de EVAc.....	42
Capítulo 4. Discusión	44
4.1 Liberación de BSA.....	44
4.1.1 Implantes de colesterol.....	44
4.1.2 Implantes de alginato.....	45
4.1.5 Implantes de EVAc.....	48
4.2 Liberación de GnRHa	49

4.2.1 Implantes de colesterol/celulosa y alginato-PEGMA cubiertos con EVAc/inulina.....	49
4.2.2 Implantes de EVAc.....	50
Capítulo 5. Conclusiones	52
Capítulo 6. Recomendaciones	53
Literatura citada	54
Anexos.....	62
Anexo A. Cálculo de CaCO_3 para diferentes porcentajes de alginato	62
Anexo B. Cálculo de los compuestos agregados para la solución HEMA-PEGMA	64
Anexo C. Peso molecular y densidad de reactivos.....	65

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química del colesterol (modificada de Bloch, 1991).	8
Figura 2. Estructura química de la celulosa (tomada de Richards <i>et al.</i> , 2012).....	8
Figura 3. Estructura química del etilvinilacetato (EVAc, tomado de Merck).	9
Figura 4. Estructura química de la inulina (tomado de Merck).	10
Figura 5. Representación 3D de la molécula de albúmina (tomada de Monje, 2014). Dominio AI-rojo, dominio AII- verde, dominio AIII- azul, dominio BI- amarillo, dominio BII- magenta, dominio BIII- cyan.	10
Figura 6. Estructura del alginato de sodio (imagen tomada de Salisu <i>et al.</i> , 2016).....	11
Figura 7. Representación esquemática del modelo “caja de huevo” con cationes de calcio (tomada de Bade <i>et al.</i> , 2017).....	12
Figura 8. Reticulación del alginato. A, gelificación externa, la solución de alginato se gotea a una solución de CaCl_2 para que los iones de Ca^{2+} difundan desde el exterior hacia el interior del alginato; B, gelificación interna, la solución de alginato se mezcla con CaCO_3 , los iones de calcio se liberarán desde el interior de la solución cuando disminuye el pH, (modificada de Draget, 2009).....	13
Figura 9. Estructura química del 2-Hidroxietilo de metacrilato (HEMA) (tomada de Merck).	13
Figura 10. Estructura química del metil éter metacrilato de polietilenglicol (PEGMA) (tomada de Merck).	14
Figura 11. Implante con 95% colesterol y 5% celulosa. A, vista superior; B, vista lateral. La barra de escala indica 1 mm.	28
Figura 12. Perfil de liberación de albúmina de suero bovino (BSA) de implantes con diferentes proporciones de colesterol-celulosa (100-0 y 95-5%) y 100 μg de BSA. Promedio $\pm$ desviación estándar.....	29
Figura 13. Implante alginato-PEGMA elaborado con el método de gelificación externa. A, Vista superior; B, vista lateral. La barra de escala indica 1 mm.	29
Figura 14. Implante de alginato –PEGMA, elaborado con el método de gelificación interna. A, vista superior; B, vista lateral. La barra de escala indica 1 mm.	30
Figura 15. Perfil de liberación de albúmina de suero bovino (BSA) de implantes de alginato (1.5%) y alginato (1.5, 2 y 2.5%)-PEGMA, cada uno con 300 μg de BSA. Promedio $\pm$ desviación estándar.	31
Figura 16. Implante alginato – PEGMA elaborado por el método de gelificación interna cubierto con HEMA-PEGMA. A, vista superior; B, vista lateral. La barra de escala indica 1 mm.	31

- Figura 17.** Perfil de liberación de albúmina de suero bovino (BSA) de implantes con 1.5% de alginato de sodio con y sin la adición de PEGMA en la matriz y con una cobertura adicional de HEMA-PEGMA y 300 µg de BSA. Promedio $\pm$ desviación estándar.32
- Figura 18.** Implante de alginato- PEGMA elaborado por el método de gelificación interna cubierto con EVAc. A, vista superior; B, vista lateral. La flecha indica la cobertura de EVAc. La barra de escala indica 1 mm.33
- Figura 19.** Perfil de liberación de albúmina de suero bovino (BSA) de implantes con 1.5% de alginato de sodio-PEGMA cubiertos con EVAc en distintas modalidades y con 300 µg de BSA. Promedio $\pm$ desviación estándar.....34
- Figura 20.** Cortes en microtomo de implantes de alginato-PEGMA. A, alginato-PEGMA (método de gelificación externa); B, alginato-PEGMA (gelificación interna); C, alginato-PEGMA (gelificación interna) cubierto con HEMA-PEGMA; D, alginato-PEGMA (gelificación interna) cubierto EVAc_{st}, la flecha señala esta cobertura.35
- Figura 21.** Implante de alginato-PEGMA (gelificación externa). A, vista superior; B, implante dentro de solución Ringer después de 24 horas. La barra de escala indica 1 mm.35
- Figura 22.** Implante alginato-PEGMA (gelificación interna). A, implante antes de sumergirse en solución Ringer; B, 24 h; y C, 48 h después de sumergirlos en solución Ringer. La barra de escala indica 1 mm.36
- Figura 23.** Implante alginato-PEGMA (gelificación interna) cubierto con HEMA-PEGMA, sumergidos en solución Ringer. A, implante antes de sumergirse en solución Ringer; B, 24 h; C, 48 h; D, 72 h después de sumergirlos en solución Ringer.36
- Figura 24.** Implante alginato-PEGMA cubierto con EVAc_{st}. A, implante antes de sumergirse en solución Ringer; B, 24 h; C, 48 h; y D, 72 h de después de sumergirlos en solución Ringer. La barra de escala indica 1 mm.37
- Figura 25.** Implante alginato-PEGMA cubierto con EVAc/inulina. A, implante antes de sumergirse en solución Ringer; B, 24 h; C, 48 h; y D, 72 h después de sumergirlos en solución Ringer. La barra de escala indica 1 mm.37
- Figura 26.** Implante alginato-PEGMA cubierto con EVAc. A, implante antes de sumergirse en solución Ringer; B, 24 h; C, 48 h; y D, 72 h después de sumergirse en solución Ringer. La barra de escala indica 1mm.38
- Figura 27.** Implante de EVAc. A, vista superior; B, vista lateral.40
- Figura 28.** Perfil de liberación de albumina de suero bovino (BSA) de implantes tratamiento de EVAc con 300 µg de BSA+ 571 µg y un control con 571 µg de BSA. Promedio $\pm$ desviación estándar.....41
- Figura 29.** Perfil de liberación de proteína de los implantes de colesterol/celulosa (95 y 5%) e implantes con 1.5% de alginato de sodio-PEGMA cubiertos de EVAc/inulina. Cada implante contenía 200 µg de GnRHa. Promedio $\pm$ desviación estándar.42

Figura 30. Perfil de liberación de proteína de implantes de EVAc. Promedio $\pm$ desviación estándar.....43

Lista de Tablas

Tabla 1. Síntesis de estudios realizados para inducir ovulación y desove en diferentes especies utilizando análogos de GnRH (modificada de Mylonas y Zohar, 2001).....	17
Tabla 2. Índice de ganancia de peso de diferentes implantes de alginato-PEGMA a través del tiempo. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos a>b.	39
Tabla 3. Índice de ganancia de volumen de diferentes implantes de alginato-PEGMA a través del tiempo.	39
Tabla 4. Peso molecular y densidad de reactivos.	65

Capítulo 1. Introducción

La pesca es una actividad que se remonta a la prehistoria (Vilches, 1980); sin embargo, el volumen de la producción pesquera mundial se ha estancado por la dramática disminución de poblaciones marinas naturales, lo que ha sido ocasionado por la sobreexplotación que ha generado el aumento de la demanda de alimentos por el crecimiento acelerado de la población humana (FAO, 2020). A raíz de este problema, la acuicultura ha crecido en importancia durante las últimas décadas, de tal manera que para el año 2018 su contribución a la oferta de alimentos de alta calidad nutricional representó el 46% de la producción pesquera mundial (FAO, 2020).

Durante muchos años se creyó que los recursos del mar eran infinitos, por ello no existía un control sobre la pesca, una de las principales actividades económicas de México. La acuicultura es un sector muy importante para el desarrollo económico del país, por lo que es necesario que esta actividad se lleve a cabo de la manera más eficiente posible. Uno de los retos más grandes a los que se enfrenta este sector es el cultivo de especies marinas, dado que la disponibilidad de agua dulce y de áreas continentales es limitada en contraste con la disponibilidad de áreas para el desarrollo de cultivos marinos. Para que el cultivo de una especie marina con potencial sea exitoso, es necesaria su domesticación. En este sentido, una de las dificultades del proceso de domesticación de peces marinos es su reproducción en cautiverio. Por esta razón, el desarrollo de las técnicas de cultivo ha involucrado distintos métodos para lograr una reproducción exitosa (Mylonas y Zohar, 2001; Teletchea, 2015).

Uno de los problemas más comunes en los peces criados en cautiverio es la ausencia de desove espontáneo, ya que existe un bloqueo hormonal que impide el proceso reproductivo normal. Actualmente se desconocen los procesos fisiológicos que ocasionan esta disfunción reproductiva, misma que depende de la especie en cuestión, así como de otros factores que participan en conjunto para completar el proceso de reproducción. Por lo general, este problema se expresa en mayor proporción en las hembras, ya que a pesar de que inician un desarrollo gonadal normal, no logran alcanzar la maduración final de los ovocitos (FOM por sus siglas en inglés) en el proceso de ovogénesis, por lo tanto, no desovan. En el caso de los machos, a pesar de que pueden producir semen, el volumen es pequeño y por lo general de mala calidad. Derivado de estos problemas, a lo largo del tiempo ha sido necesario inducir los desoves de los organismos haciendo uso de algunas hormonas y sus análogos como la GnRH que participa de manera importante en el proceso reproductivo (Zohar, 2021).

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*), los meros (*Epinephelus* spp), los robalos (*Centropomus undecimalis* y *Centropomus viridis*) y la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), entre otros, son especies con gran potencial en la acuicultura, pero que al igual que muchas otras, presentan alteraciones en su ciclo reproductivo cuando son criadas en cautiverio, por ello es necesario realizar más estudios para conocer las dosis mínimas de GnRH que inducen el desove en estas especies, así como el mejor vehículo de entrega de dicha hormona (Marino *et al.*, 2000; True, 2012; Navarro *et al.*, 2019). En el presente trabajo se fabricaron, caracterizaron y evaluaron implantes con diferentes excipientes para la liberación *in vitro* de BSA como proteína modelo y GnRH. Los excipientes usados fueron colesterol y celulosa como aglutinante, alginato de sodio y etilvinilacetato (EVAc). Adicionalmente como cobertura para los implantes de alginato se usó HEMA-PEGMA y EVAc con algunas modificaciones.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Endocrinología de la reproducción en peces

En los peces, como en otros vertebrados, la reproducción es regulada por el cerebro, esto se logra a través de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH por sus siglas en inglés). La GnRH es un decapeptido relativamente bien conservado que se produce en el hipotálamo y es transportado a la hipófisis. Las diferentes isoformas que se han identificado de esta hormona se han nombrado de acuerdo con la especie donde se han descrito primero, pero pueden encontrarse también en otras especies. Los peces son el grupo filogenético donde se han identificado un mayor número de variantes de esta hormona, donde a partir de la identificación de GnRH de salmón (sGnRH), se han identificado siete isoformas más de GnRH. De las ocho isoformas identificadas en total, seis son exclusivas de teleósteos. Además, este grupo de peces también expresan la forma GnRH de mamífero (mGnRH). Dependiendo de la especie, las funciones hipofisiotrópicas se llevarán a cabo por la mGnRH o la sGnRH (Matsuo *et al.*, 1971; Sherwood *et al.*, 1983; Estévez, 2008).

La GnRH estimula la producción de las gonadotropinas: la hormona folículo estimulante (FSH por sus siglas en inglés) que regula el proceso de la vitelogénesis en las hembras y la espermatogénesis en los machos; y la hormona luteinizante (LH por sus siglas en inglés) que regula la FOM y la espermiación (Harvey y Hoar, 1980; Zohar, 1988; Montero y Dufour, 1996; Peter y Yu, 1997; Schulz *et al.*, 2010).

1.1.1.1 Control reproductivo en hembras

En las hembras, durante la vitelogénesis, las gonadotropinas estimulan la producción de testosterona (T) en las células teca y su posterior aromatización a 17β -estradiol (E2) en las células granulosas del folículo ovárico. Este proceso ocasiona el aumento de E2 en plasma, lo que conlleva a la producción de vitelogenina (Vtg) en el hígado. La Vtg es secretada a la sangre y por esta vía llega al ovocito, que mediante un receptor en su membrana plasmática la reconoce y forma una vesícula pinocítica. En general, este proceso es regulado por la FSH. Al finalizar el proceso de la vitelogénesis, es notable el aumento de LH, lo que deriva en un aumento en los niveles plasmáticos del esteroide inductor de la maduración (17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona o 17,20 β ,21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona), que es responsable de actuar a nivel de la membrana del ovocito induciendo así la FOM (Gordon *et al.*, 1987; Peter y Yu, 1997; Mylonas y Zohar, 2001).

La FOM, es un proceso celular que inicia cuando el ovocito se libera del arresto en profase I por la activación del Factor Promotor de la Maduración (MPF por sus siglas en inglés). Los eventos que se desencadenan durante la FOM son la migración y ruptura de la vesícula germinal, reestructuración citoplasmática y cambios en la proteína del vitelo, osmorregulación, formación del blastodisco y la maduración cortical. Para que el MPF sea activado es necesario que se desencadene una cascada de señalización que inicia con la hormona 17 α , 20 β , 21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona (20 β -S), cuyos niveles aumentan como consecuencia de la transición que hay en el control endocrino de la reproducción de FSH a LH (Lubzens *et al.*, 2010).

1.1.1.2 Control reproductivo en machos

En los machos, las gonadotropinas se encargan de regular el proceso de la espermatogénesis y esteroidogénesis a través de la producción de andrógenos, estrógenos y progestágenos. El principal andrógeno es la 11-cetotestosterona (11-KT) en las células Leydig y T que funge como su precursor. Los niveles de 11 KT en plasma varían entre especies y durante el proceso reproductivo, pero por lo general se ha mostrado un aumento en los niveles durante la espermatogénesis, y una disminución de esta durante la espermiación, estos niveles en general se encuentran regulados por la LH (Nagahama, 1994; Miura *et al.*, 1995; Mylonas y Zohar, 2001; Schlz *et al.*, 2010).

1.1.2 Alteraciones en el proceso reproductivo de peces criados en cautiverio

Es común que los peces criados en cautiverio tengan diversas alteraciones en su proceso reproductivo que evitan que liberen sus gametos al medio de manera espontánea. Generalmente, estas alteraciones se atribuyen a que las condiciones ambientales no son las adecuadas para los organismos, además, pueden involucrar deficiencias en su alimentación y problemas asociados al estrés que ocasionan las prácticas de cultivo. Las condiciones estresantes a las que se enfrentan los peces criados en cautiverio también pueden ocasionar afectaciones en el sistema inmune, así como en el crecimiento (Mylonas y Zhoar, 2001).

De acuerdo con Zohar y Mylonas (2001), las alteraciones reproductivas se pueden clasificar en distintas categorías:

Ausencia de desarrollo gonadal: como en la anguila europea (*Anguilla* sp.) y en el jurel del Mediterráneo (*Seriola dumerili*), especies de importancia comercial en acuicultura. En condiciones de cultivo las hembras no presentan el proceso de vitelogénesis hasta después de algunos años de estar en cautiverio, sin embargo, los pocos ovocitos que se desarrollan son de un diámetro muy pequeño, por tanto, inician un proceso de reabsorción gonadal (Fontaine, 1975; Zohar y Mylonas, 2001).

- Ausencia de la maduración final del ovocito: el proceso de vitelogénesis se lleva a cabo de manera normal, pero no se completa la FOM, que es la última fase de la ovogénesis, necesaria para un desove espontáneo. Esta alteración se ha observado en el lenguado de verano (*Paralichthys lethostigma*) (Berlinsky *et al.*, 1997).

- Ausencia del desove: Esto ocurre cuando los organismos completan la maduración del ovocito, pero no son capaces de expulsarlos al medio, por lo que es necesaria la extracción de los ovocitos en forma manual. Esta condición se ha observado en el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Gordon *et al.*, 1987; Estay *et al.*, 1994; Zohar y Mylonas, 2001).

Diversos estudios con lobina rayada y en dorada han demostrado que lo más común en estas especies es que no logran completar la FOM, debido a que no hay liberación de la LH durante la temporada de desove, a pesar de que esta hormona se acumula en la hipófisis durante la ovogénesis (Zohar, 1988; Mylonas *et al.*, 1997; Mylonas *et al.*, 1998).

La categoría de clasificación en la que se incluye a cada especie dependerá de la etapa de la ovogénesis que esté bloqueada. La mayor parte de las especies estudiadas se clasifican en la categoría de ausencia de la maduración final del ovocito, condición que tiene como consecuencia la ausencia de desoves (Mylonas y Zohar, 2001).

Se ha demostrado que la manipulación de algunos parámetros ambientales como la temperatura, fotoperiodo, salinidad, volumen de los tanques y vegetación del sustrato, pueden mejorar las condiciones de cultivo, propiciando los desoves espontáneos de huevos de mejor calidad. Sin embargo, de manera general, se puede hablar de que los tratamientos hormonales para la inducción al desove son necesarios para la mayoría de las especies marinas cultivadas (Zohar, 1989; Munro *et al.*, 1990).

1.1.3 Inducción al desove

Desde 1930 se ha llevado a cabo la inducción al desove de organismos acuáticos. El pionero en el desarrollo y aplicación de estas terapias fue el profesor B.A. Hussay, quien ganó el Premio Nobel de Fisiología en 1947. Sus estudios se centraron en las funciones de la hipófisis de *Cnesterodon decemmaculatus*, donde observó que el tratamiento de hembras maduras con homogenizados de hipófisis inducía la ovulación. Esta inducción se llevaba a cabo mediante la inyección de extractos crudos de hipófisis (hipofisación), obtenidos de organismos sexualmente maduros, generalmente de carpa. Uno de los problemas que genera el uso de estos extractos se debe a que se inyectan completos, es decir, no existe una purificación de las hormonas de interés, en este caso de las gonadotropinas (LH y FSH). Por lo tanto, se adicionan otro tipo de moléculas a los organismos que reciben la terapia, lo que puede ocasionar efectos negativos como la transmisión de enfermedades y una respuesta inmune no deseada. Un ejemplo de esto es que en la siguiente temporada reproductiva sea necesaria una dosis más alta para poder inducir el desove en organismos tratados anteriormente (Houssay, 1930; Mylonas y Zohar, 2001; Zohar y Mylonas, 2001).

A causa de los problemas relacionados con el uso de extractos crudos de hipófisis, se utilizó más comúnmente la gonadotropina coriónica humana (hCG por sus siglas en inglés), extraída de la orina de mujeres embarazadas, y también la LH obtenida por separación cromatográfica. La hCG se ha probado con éxito en distintas especies, pero su uso tiene algunos inconvenientes, como su alto costo, y que los peces pueden desarrollar una respuesta inmune, lo que implica que para la siguiente temporada reproductiva el

tratamiento ya no sea efectivo o se requieran dosis mayores para que el tratamiento sea exitoso (Lam, 1982; Zohar, 1989b; Zohar y Mylonas, 2001).

Actualmente, los análogos de la GnRH (GnRHa) son las hormonas más utilizadas para la inducción al desove y para incrementar el volumen y calidad del semen. La GnRH nativa es rápidamente degradada por acción enzimática, en contraste, los análogos de esta hormona han sido modificados en su estructura, por lo que son más resistente a la degradación enzimática. Esta modificación consiste en la eliminación o el cambio del D-aminoácido que se encuentra en la posición 6, así como una sustitución de etilamida (NEt) en la posición 10. Las GnRHa se sintetizan artificialmente, por lo que no conllevan el riesgo de transmitir enfermedades a los reproductores, como podría ocurrir con el uso de extractos crudos de hipófisis. Además, otra de las ventajas del uso de estos análogos es que aparentemente no desencadenan una respuesta inmune, lo que les otorga una ventaja sobre la hCG. Así mismo, la GnRHa actúa en un nivel superior en el eje Hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG), comparada con las gonadotropinas, lo que permite que exista una estimulación más equilibrada de los eventos reproductivos (Zohar, 1988; Crim y Bettles, 1997).

Las GnRHa más utilizadas en la industria de la acuicultura son la de mamífero (mGnRHa) y la de salmón (sGnRHa). Ambas presentan el cambio en el aminoácido de la posición 6. En las mGnRH y sGnRH se sustituyó la Gly por DAla y por DArg respectivamente, además la posición 10 se sustituyó por etilamida (NEt). Ambos análogos son potentes inductores del desove en peces (Alok *et al.*, 2000; Mylonas y Zohar, 2001). Estos análogos se administran por diferentes vías, así como en diferentes dosis, dependiendo de la especie en cuestión. Además de la inyección con suero fisiológico como vehículo, también se utilizan implantes de liberación prolongada, los elaborados con colesterol son los más utilizados, debido a que su fabricación es relativamente más sencilla, comparada con los implantes o microesferas de polímeros biodegradables (Mylonas y Zohar, 2001).

A pesar de que la inyección intraperitoneal es una de las vías de administración más utilizadas, no siempre resulta efectiva en una sola aplicación, debido a que algunas especies presentan un desarrollo ovárico asincrónico, por lo que no culmina en un desove del 100% de las hembras. Por otra parte, la GnRHa se diseñó para tener una mayor resistencia a la degradación enzimática, en comparación con la GnRH nativa (5 minutos). Sin embargo, la vida media *in vivo* de la GnRHa solo aumenta a 23 minutos, por lo tanto, cuando se administra por inyección los efectos no siempre son los esperados (Zohar *et al.*, 1995). Por ejemplo, en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con una sola inyección con [D-Ala6, Pro9-NHET] LHRH, se determinó que la concentración de la hormona solo se encontraba en circulación sanguínea durante 8

horas, por consiguiente, no provocó que los peces desovaran y fue necesario aplicar una segunda dosis para estimular el desove (Crim *et al.*, 1988).

La FOM es un proceso celular que puede requerir de varios días y, por ende, la GnRH se debe mantener en las concentraciones adecuadas en el plasma durante este periodo, además que la respuesta de los folículos ováricos a la estimulación no es inmediata. El periodo en el que la FOM ocurre puede variar entre algunos días o semanas, de acuerdo con Mylonas y Zohar (2001) y esto dependerá de:

- La sensibilidad de la especie al estrés ocasionado por el procedimiento para la inducción.
- La temperatura del agua.
- La etapa de desarrollo gonadal y de su cercanía a la maduración con respecto al momento del tratamiento con la GnRH.

Debido a lo anterior, en los protocolos de inducción se ha optado por la aplicación de más de una inyección en el transcurso de horas o días dependiendo de la especie, para que el proceso se lleve a cabo con éxito. Sin embargo, el aplicar más de una inyección en los organismos significa un aumento del estrés, por ello, es necesario usar alternativas como los implantes para reducir significativamente el manejo de los organismos (Mylonas y Zohar, 2001). Para obtener un buen medio de aplicación de estas hormonas es necesario tomar en cuenta diferentes parámetros como el excipiente a usar, la forma farmacéutica, vía de administración y cinética de liberación (Sumano y Ocampo, 2006).

1.1.4 Excipientes con potencial para la liberación prolongada de GnRH

1.1.4.1 Colesterol

El colesterol, es un lípido de tipo esteroide (Figura 1), componente integral de las membranas de las células eucariotas y es una molécula clave para controlar los parámetros fisicoquímicos de la membrana como la fluidez y la organización. Es el precursor de algunas hormonas esteroideas, y, desempeña también otras funciones biológicas como regulador en la resistencia a fármacos, y, en la respuesta inmune frente a los virus al estabilizar la membrana cuando ha sufrido un daño estructural (Chakraborty *et al.*, 2020). Por otra parte, la presencia de un grupo 3-hidroxi hidrófilo junto con un dominio hidrocarburo le confieren al

colesterol una naturaleza anfifílica, por lo anterior y por ser un material asequible, biocompatible y de fácil manejo lo hacen un material ampliamente utilizado en la administración de diversos fármacos, incluida la GnRHa para la reproducción en peces (Sherwood *et al.*, 1988; Mallick *et al.*, 2018; Albuquerque *et al.*, 2019).

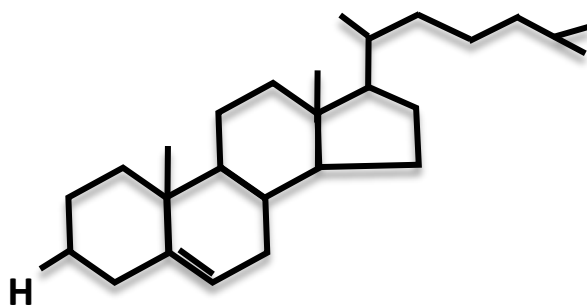


Figura 1. Estructura química del colesterol (modificada de Bloch, 1991).

1.1.4.2 Celulosa

La celulosa es la macromolécula biológica más abundante. Es un polisacárido lineal compuesto de moléculas β -glucosa (Figura 2). Debido a los enlaces β -1,4 – glucósido entre las unidades, se forma una estructura lineal y rígida, donde se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciendo esta estructura más resistente e insoluble en agua. El peso molecular de la celulosa es muy variable y depende de diversos factores (Vincent, 1999; Morgan *et al.*, 2013).

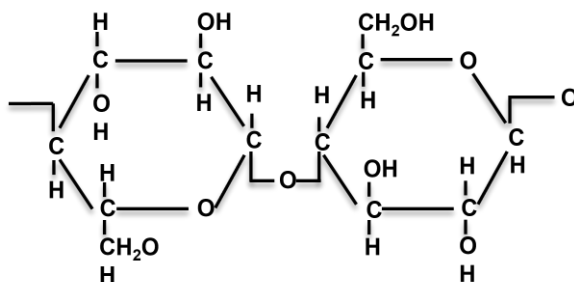


Figura 2. Estructura química de la celulosa (tomada de Richards *et al.*, 2012).

1.1.4.3 Etilvinilacetato (EVAc)

El etilvinilacetato (EVAc, por sus siglas en inglés) (Figura 3) varía en cuanto a sus propiedades químicas dependiendo del contenido de acetato de vinilo (VA, por sus siglas en inglés), el cual varía del 40 al 60% en peso. De igual forma, el grado elastomérico y la polimerización del EVAc depende del contenido de VA. Por otra parte, la reticulación de EVAc se puede lograr usando peróxidos y métodos de radiación. Entre las aplicaciones del EVAc se encuentra la fabricación de revestimientos, cables, extrusiones médicas y sellos. Así mismo, también ha sido usado como excipiente para la liberación de GnRHa en atún (Mylonas *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2017).

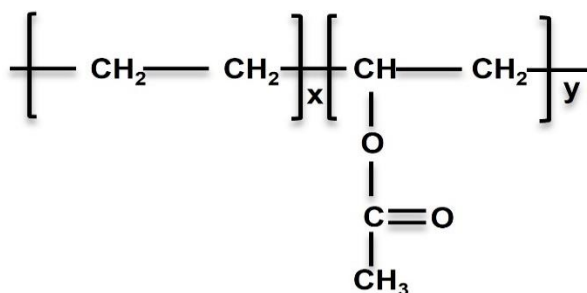


Figura 3. Estructura química del etilvinilacetato (EVAc, tomado de Merck).

1.1.4.4 Inulina

La inulina, es un polisacárido que forma parte de la familia de los fructanos (Figura 4). Es un biopolímero constituido por unidades D-fructosa unidos por enlaces β -(1 $\rightarrow$ 2) y un residuo terminal de D-glucosa que se une a una D-fructosa por el enlace α -(1 $\rightarrow$ 2). Su peso molecular varía en función del grado de polimerización. La inulina es importante en la industria alimentaria y farmacéutica (Franck, 2002; Barclay *et al.*, 2010).

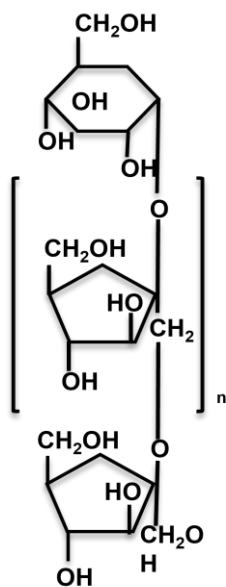


Figura 4. Estructura química de la inulina (tomado de Merck).

1.1.4.5 Albúmina de suero bovino (BSA)

La albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) es una proteína transportadora que forma complejos con diferentes moléculas poco solubles en medios acuosos, de esta manera, aumenta la cantidad de moléculas bioactivas que se pueden transportar por la sangre dentro del organismo. Entre estas moléculas se encuentran hormonas esteroideas, fármacos y ácidos grasos. La BSA es una proteína soluble en agua, compuesta de 583 aminoácidos. Tiene un peso molecular de 66,430 g/mol. Debido al conocimiento que se tiene sobre su estructura, es usada ampliamente como proteína modelo en diversos estudios en el campo biomédico (Figura 5) (Carter y Ho, 1994).

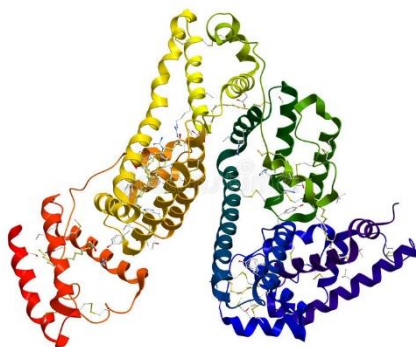


Figura 5. Representación 3D de la molécula de albúmina (tomada de Monje, 2014). Dominio AI-rojo, dominio AII- verde, dominio AIII- azul, dominio BI- amarillo, dominio BII- magenta, dominio BIII-cyan.

1.1.4.6 Alginato de sodio

El alginato de sodio es un biopolímero no tóxico abundante en la naturaleza, se puede encontrar como componente estructural de algas marinas pardas o como polisacárido estructural de bacterias. El alginato comercializado se extrae de algas pardas como *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japónica*, *Eclonia máxima*, *Lessonia nigrescens*, *durvillea antactica* y *Sargassum* sp. (Lee y Monney, 2012). El alginato se encuentra en la matriz intracelular en forma de sal de diferentes cationes como el sodio, calcio y magnesio (Gambotz y Wee, 1998). Este biopolímero se encuentra formado por ácido D- manurónico (M) y ácido L- gulurónico unidos por enlaces 1- 4 (Figura 6) (Draget, 2009).

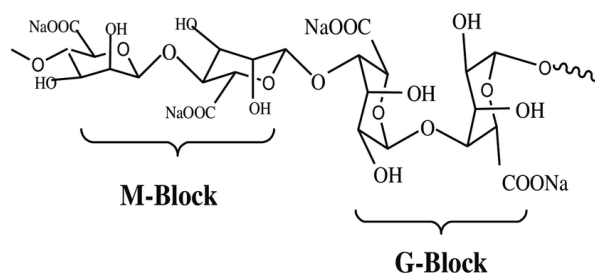


Figura 6. Estructura del alginato de sodio (imagen tomada de Salisu *et al.*, 2016).

El peso molecular del alginato de sodio comercial puede oscilar entre 32000 y 400000 g/mol, por lo tanto, cuanto más elevado sea el peso molecular del alginato las soluciones serán más viscosas (Draget, 2009; Lee y Monney, 2012). En este sentido, el alginato de sodio con mayor cantidad de ácido gulurónico es más soluble en agua comparado con el que es más rico en ácido manurónico (Goh *et al.*, 2012). Las propiedades físicas y químicas de los alginatos los han hecho útiles para diversas aplicaciones alimentarias e industriales. Entre estas propiedades se encuentra la capacidad de retener agua, propiedades gelificantes, de viscosidad y estabilizante. Por lo anterior, el alginato es una excelente opción para la elaboración de nuevos biomateriales para el cultivo de células, control de la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos (Alban, 2002; Senni *et al.*, 2011; Coleman *et al.*, 2011; Bidarra *et al.*, 2014, Venkatesan *et al.*, 2015).

1.1.4.7 Reticulación del alginato de sodio

La formación de hidrogeles depende estrictamente de las características del polímero, así como del reticulante. En el caso de los geles de alginato, su formación depende de la naturaleza y propiedades de la cadena polimérica, tipo de reticulante y tipo de auxiliar reticulante (Draget, 2009). La reticulación o entrecruzamiento del alginato se puede obtener por métodos químicos o físicos, los cuales, confieren la posibilidad de controlar la cinética de gelificación y propiedades del hidrogel (Yu y Ding, 2008; Bidarra *et al.*, 2014). Por otra parte, se sabe que los alginatos con un alto contenido en bloques G, tienden a formar geles fuertes, rígidos y porosos, mientras que, los geles con un alto contenido en bloques M formarán geles más débiles y elásticos (Lee y Monney, 2012; Paques *et al.*, 2014).

Los hidrogeles de alginato se preparan principalmente por el método de reticulación iónica, que consiste en mezclar una solución de alginato con un reticulante iónico, como lo son los cationes divalentes (Ca^{2+} , Ba^{2+} y Al^{3+}), siendo el ion calcio el más utilizado. Durante la reticulación los bloques G de un polímero se unen con los bloques G de otro, de esta manera forman una estructura conocida como “caja de huevo”, lo que dará lugar a un gel (Figura 7) (Grant *et al.*, 1973).

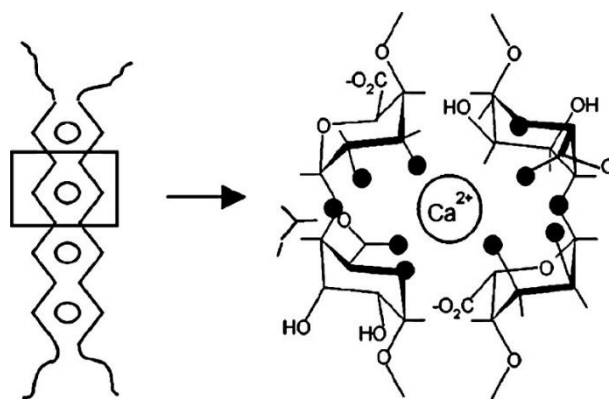


Figura 7. Representación esquemática del modelo “caja de huevo” con cationes de calcio (tomada de Bade *et al.*, 2017).

La formación de geles de alginato por el método iónico se puede dar por dos métodos, denominados gelificación externa (ge) y gelificación interna (gi) (Figura 8). En el primer caso, el CaCl_2 se utiliza como reticulante, ya que es soluble en agua, los iones de calcio se difunden desde la solución de CaCl_2 al interior del alginato, de esta manera el gel de alginato se forma de manera casi inmediata (Paques *et al.*, 2014). Por otra parte, en el método de gelificación interna se utiliza como reticulante una sal insoluble en agua (ej. CaCO_3) que se mezcla con la solución de alginato, en este caso, los iones de calcio se liberarán desde el interior de la mezcla cuando hay una disminución de pH, o bien, si se aumenta la solubilidad del calcio,

de esta manera se da la formación del gel en un proceso más lento que el que se da durante la gelificación externa (Draget, 2009; Paques *et al.*, 2014).

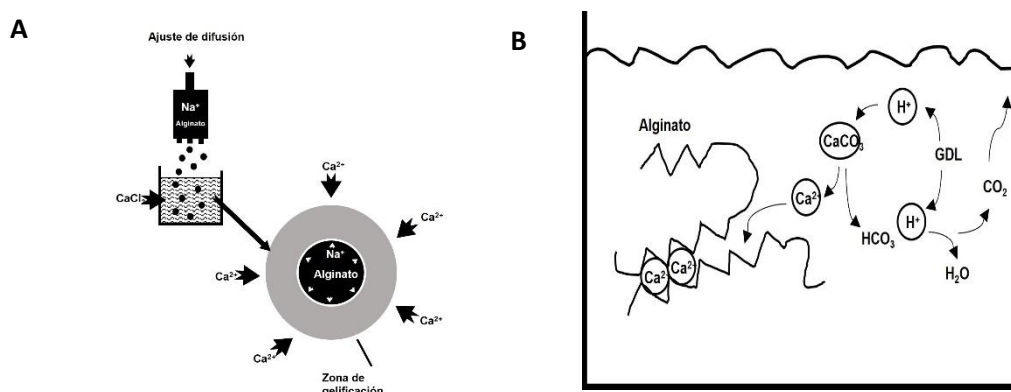


Figura 8. Reticulación del alginato. A, gelificación externa, la solución de alginato se gotea a una solución de CaCl_2 para que los iones de Ca^{2+} difundan desde el exterior hacia el interior del alginato; B, gelificación interna, la solución de alginato se mezcla con CaCO_3 , los iones de calcio se liberarán desde el interior de la solución cuando disminuye el pH, (modificada de Draget, 2009).

1.1.4.8 2- hidroxietilo de metacrilato (HEMA)

El 2-Hidroxietilo metacrilato (HEMA por sus siglas en inglés), es un polímero no biodegradable estable en el agua con una alta transparencia (Figura 9). Las propiedades físicas como la hinchazón, rigidez y reología pueden ajustarse con la densidad de reticulación, es decir, incorporando diferentes químicos a través de copolimerización. En este sentido, una reducción en la densidad de reticulación de HEMA, daría como resultado un gel más suave y maleable, que podría resultar más apto para la regeneración de tejidos. Actualmente, este polímero es ampliamente utilizado como biomaterial sintético para aplicaciones biomédicas (Samavedi *et al.*, 2014).

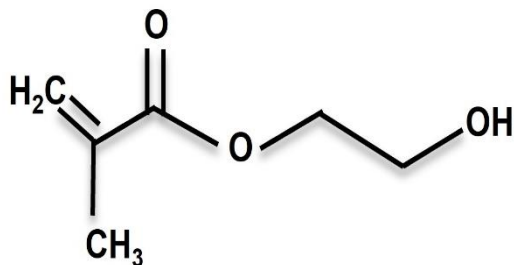


Figura 9. Estructura química del 2-Hidroxietilo de metacrilato (HEMA) (tomada de Merck).

1.1.4.9 Metil éter metacrilato de polietilénglicol (PEGMA)

El metil éter metacrilato de polietilénglicol (PEGMA, por sus siglas en inglés) es un poliéter ampliamente utilizado en el campo medicinal (Figura 10). Es un material soluble en agua, etanol, benceno y diclorometano, mientras que es insoluble en éter dietílico y hexano. Su peso molecular es alrededor de 500 g/mol. En cuanto a su estructura, las cadenas de PEGMA unidas a la superficie de un material dan una forma similar a un cepillo en la interfaz agua/superficie, esta propiedad, limita el acercamiento de bacterias por lo que lo hace un buen material en las aplicaciones médicas, como se mencionó anteriormente (Stoodley *et al.*, 2013; Zarrintaj *et al.*, 2020).

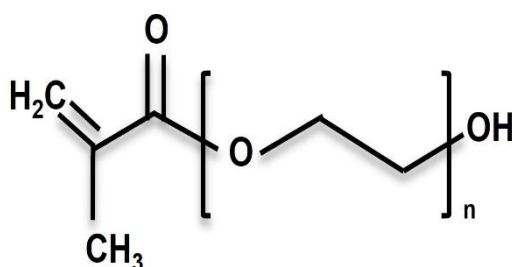


Figura 10. Estructura química del metil éter metacrilato de polietilénglicol (PEGMA) (tomada de Merck).

1.1.5 Formas farmacéuticas usadas para administrar tratamientos hormonales en peces

Otro aspecto importante que se busca actualmente en la inducción del desove en los peces marinos es reducir el estrés ocasionado por los procedimientos para el suministro de las terapias hormonales. En este sentido, se han estudiado diferentes estrategias para el suministro prolongado de la GnRHa, sin que se requiera más de una intervención. Esto se ha logrado utilizando diferentes formas farmacéuticas, como lo son los implantes de colesterol con celulosa e implantes y microesferas de polímeros biodegradables, que mantienen resguardada la hormona y liberan lentamente su contenido en el torrente sanguíneo (Mylonas y Zohar, 2001).

1.1.5.1 Implantes de colesterol

Los primeros estudios de la eficiencia de estos implantes para inducir la maduración gonadal y la ovulación se realizaron en mamíferos, demostrándose que existía una liberación prolongada de GnRHa. Después se

probaron estos métodos en peces criados en cautiverio para inducir la FOM y el desove. Los primeros estudios en peces se realizaron en el salmón del Atlántico y se comprobó que esta vía de administración fue mucho más efectiva que el suministro convencional de más de una inyección intraperitoneal (Kent *et al.*, 1980; Weil y Crim, 1983).

Los implantes de colesterol fueron los primeros en ser evaluados como un sistema de liberación sostenida de GnRHa para peces. Se preparan comprimiendo una mezcla de colesterol, celulosa y GnRHa en polvo en una prensa. Pueden ser elaborados con dosis que van de 25 a 250 µg/kg y son aplicados intraperitoneal o intramuscularmente con ayuda de un aplicador (Mylonas y Zohar, 2001).

Una vez que el pez fue implantado, la GnRHa contenida en el implante es liberada por difusión al medio. La cinética de la liberación depende de la relación colesterol:celulosa, de esta manera, una matriz con un contenido de colesterol <95% se considera de liberación rápida, mientras que si el contenido de colesterol es >95%, se considera de liberación lenta. Los implantes hechos solo de colesterol (100%), han resultado inefectivos en *Pargus major*, ya que solo han liberado el 6% de la GnRHa después de 70 días. Una buena relación de colesterol:celulosa puede dar una liberación lenta de al menos ocho semanas (Crim *et al.*, 1983; Matsuyama *et al.*, 1995).

Por otra parte, se ha descrito otro método para la elaboración de estos implantes, donde se sustituye la proporción de celulosa que se agrega en el implante por manteca de cacao que funciona como aglutinante. Estos implantes tuvieron una liberación lenta de mGnRHa cuando fueron probados en Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con una dosis de 100 µg/kg (Crim *et al.*, 1988).

Una de las ventajas que tienen los implantes de colesterol es que su preparación es relativamente sencilla y los materiales son fáciles de conseguir, y exceptuando la hormona, su costo no es muy elevado. La desventaja es que se recomienda que sean preparados individualmente, por lo que su manufactura resulta tardada, y los implantes presentan una variación significativa en la liberación de la hormona (Carolsfeld *et al.*, 1988; Mylonas y Zohar, 2001).

1.1.5.2 Implantes de etilvinilacetato (EVAc)

Estos implantes se preparan añadiendo un solvente al copolímero, además de una mezcla de inulina/ albúmina de suero bovino (i/bsa) y la cantidad apropiada de GnRHa en polvo. Al evaporarse el solvente,

se obtiene el polímero con el que se formarán los implantes cilíndricos, que serán colocados intraperitonealmente en los organismos con ayuda de un aplicador tipo jeringa. La hormona en este implante se va liberando lentamente por difusión cuando está en contacto con el organismo, la cinética de liberación depende de la velocidad de difusión de la hormona, por lo general su liberación toma dos o más semanas. La duración del periodo de liberación de estos implantes se puede alargar dependiendo del porcentaje de i/bsa que contenga el implante o de su geometría, también se puede agregar algún recubrimiento que controle la permeabilidad del implante, de esta manera se podría lograr una liberación más prolongada (Rhine *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 1986; Zohar 1996). La fabricación de estos implantes es más compleja que la de los implantes de colesterol, pues se requiere de experiencia y equipo especializado (Zohar, 1996).

1.1.5.3 Microesferas biodegradables

Los poliésteres biodegradables de ácido láctico y glicólico originalmente eran usados como material de sutura en las cirugías; fue a partir de 1970 cuando los copolímeros de láctico-glicólico (p[LGA]) se evaluaron como vehículos de entrega para la liberación de GnRH en peces. Otro tipo de polímero biodegradable para la administración de GnRH_a son los polianhídridos, que se sintetizan como polímeros utilizando el dímero de ácido erúico y ácido sebásico. Las microesferas biodegradables se preparan por el método solvente-evaporación utilizando una doble emulsión y por lo general se les coloca un 3% de GnRH_a. La liberación de la GnRH_a es el resultado de la difusión del péptido, así como de la degradación del polímero. La tasa de liberación de GnRH a partir de estas microesferas puede ser hasta de ocho semanas, y da como resultado un incremento en la concentración de LH en el plasma, este incremento puede variar dependiendo del estado de desarrollo gonadal en el que se encuentre el organismo (Chasin *et al.*, 1990; Mylonas *et al.*, 1995).

Del análisis de los diferentes medios para el suministro de terapias hormonales y de los resultados observados en diferentes especies, se puede concluir que no hay un tratamiento único para la inducción de la FOM y de los desoves en especies de importancia para la acuicultura, ya que esto depende principalmente de la especie, del grado de desarrollo gonadal, así como de los recursos con los que se cuente para dicho procedimiento.

A continuación, se presenta una tabla modificada de Mylonas y Zohar (2001), donde se resumen parte de las investigaciones que se han realizado en varias especies, administrando diferentes dosis de GnRHa con diversos vehículos.

Tabla 1. Síntesis de estudios realizados para inducir ovulación y desove en diferentes especies utilizando análogos de GnRH (modificada de Mylonas y Zohar, 2001).

Especie	Nombre común	Vehículo de liberación ¹	Dosis (µg/kg)	GnRH ²	Efecto	Referencia
<i>Centropomus undecimalis</i>	Robalo	Chol	100	B,C,M,S	Ovulación	Skapura <i>et al.</i> (2000)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina europea	EVAc	100	A	Desove	Forniés <i>et al.</i> (2000)
<i>Morone chrysops</i>	Lubina blanca	p[Fad-sa]	40	A	Desove	Mylonas <i>et al.</i> (1997b)
<i>Epinephelus marginatus</i>	Mero	EVAc	15- 180	A	Ovulación	Marino <i>et al.</i> (2000)
<i>Pagrus major</i>	Pargo japonés	Met	70	A	Vitelogénesis, desove	Matsuyama <i>et al.</i> (1993)
<i>Sparus aurata</i>	Dorada	EVAc	230	A,R	Desove	Zohar <i>et al.</i> (1990b)
<i>Umbrina cirrosa</i>	Verrugato	p[Fad-sa]	40	A	Desove	Mylonas <i>et al.</i> (1999)
<i>Salmo trutta</i>	Trucha de río	EVAc	125	A	Ovulación	Goren <i>et al.</i> (1995)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoiris	Chol	25-125	T	Ovulación	Crim <i>et al.</i> (1983)
<i>Chanos chanos</i>	Milkfich	Chol	40	A	Desove	Lee <i>et al.</i> (1986)
<i>Thunnus thynnus</i>	Atún rojo	EVAc	560-840	A	Desove	Mylonas <i>et al.</i> (2007)
<i>Solea senegalensis</i>	Lenguado senegales	EVAc	-	A	Desove	Guzmán <i>et al.</i> (2011)
<i>Thunnus thynnus</i>	Atún rojo	EVAc	40-100	A	Ovulación y Desove	Rosenfeld <i>et al.</i> (2012)
<i>Centropomus undecimalis</i>	Robalo blanco	-	100 y 200 pg/pez	A	Desove	Contreras-Gacía <i>et al.</i> (2015)

¹ EVAc= etilvinilacetato ; p[Fad-sa]=Poli (dímero de ácido graso-ácido sebácico); Chol= colesterol

² A= D-Ala6Pro9NET-mGnRH; M=Mamífero GnRH nativa; B= GnRH nativa de besugo ; C= GnRH II nativa de pollo ; R= Arg6Pro9NET-sGnRH; T= D-Trp6-mGnRH; S= GnRH nativa de salmon

1.1.6 Cinética de liberación de fármacos

La farmacocinética es una disciplina que estudia el curso temporal de las concentraciones de fármacos, así como sus metabolitos en el organismo y su relación con la respuesta farmacológica. Los estudios de farmacocinética se basan en determinar la concentración del fármaco a través del análisis de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). La absorción depende de la liberación de la sustancia activa y su solubilidad bajo condiciones fisiológicas. La liberación es el proceso mediante el cual el principio activo presente en la forma de dosificación llega a estar disponible para su absorción (Sumano y Ocampo, 2006).

Se han descrito dos tipos de liberación: inmediata y modificada. En la inmediata, la liberación de la sustancia activa no está modificada por algún diseño de formulación o método de fabricación en particular, un ejemplo de esta liberación son las inyecciones con suero fisiológico. Por otra parte, la liberación modificada se trata de preparaciones donde se modifica la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia activa; existen dos subtipos de esta clase (Sumano y Ocampo, 2006):

- Liberación retardada: Son formas de liberación modificada para retrasar la liberación de una sustancia activa, esto se consigue con una formulación y método de fabricación particular, estas incluyen preparaciones gastro-resistentes.
- Liberación controlada: En este caso, el principio activo se libera escalonadamente en el tiempo, alargándose el efecto terapéutico y puede ser de dos formas.
 - Liberación sostenida: El principio activo se libera a una velocidad constante, con el objetivo de alcanzar una velocidad de absorción también constante, y de esta manera, disminuir las fluctuaciones en los niveles plasmáticos.
 - Liberación prolongada: Son formas farmacéuticas de liberación modificada para obtener una liberación más lenta de la sustancia activa, en comparación con una velocidad de liberación convencional administrada por la misma vía. Esta liberación se consigue por una formulación y método de fabricación particular.

Definitivamente aún faltan muchos temas por cubrir respecto a las líneas de investigación enfocadas al desarrollo de implantes hormonales en peces. Dentro de estas, la evaluación de nuevos excipientes y su

comparación con los ya existentes es fundamental para contribuir a la optimización de la reproducción en cautiverio de estos organismos. Además, es preciso que los nuevos protocolos de elaboración de implantes que se desarrollen y los ya existentes estén claramente descritos, con el fin de que puedan llegar a ser una herramienta útil en el campo para los acuicultores.

1.2 Justificación

La acuicultura es un sector que ha crecido en importancia durante varias décadas. En México el cultivo de peces marinos está en sus etapas iniciales de crecimiento y tiene un gran potencial de desarrollo, con amplios beneficios económicos y sociales. No obstante, uno de los retos que este desarrollo enfrenta, es la disponibilidad de organismos juveniles (semilla) para los cultivos comerciales, lo que hace necesario un control adecuado de los procesos reproductivos de las especies cultivadas. Por lo general, los problemas reproductivos en los peces marinos criados en cautiverio son una constante en este sector. Parte de estos problemas incluyen la ausencia de desove en estas especies, debido a un bloqueo hormonal que no permite la continuidad del proceso reproductivo, lo que se traduce en la ausencia de desoves espontáneos. Como parte de la solución a este problema, se han utilizado desde hace varios años las terapias hormonales como la única alternativa para completar el proceso reproductivo. Hoy en día son utilizados compuestos sintéticos como la GnRHa que son más potentes que las hormonas nativas, estos, son aplicados utilizando diversos vehículos.

A pesar de que se han realizado diversas investigaciones sobre la liberación de GnRHa con distintos vehículos de entrega, e incluso existen implantes comerciales (Syndel, Canadá) con el fin de inducir el desove en diferentes especies, su uso es restringido debido a que las dosis en estos implantes generalmente son bajas al ser diseñados principalmente para salmón (*Salmo salar*), por lo tanto, no son efectivas en especies que requieren dosis más altas. Además, para obtener un protocolo de elaboración de implantes no es suficiente realizar una revisión de la literatura, ya que no hay una descripción completa de su manufactura, por lo que es necesario que se describan de manera clara los protocolos de preparación, y que estos, queden a disposición de los productores acuícolas para poder ser evaluados en las especies de interés. Es por lo anterior, que el objetivo de esta investigación es encontrar y describir una formulación para elaborar implantes de liberación prolongada a base de diferentes excipientes y describir su perfil de liberación en pruebas *in vitro*.

1.3 Hipótesis

- El perfil de liberación de GnRHa de implantes de alginato/PEGMA será más sostenido y prolongado en contraste con los implantes elaborados a base de colesterol/celulosa y EVAc.
- El tiempo de liberación de los implantes de alginato/PEGMA con diferentes coberturas (HEMA-PEGMA Y EVAc) será mayor en comparación con un implante de alginato sin recubrimiento.

1.3.1 Objetivo general

- Comparar el perfil de liberación *in vitro* de GnRHa a partir de medios elaborados con diferentes excipientes (colesterol/celulosa, EVAc y alginato/PEGMA) con una concentración de 200 µg de GnRHa/implante.

1.3.2 Objetivos específicos

- Describir el perfil de liberación *in vitro* de implantes elaborados con los diferentes excipientes usando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína modelo.
- Probar diferentes coberturas (HEMA/PEGMA y EVAc) en implantes de alginato/PEGMA.
- Caracterizar morfológicamente los implantes de alginato-PEGMA con sus diferentes coberturas.
- Describir el perfil de liberación *in vitro* de GnRHa de implantes elaborados con colesterol/celulosa, alginato/PEGMA y EVAc.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1 Implantes de colesterol/celulosa

La elaboración de implantes de colesterol se realizó de acuerdo con el método descrito por Lee *et al.* (1986) usando dos proporciones diferentes de colesterol (Spectrum, No. Cat. CH135): 100% (Col100) y 95% colesterol más 5% de celulosa (Sigma Aldrich, No. Cat. C6429) (Col95) como aglutinante. Para los ensayos preliminares de liberación se usó BSA (Sigma Aldrich, No. Cat. A730) como proteína modelo, con un contenido de 100 µg de BSA en cada implante. Por otra parte, se elaboraron implantes control para cada tratamiento, es decir, implantes sin BSA, esto debido a que en ensayos preliminares se observó que existía una interferencia del colesterol y la celulosa con el método utilizado para la cuantificación de proteínas. De esta manera se pudo restar esta interferencia y obtener una cuantificación más precisa.

Se elaboraron 10 implantes de 30.1 mg para cada tratamiento, así como los respectivos controles. Para preparar los implantes de colesterol-celulosa, se prepararon 25 ml de solución de BSA disuelta en etanol al 50% con una concentración de 2mg/ml. En una balanza analítica (AND, FR-200) se pesaron 285 mg de colesterol y 15 mg de celulosa, se colocaron en una placa de plástico y se homogenizaron con una espátula, se agregaron 350 µl de la solución de BSA y se homogenizaron. En el caso de los controles solo se agregó etanol al 50% sin BSA. Debido a que la fabricación de los implantes no se realizó en una sola sesión la mezcla de colesterol-celulosa-BSA se dejó toda la noche en un desecador para protegerla de cualquier percance ambiental. En el caso de los implantes Col100, se pesaron 300 mg de colesterol y se siguió el procedimiento antes descrito. La siguiente sesión de fabricación de implantes consistió en colocar las mezclas Col100 y Col95 en una estufa (Boekel, Boekel Scientific) a 30°C por una hora para eliminar cualquier remanente de etanol, a continuación, la mezcla correspondiente a cada fórmula se homogenizó en un mortero y posteriormente se pesó en porciones de 30.1 mg. Cada porción se colocó en un molde de 3 mm de diámetro y posteriormente se prensó en una prensa para pelles (Parr Instruments Co., 2811), para finalmente obtener los implantes. Una vez terminados los implantes, fueron almacenados en frascos de 5 ml y colocados en refrigeración hasta su posterior uso.

Para la preparación de los implantes que contenían GnRHa solo se usó la proporción 95% colesterol y 5% celulosa, el procedimiento que se siguió fue el mismo que se describió anteriormente usando las proporciones de colesterol celulosa adecuadas para que cada implante al final tuviera un peso total de 60.2 mg con un contenido total de 200 µg de GnRHa (Sal hidratada de LH-RH etilamida acetato ([des-Gly10, D-Ala6]) (Sigma Aldrich, No. Cat. L4513).

2.2 Elaboración de implantes de alginato

Se prepararon implantes de alginato siguiendo la metodología descrita por Rubio-Elizalde *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Se siguieron dos procedimientos de gelificación: externa e interna. Para la gelificación externa se prepararon 5 ml de una solución con 3 % m/v de alginato de sodio (Sigma Aldrich, No. Cat. 180947) en agua desionizada, a la cual se le agregó 0.75% v/v de PEGMA (Sigma Aldrich, No.cat. 447943) y 20 mg de BSA. Por otra parte, se preparó una solución de CaCl_2 (Fermont, No.Cat. 24291) al 1.5% m/v, luego se colocaron alícuotas de 75 μl de la solución de alginato-PEGMA-BSA en 20 pozos de una microplaca de 96 pozos, posteriormente se añadieron a cada pozo 75 μl de la solución de CaCl_2 . Los hidrogeles resultantes se congelaron por 48 h a -20°C y se liofilizaron por 24 h. Es importante resaltar que la mezcla de las soluciones de alginato/PEGMA/BSA y CaCl_2 diluye la concentración de los componentes a la mitad por lo que los implantes obtenidos fueron de 1.5% de alginato de sodio/0.375% de PEGMA/300 μg de BSA por implante. Siguiendo el mismo procedimiento se elaboraron implantes control sin la adición de BSA.

Para la gelificación interna, se probaron diferentes soluciones de alginato de sodio (3, 4 y 5 % m/v) en agua desionizada. En todos los casos se evaluaron los controles respectivos. Se colocaron 5 ml de agua desionizada en vasos de precipitado y se agregó CaCO_3 (Fermont, No. Cat. 17252) en la cantidad equivalente de Ca^{2+} usada en el método descrito para gelificación externa con respecto a los porcentajes de alginato evaluados (ver cálculos en Anexo A), es decir, 0.067, 0.089 y 0.111 g de CaCO_3 para las soluciones de 3, 4 y 5 % m/v de alginato respectivamente, a continuación, las soluciones se sonicaron por 30 minutos para fraccionar las partículas de CaCO_3 . Posteriormente, a cada vaso se le agregaron 20 mg de BSA y la cantidad de alginato correspondiente, luego con la ayuda de un agitador magnético se mezclaron las soluciones. A continuación, se agregaron 0.75, 1 y 1.25 % v/v de PEGMA respectivamente para cada tratamiento. Para propiciar la liberación del calcio contenido en el CaCO_3 se preparó una solución de CH_3COOH al 0.2 % v/v en agua destilada. Se tomaron alícuotas de 75 μl de la solución alginato/BSA/PEGMA/ CaCO_3 y se colocaron en placas de 96 pozos, entonces se agregaron 75 μl de la solución de CH_3COOH a cada pozo y el contenido se homogenizó. Una vez que concluyó la gelificación del alginato, los hidrogeles se congelaron a -20°C por 48 h y a continuación se liofilizaron por 24h. En este caso, la mezcla de las soluciones diluyó las concentraciones de alginato y demás componentes a la mitad por lo que finalmente se obtuvieron implantes con 1.5, 2 y 2.5% de alginato de sodio. En los ensayos preliminares se observó que el alginato causaba interferencia con el método de cuantificación de proteína, por esta razón se elaboraron implantes sin proteína como control, para poder eliminar esta interferencia y obtener una cuantificación más precisa.

Para la preparación de implantes con GnRHa se siguió el mismo procedimiento de elaboración antes descrito, eliminando el uso de BSA y sustituyéndola con GnRHa, y en el caso de los implantes control no se agregó la hormona. Sin embargo, para esta evaluación se prepararon los implantes usando únicamente el tratamiento con 1.5% de alginato de sodio-PEGMA cubiertos con EVAc_i con una concentración de 200 µg de GnRHa por implante.

2.2.1 Cubierta HEMA- PEGMA para implantes de alginato

Para recubrir con HEMA-PEGMA los implantes de 1.5% de alginato con y sin la adición de PEGMA se siguió el método descrito por Castro- Ceseña *et al.*, 2016. Se añadieron por goteo 0.5 ml de HEMA (Sigma Aldrich, No. Cat. 477028) a una solución de PEGMA (Sigma Aldrich, No.cat. 447943) (75% M con respecto a HEMA) con 4.5 ml de agua destilada, y se mantuvieron en agitación constante. Posteriormente, se añadió EDGMA (Sigma Aldrich, No.cat. 335681) (4% M con respecto a HEMA) a esta solución. La polimerización inició con la adición de persulfato de amonio (Sigma Aldrich, No. Cat. A3678) (0.5 % M con respecto a HEMA) (ver cálculos en Anexo B). La reacción ocurrió a los 48°C y concluyó después de 110 minutos, se obtuvo una solución transparente ligeramente viscosa que se colocó en un baño de hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente.

El recubrimiento de los implantes de alginato se hizo sumergiéndolos en la cubierta HEMA-PEGMA por 1 minuto. Posteriormente, se retiraron de la solución y fueron colocados en placas de 96 pozos, luego se congeló la placa con los implantes cubiertos, por 24 h a -20°C y se liofilizó por 24 horas.

2.2.2 Cubierta de EVAc para implantes de alginato

La cubierta de EVAc estándar (EVAc_{st}) (Sigma Aldrich, No. Cat. 340502) se preparó de acuerdo con el método descrito por Mylonas *et al.* (2007) con algunas variantes. Se diluyeron 0.016 g de BSA en 0.75 ml de agua destilada, posteriormente, se agregaron 0.016 g de inulina (Sigma Aldrich, No. Cat. I3754) en 0.75 ml de agua destilada y se mezclaron con la solución de BSA. La solución resultante, se congeló a -20°C por 24 horas y se liofilizó por 24 horas más. Por otra parte, se añadieron 0.3 g de EVAc en 2ml de diclorometano y se mezclaron con vortex por 30 minutos, una vez disuelto el EVAc, se le agregó el polvo resultante de la liofilización de BSA/inulina y se mezcló en vortex nuevamente por 5 min. Finalmente, esta

mezcla fue sonicada por 1 min para fraccionar las partículas. Para evaluar dos variantes de la cobertura EVAc_{st}, se hicieron dos coberturas adicionales variando el método, en la primera se realizó el procedimiento antes descrito, pero sin la adición de BSA en la cobertura. La segunda variante de esta cobertura solo consistió en EVAc, sin la adición de BSA e inulina. De esta manera se evaluaron tres coberturas: EVAc/BSA/Inulina (EVAc estándar o EVAc_{st}), EVAc/Inulina (EVAc_i) y EVAc.

El recubrimiento de los implantes de 1.5% de alginato/PEGMA con las diferentes coberturas de EVAc se hizo sumergiendo los implantes en la solución correspondiente por 1 minuto, posteriormente, se retiraron de la solución y se colocaron en una malla de acero inoxidable para enjuagar con diclorometano el exceso de EVAc. Luego los implantes se congelaron a -20°C para evaporar el solvente de la cobertura.

2.2.3 Caracterización morfológica de implantes de alginato

La caracterización morfológica de los implantes de alginato con sus diversas coberturas se realizó a partir de cortes de los implantes obtenidos en un criostato (Leica CM 1510 S). Un molde de plástico fue llenado con un medio de inclusión para tejidos congelados (Sakura Finetek USA, Inc), posteriormente se sumergió el implante en este medio y se llevó al interior del criostato para su congelación a -24 °C. Una vez que la muestra estaba congelada se pasó a un sujetador de muestras donde se fijó la muestra colocando un poco más de medio de inclusión. Posteriormente la muestra se colocó en la posición adecuada para obtener los cortes de 60 µm, una vez que se obtuvo un buen corte se colocó en un portaobjetos y al sacarlo del criostato, con la diferencia de temperatura, el medio de inclusión se descongeló y se obtuvieron las secciones de cada implante. Cada sección fue observada y fotografiada en un estereoscopio con un aumento de 450x para posteriormente hacer una descripción morfológica de los implantes.

2.2.4 Hinchamiento de implantes de alginato con sus diferentes coberturas

Tres implantes de alginato-PEGMA de cada tratamiento con sus diferentes coberturas fueron medidos (diámetro y alto) y pesados individualmente, posteriormente, se colocaron en una placa de 48 pozos y se les agregaron 500 µl de solución Ringer. Se colocó la placa en un agitador orbital a 65 RPM y posteriormente cada 24 h se pesaron y midieron individualmente.

Se obtuvo el promedio de peso de los implantes de cada tratamiento en los diferentes tiempos y se calculó su índice de ganancia de peso de acuerdo con la fórmula descrita por Zhang *et al.*, (2006):

$$IGP = \frac{P_{tx} - P_{t0}}{P_{t0}} \quad (1)$$

Donde:

IGP= Índice de hinchamiento con respecto a la ganancia de peso

P_{tx} = Masa en el tiempo x

P_{t0} = Masa en el tiempo 0

Se obtuvo el promedio del diámetro y altura de los implantes en los diferentes tiempos para calcular su volumen a través del tiempo. Posteriormente, se obtuvo el índice de ganancia de volumen con la siguiente fórmula:

$$IGV = \frac{V_{tx} - V_{t0}}{V_{t0}} \quad (2)$$

Donde:

IGV= Índice de ganancia en volumen

V_{tx} = Volumen en el tiempo x

V_{t0} = Volumen en el tiempo 0

2.3 Elaboración de implantes EVAc

Los implantes de EVAc (Sigma Aldrich, No. Cat. 340502) se prepararon siguiendo el método descrito por Mylonas *et al.* (2007). Se prepararon ocho implantes con un contenido total de 300 µg de BSA a evaluar. Se diluyeron 0.0247g de BSA en 0.75 ml de agua destilada, luego en 0.75 ml de la solución de BSA se

diluyeron 0.016 g de inulina (Sigma Aldrich, No. Cat. I3754) y se mezclaron. La solución resultante se congeló por 24 horas a -20°C y se liofilizó por 24 h. Por otra parte, en 2 ml de diclorometano se agregaron 0.3 g de EVAc y se mezclaron con un vortex por 30 minutos. Una vez disuelto el EVAc, se le agregó el polvo resultante del liofilizado de BSA/inulina, luego, se mezcló la solución en vortex por 5 minutos y se sonicó por 1 minuto. La emulsión producida se vertió en un molde de aluminio ($2 \times 1 \times 3$ cm) previamente colocado en congelación, a continuación, el molde con la emulsión se congeló a -20°C por 24 h para que el solvente se evaporara. Una vez que se obtuvo una placa de EVAc solidificado, se cortaron los implantes usando un punzón dérmico de 3mm de diámetro. Debido a que la fabricación de estos implantes lleva incluida por defecto la inclusión de BSA adicional a la proteína evaluada, se fabricaron implantes control para restar la proteína liberada por estos a los implantes tratamiento y de esta manera poder obtener una cuantificación más precisa.

Para elaborar los implantes de EVAc con GnRHa se siguió el procedimiento descrito anteriormente. Sin embargo, en este caso se diluyeron 5000 μg de GnRHa en la solución de BSA para que finalmente los implantes quedaran con un contenido de 171 μg de GnRHa cada uno. De la misma manera, se elaboraron implantes control sin la adición de GnRHa.

2.4 Perfil de liberación *in vitro* de implantes de colesterol/celulosa, alginato-PEGMA y EVAc

La cuantificación de la liberación de proteínas *in vitro* de los implantes de colesterol, alginato y EVAc se realizó de acuerdo con el método descrito por Matsuyama *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Se preparó una solución Ringer (7.83g NaCl, 0.1865g KCl, 0.2205 g $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.203 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.069 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 1.26g NaHCO_3 / l de agua destilada) a un pH de 7.4. Se colocaron 5 implantes de cada tratamiento con sus respectivos controles en 5 pozos de una placa de 48 pozos y se les agregaron 500 μl de solución Ringer. La placa se colocó en un agitador orbital (Heidolph Unimax 1010) a 65 RPM, posteriormente se tomaron muestras de 150 μl por duplicado a las 2, 4, 24, 48 y 72 h para medir la liberación de proteína por el método de ácido bicinonínico (BCA por sus siglas en inglés), en cada medida se sustituyó el volumen total de solución Ringer en los implantes evaluados. La cuantificación de proteína se hizo siguiendo las recomendaciones del fabricante (Thermo scientific, No. Cat.23235), agregando 150 μl del reactivo del ensayo de proteína a 150 μl de las muestras de solución Ringer en placas de 96 pozos. Posteriormente la placa se agitó por 30 segundos para homogenizar las soluciones y se incubó por 2 horas

a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se retiraron las placas de la incubadora, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se leyeron en un espectrofotómetro (Beckman Coulter AD200) a 562 nm para cuantificar la cantidad de proteína en las muestras, utilizando una curva de calibración para BSA.

2.5 Análisis estadístico

A partir de los valores de concentración obtenidos en los análisis *in vitro* se obtuvieron los perfiles de liberación con un modelo polinomial para los diferentes implantes evaluados. Por otra parte, para determinar si existían diferencias significativas entre la liberación tipo estallido y la liberación acumulada se realizaron ANOVAs y pruebas de T-student. Se probaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas y se realizaron ANOVAs de una vía, tomando como variable independiente el tratamiento y como variable dependiente la cantidad inicial de proteína (BSA o GnRHa) liberada o el valor acumulado de proteína liberada. Para identificar las diferencias entre los tratamientos se realizaron pruebas de Tukey. Por otra parte, para los ensayos donde solo hubo dos tratamientos se cumplió con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, y se realizaron pruebas de T- student.

Para determinar la existencia de diferencias significativas en el índice de ganancia de peso entre tratamientos a las 24 y 72 horas se realizó un ANOVA de una vía, y una prueba a posteriori de Tukey. Sin embargo, a las 48 horas los datos no mostraron homocedasticidad de varianzas por lo que se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis. Finalmente, para los datos del índice de ganancia de volumen se realizaron ANOVAS de una vía entre tratamientos en los diferentes tiempos (24, 48 y 72h). Todos los análisis se hicieron con el 95% de confianza (α 0.05), con el programa R studio versión 3.1.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Liberación de BSA

3.1.1 Implantes de colesterol

Los implantes de colesterol (Col100 y Col95) que se obtuvieron tenían un peso promedio de 30.1 ± 0.2 mg, 3 mm de diámetro y 4.47 ± 0.21 mm de alto cada uno; eran de color blanco y de forma cilíndrica. En la figura 11 se observa la forma de estos implantes antes de colocarlos en la solución Ringer.

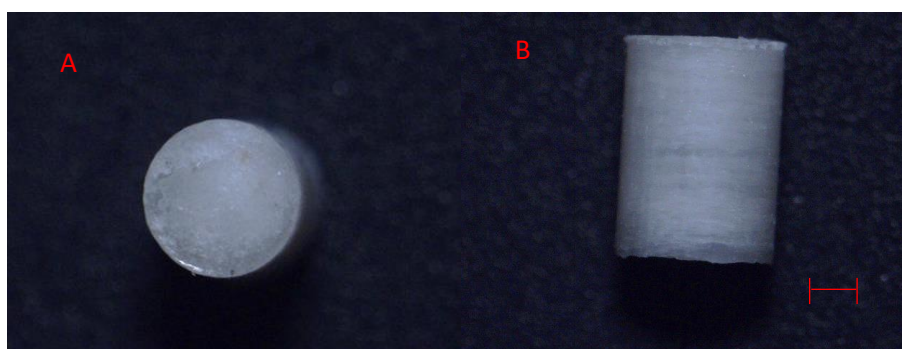


Figura 11. Implante con 95% colesterol y 5% celulosa. A, vista superior; B, vista lateral. La barra de escala indica 1 mm.

Para seleccionar el implante con las mejores características, se estudió el perfil de liberación de proteínas en los implantes de colesterol y colesterol-celulosa usando como proteína modelo la BSA. Se tomaron en consideración la consistencia (que no se fracturaran durante la evaluación), el perfil de liberación más prolongado y la cantidad acumulada de proteína liberada. En la figura 12 se observa que en ambos tratamientos hay una liberación tipo estallido a las 6 horas, sin embargo, aunque aparentemente la liberación tipo estallido fue más alta en los implantes Col95, no hubo una diferencia estadística significativa con respecto a los implantes Col100. La liberación de BSA se midió a las 8 h y posteriormente cada 24 horas a partir de la hora inicial (Figura 12). El implante Col100 liberó la BSA por 96 horas, mientras que los implantes Col95 liberaron por 72 horas. Por otra parte, en cuanto al porcentaje acumulado de liberación en ambos tratamientos, no se encontraron diferencias significativas, con un porcentaje de liberación acumulado de 36.04 y 45.78 % respectivamente. Derivado de los resultados antes descritos se eligió el tratamiento de Col95 para evaluar la liberación de GnRHa, ya que a pesar de que liberó proteína por menos tiempo, liberó un mayor porcentaje del contenido total de BSA en el implante. Además, la adición de

celulosa como aglutinante, les confiere a estos implantes una mayor estabilidad y reduce la posibilidad de fracturarse.

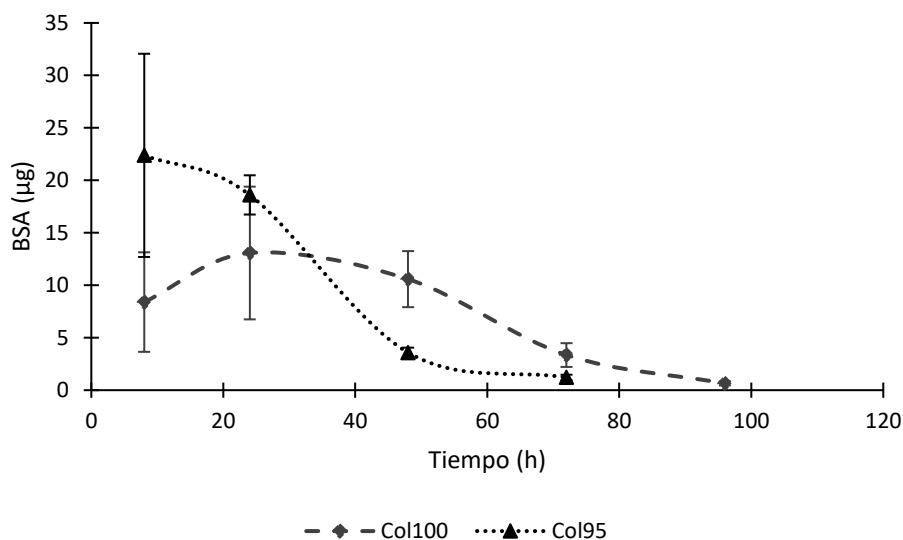


Figura 12. Perfil de liberación de albúmina de suero bovino (BSA) de implantes con diferentes proporciones de colesterol-celulosa (100-0 y 95-5%) y 100 µg de BSA. Promedio $\pm$ desviación estándar.

3.1.2 Implantes de alginato

3.1.2.1 Implantes alginato- PEGMA (gelificación externa)

En la figura 13 se muestra la estructura de los implantes de alginato-PEGMA elaborados con un método de gelificación externa usando CaCl_2 como reticulante. En promedio miden 6.08 ± 0.14 mm de diámetro, 3.65 ± 0.41 mm de altura y pesan 3.3 ± 0.45 mg. En la vista superior (Figura 13) se observa que la estructura de estos implantes es porosa; es probable que esta sea la causa de que la liberación de BSA sea muy rápida, ya que libera todo el contenido de proteína en un lapso de una hora.

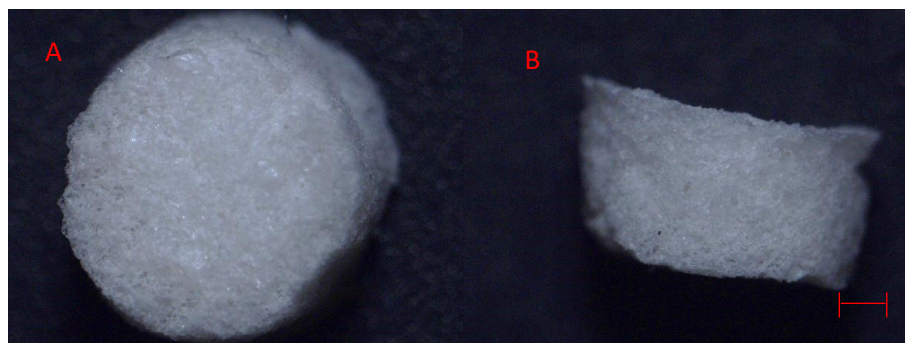


Figura 13. Implante alginato-PEGMA elaborado con el método de gelificación externa. A, Vista superior; B, vista lateral. La barra de escala indica 1 mm.

3.1.2.2 Implantes alginato- PEGMA (gelificación interna)

La figura 14 muestra la forma final de los implantes de alginato-PEGMA elaborados mediante gelificación interna usando CaCO_3 como agente reticulante. Tienen un peso promedio de 4.4 mg, 4.43 mm de diámetro y 3.07 mm de altura; son de color blanco y tienen una forma similar a un cilindro. Estos implantes fueron seleccionados para estudiar la liberación de BSA.

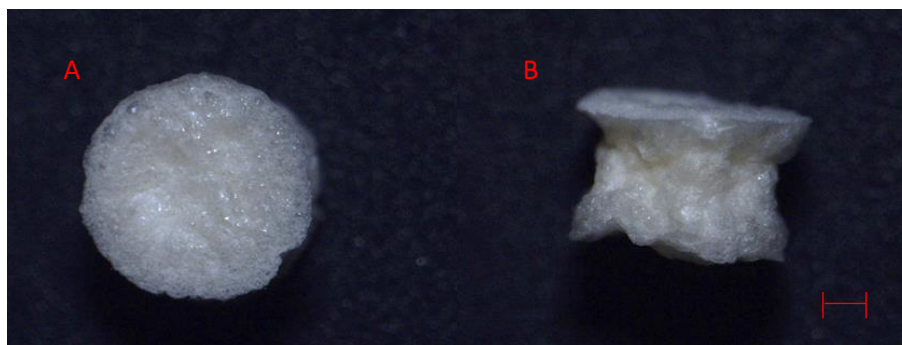


Figura 14. Implante de alginato –PEGMA, elaborado con el método de gelificación interna. A, vista superior; B, vista lateral. La barra de escala indica 1 mm.

Se evaluó el perfil de liberación de BSA de implantes de alginato usando diferentes porcentajes de alginato de sodio (1.5, 2 y 2.5 %), con y sin la adición de PEGMA en la matriz. La figura 15 muestra los promedios y desviación estándar de la liberación de BSA de los diferentes implantes, se observa que todos los implantes tienen una liberación tipo estallido a las 2 horas después de ser colocados en la solución Ringer, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. En las siguientes horas, se llevó a cabo la cuantificación de BSA liberada por los implantes: a) 1.5% de alginato sin PEGMA, b) 1.5% de alginato con PEGMA, c) 2% de alginato con PEGMA, y d) 2.5% de alginato con PEGMA, y se obtuvo un porcentaje acumulado de 53.6, 61.9, 65.1 y 81.5 % respectivamente, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. Cabe destacar que en todos los tratamientos el tiempo de liberación cuantificable por el método de detección de proteína fue de 48 horas. Derivado de los resultados anteriores fue necesario mejorar el desempeño de estos implantes, por lo que se eligió usar una cobertura de HEMA-PEGMA, únicamente en los siguientes implantes a) 1.5% de alginato sin PEGMA y b) 1.5% de alginato con PEGMA. Se eligieron solo estos tratamientos ya que se determinó que el uso de un porcentaje mayor de alginato no confería ninguna ventaja en la liberación tipo estallido y acumulada con respecto a los implantes con menor porcentaje de alginato.

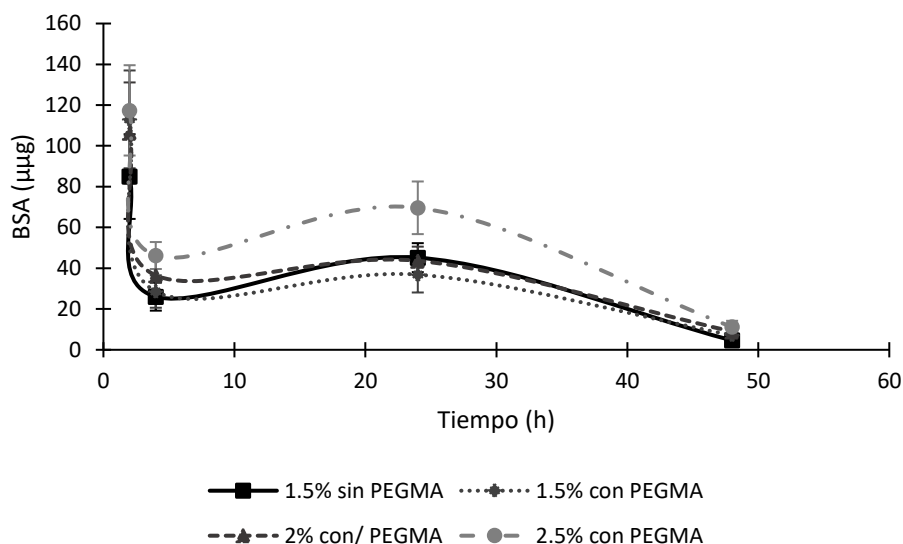


Figura 15. Perfil de liberación de albúmina de suero bovino (BSA) de implantes de alginato (1.5%) y alginato (1.5, 2 y 2.5%)-PEGMA, cada uno con 300 μ g de BSA. Promedio $\pm$ desviación estándar.

3.1.2.2 Implantes de alginato-PEGMA cubiertos con HEMA-PEGMA

Estos implantes tienen una forma similar a los implantes de alginato- PEGMA antes descritos ya que se elaboraron de la misma manera, sin embargo, con la finalidad de mejorar su desempeño en el perfil de liberación, se les agregó una cobertura de HEMA-PEGMA. Al igual que en el caso anterior, estos implantes son de color blanco y de forma cilíndrica. Pesan 13.23 ± 0.025 mg y miden 4.43 ± 0.11 mm de diámetro y 3.07 ± 0.63 mm de alto; la cobertura es transparente por lo tanto no se aprecia en las imágenes que se muestran en la figura 16.

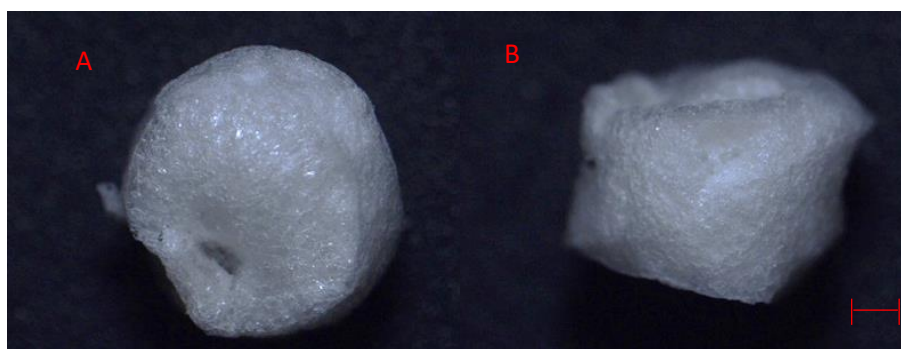


Figura 16. Implante alginato – PEGMA elaborado por el método de gelificación interna cubierto con HEMA-PEGMA. A, vista superior; B, vista lateral. La barra de escala indica 1 mm.

El perfil de liberación de los implantes de alginato de sodio (1.5%) con y sin PEGMA en la matriz y cubiertos con HEMA-PEGMA muestran una liberación tipo estallido a las 2 horas, evento similar al que ocurrió en

los implantes sin cobertura. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Así mismo, al comparar el porcentaje de liberación acumulado (64.33 y 79.60%) no hubo diferencias significativas. Sin embargo, el tiempo de liberación fue de 72 horas, mayor al compararlo con el de los implantes sin cobertura. Aunque se logró prolongar el tiempo de liberación, se buscó mejorar el desempeño de los implantes extendiendo el tiempo de liberación mayor al que presentaron los implantes Col95, por lo tanto, se usaron nuevas coberturas (EVAc) en los implantes elaborados con 1.5% de alginato de sodio con PEGMA en la matriz, se eligió este tratamiento derivado de la similitud estadística entre los tratamientos probados en esta evaluación (Figura 17).

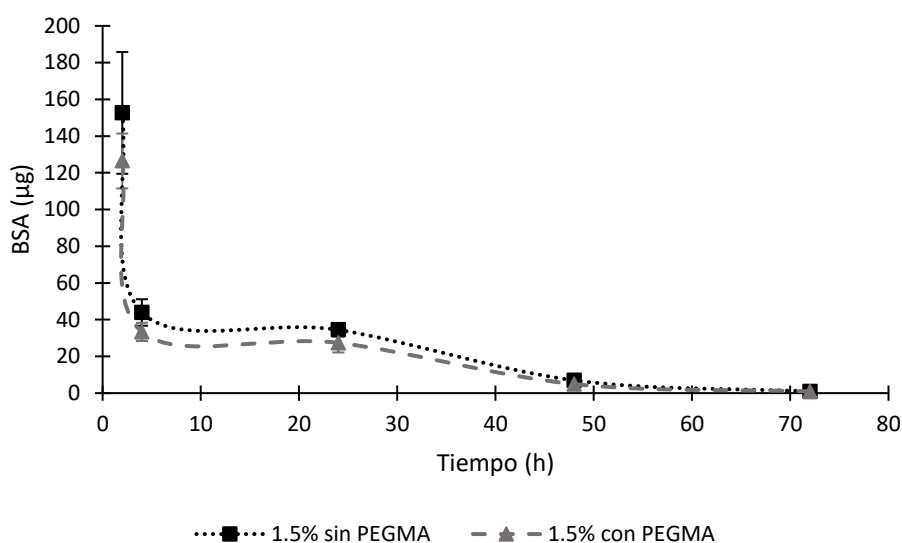


Figura 17. Perfil de liberación de albúmina de suero bovino (BSA) de implantes con 1.5% de alginato de sodio con y sin la adición de PEGMA en la matriz y con una cobertura adicional de HEMA-PEGMA y 300 µg de BSA. Promedio $\pm$ desviación estándar.

3.1.2.3 Implantes de alginato-PEGMA con diferentes coberturas de EVAc

En la figura 18 se muestra un implante de alginato (1.5%)–PEGMA, cubierto con EVAc. Estos implantes pesan 7.53 ± 0.94 mg y mide 4.11 ± 0.30 mm de diámetro y 2.32 ± 0.2 mm de alto. En la figura 18 también se destaca la cobertura de EVAc en los implantes.

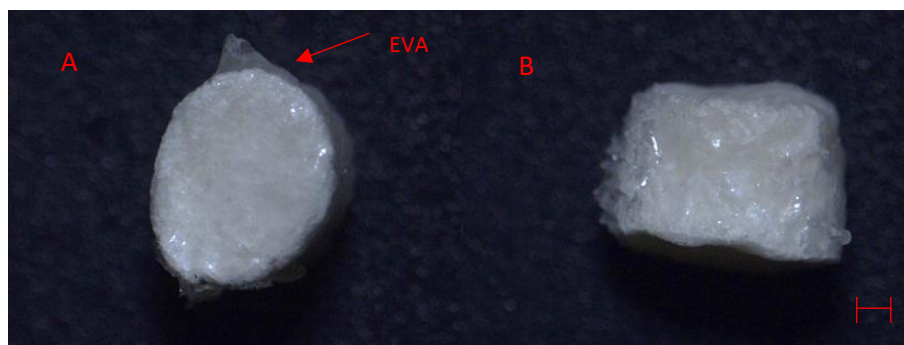


Figura 18. Implante de alginato- PEGMA elaborado por el método de gelificación interna cubierto con EVAc. A, vista superior; B, vista lateral. La flecha indica la cobertura de EVAc. La barra de escala indica 1 mm.

El análisis de liberación de BSA para los implantes de alginato (1.5%)-PEGMA con diferentes coberturas de EVAc ($EVAc_{st}$, $EVAc_i$ y EVAc), indicó que en todos los casos la liberación inicial es tipo estallido, pero ocurre en diferentes tiempos. Con la cobertura $EVAc_{st}$ se registró a las 2 horas, en contraste, con el resto de las coberturas la liberación tipo estallido se observó hasta las 24 horas. En este sentido, se encontraron diferencias significativas en la liberación entre los tratamientos $EVAc_{st}$ y $EVAc_i$ y resultó mayor en este último. De igual manera, el tratamiento con EVAc liberó una cantidad significativamente mayor de proteína ($p < 0.001$) en comparación con el tratamiento $EVAc_{st}$ (Figura 19).

En relación con la liberación acumulada de BSA, se liberó una mayor cantidad con la cobertura de EVAc (73.4%), en comparación con la cubierta $EVAc_{st}$ (55.8%) ($p = 0.02$). Entre los tratamientos $EVAc_i$ y EVAc, no se encontraron diferencias significativas. En los tres tratamientos el tiempo de liberación no mejoró con respecto a la que se presentó con los implantes cubiertos con HEMA-PEGMA (72 horas). Sin embargo, derivado de la similitud en las pruebas estadísticas entre los tratamientos de EVAc y $EVAc_i$ finalmente se eligió el último para probar la liberación de GnRHa, ya que a pesar de que el tratamiento $EVAc_{st}$ tuvo una liberación tipo estallido menor, la cantidad de proteína total liberada fue también menor comparada con los otros trataminetos y esto implica que se queda un remanente mayor de proteína atrapada en el implante, lo cual económicamente es menos viable.

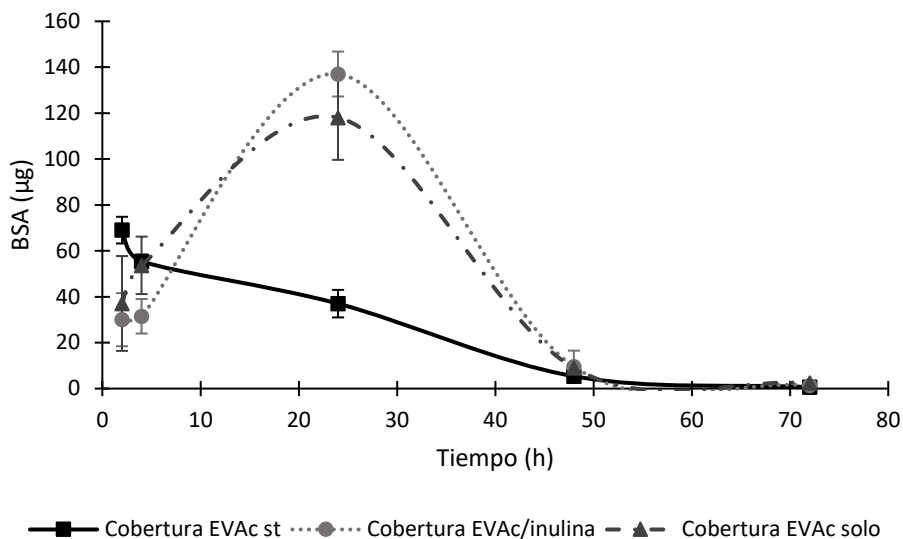


Figura 19. Perfil de liberación de albúmina de suero bovino (BSA) de implantes con 1.5% de alginato de sodio-PEGMA cubiertos con EVAc en distintas modalidades y con 300 µg de BSA. Promedio $\pm$ desviación estándar.

3.1.3 Caracterización morfológica de los implantes de alginato

Para la caracterización morfológica de los implantes de alginato con y sin coberturas, se realizaron cortes en un criostato (Figura 20). Los implantes de alginato-PEGMA elaborados mediante gelificación externa forman un material poroso, y en las secciones que se obtuvieron no fue posible apreciar esta característica, ya que una vez que se descongeló el gel de inclusión la muestra se hidrató rápidamente y se perdió su estructura. De la misma forma, el implante de alginato-PEGMA elaborado mediante gelificación interna muestra una estructura interna porosa. El corte del implante con la cobertura de HEMA-PEGMA no se pudo observar claramente, ya que no se obtuvo un buen corte de este implante, sin embargo, la estructura interna debe ser igual al implante que se describió anteriormente ya que el método de fabricación fue el mismo únicamente se adicionó la cobertura (no se observa en la figura). Por último, es posible observar la cobertura de EVAc alrededor del corte, esto evidencia claramente que las coberturas con este material se mantuvieron en buenas condiciones mientras los implantes eran manipulados.

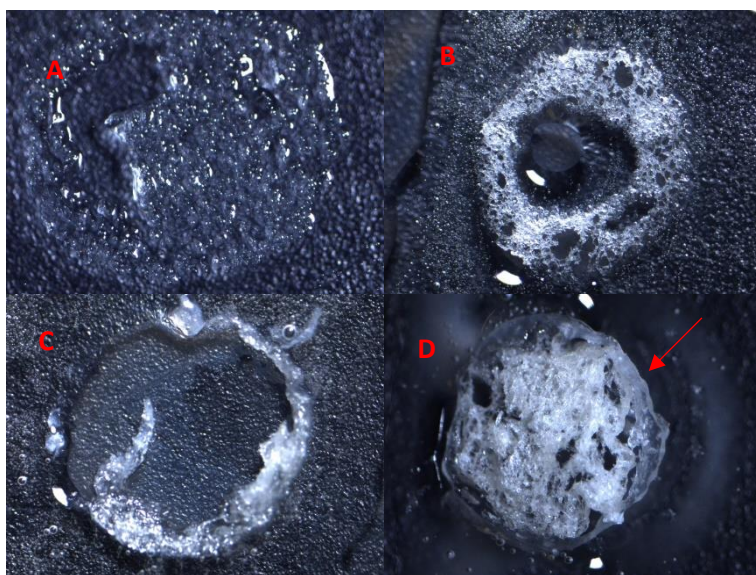


Figura 20. Cortes en microtomo de implantes de alginato-PEGMA. A, alginato-PEGMA (método de gelificación externa); B, alginato-PEGMA (gelificación interna); C, alginato-PEGMA (gelificación interna) cubierto con HEMA-PEGMA; D, alginato-PEGMA (gelificación interna) cubierto EVAc_{st}, la flecha señala esta cobertura.

3.1.4 Hinchamiento de implantes de alginato

Los implantes de alginato fabricados por gelificación externa fueron medidos y pesados antes de ser evaluados en la solución Ringer, sin embargo, después de 24 horas, por su grado de desintegración ya no pudieron ser manipulados para obtener medidas adicionales (Figura 21).

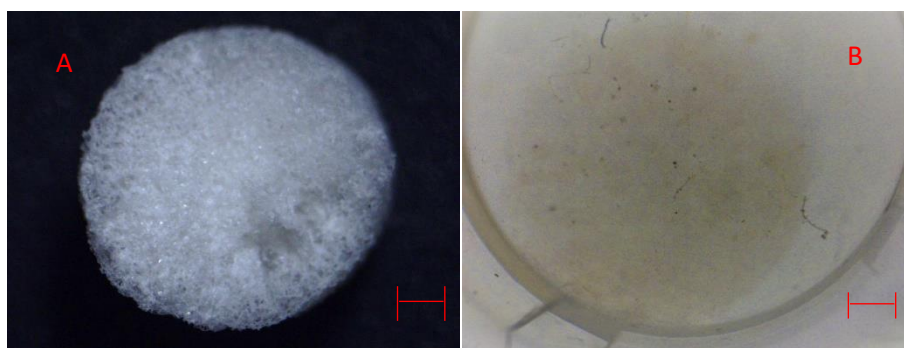


Figura 21. Implante de alginato-PEGMA (gelificación externa). A, vista superior; B, implante dentro de solución Ringer después de 24 horas. La barra de escala indica 1 mm.

Por su parte los implantes elaborados mediante gelificación interna sin cubrir (Figura 22), mostraron un claro hinchamiento que fue registrado hasta las 48 horas, periodo durante el cual liberaron BSA. Los implantes cubiertos con HEMA-PEGMA (Figura 23) fueron monitoreados de igual manera que los anteriores y mostraron una tendencia clara a hidratarse conforme el tiempo transcurrió. Por último, los implantes de alginato con las diferentes coberturas de EVAc (Figuras 24, 25 y 26), se pesaron y midieron por 72 horas.

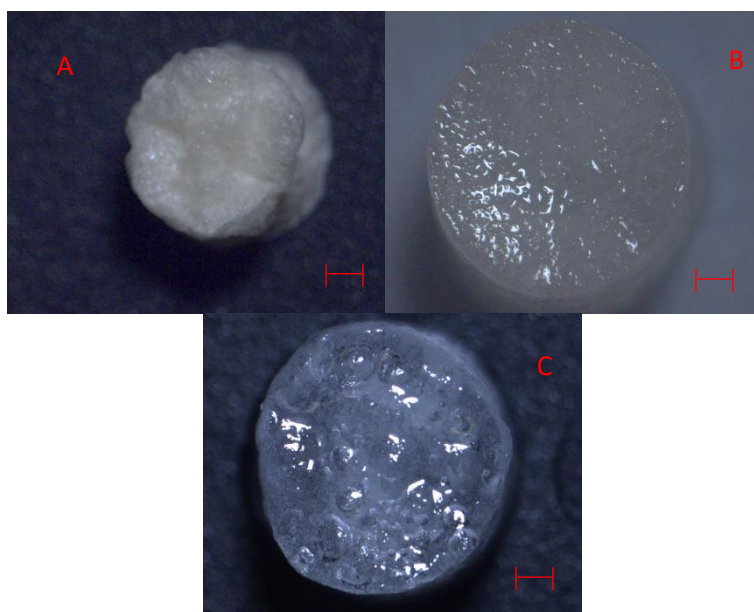


Figura 22. Implante alginato-PEGMA (gelificación interna). A, implante antes de sumergirse en solución Ringer; B, 24 h; y C, 48 h después de sumergirlos en solución Ringer. La barra de escala indica 1 mm.

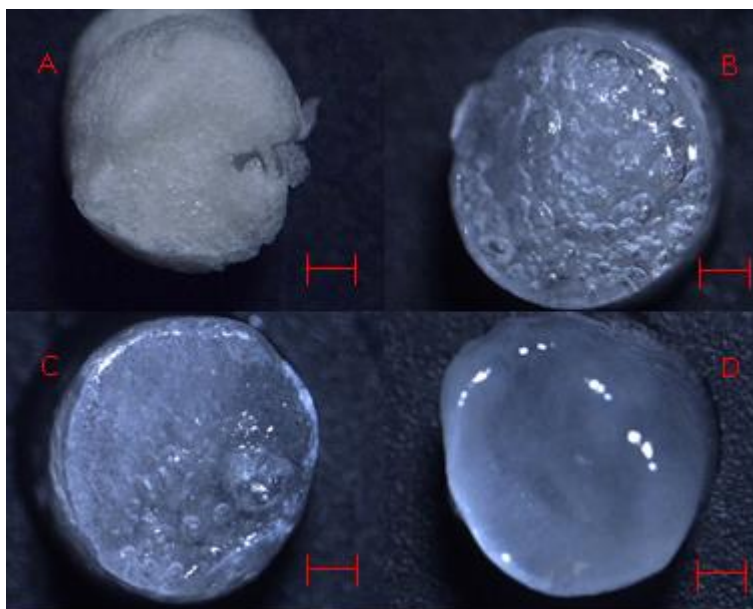


Figura 23. Implante alginato-PEGMA (gelificación interna) cubierto con HEMA-PEGMA, sumergidos en solución Ringer. A, implante antes de sumergirse en solución Ringer; B, 24 h; C, 48 h; D, 72 h después de sumergirlos en solución Ringer.

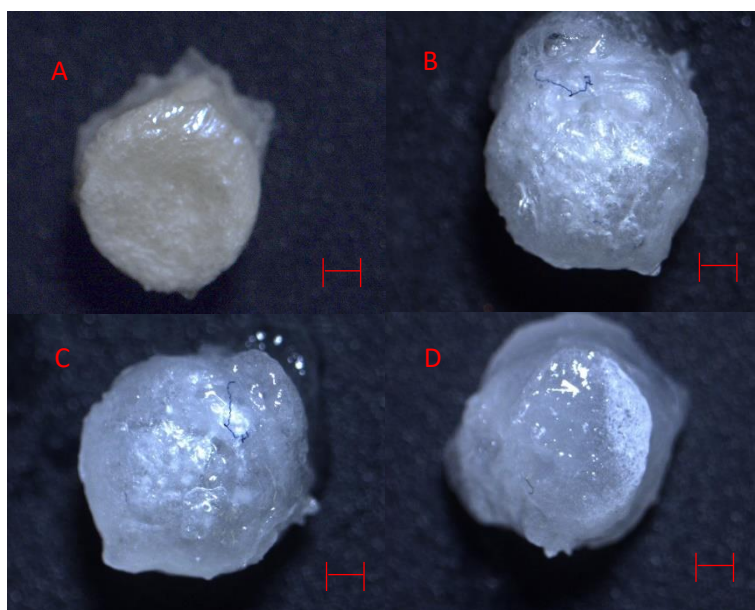


Figura 24. Implante alginato-PEGMA cubierto con EVAc_{st}. A, implante antes de sumergirse en solución Ringer; B, 24 h; C, 48 h; y D, 72 h de después de sumergirlos en solución Ringer. La barra de escala indica 1 mm.

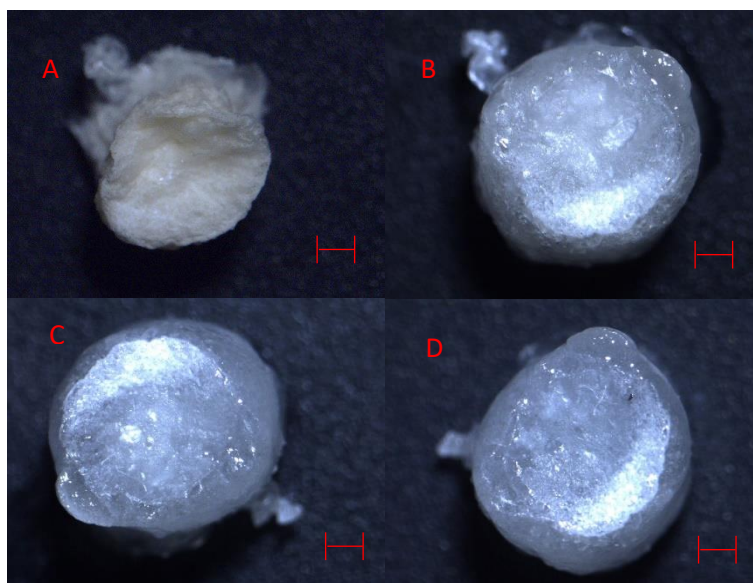


Figura 25. Implante alginato-PEGMA cubierto con EVAc/Inulina. A, implante antes de sumergirse en solución Ringer; B, 24 h; C, 48 h; y D, 72 h después de sumergirlos en solución Ringer. La barra de escala indica 1 mm.

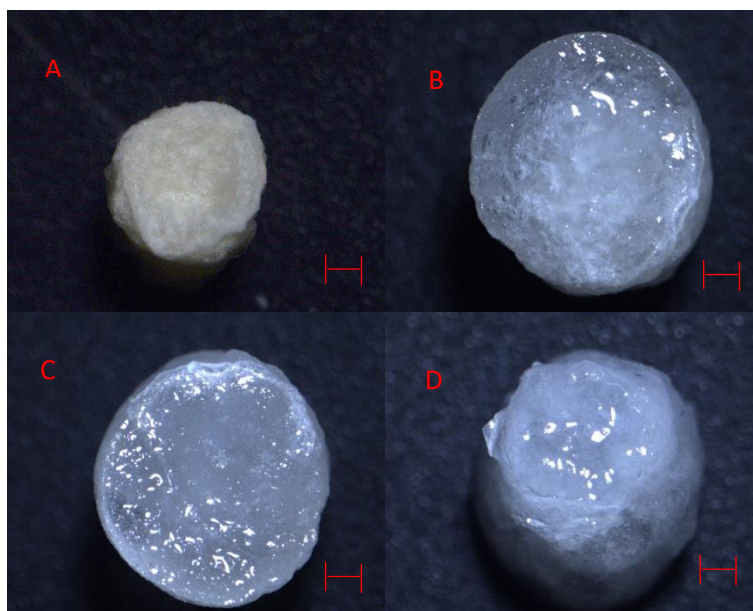


Figura 26. Implante alginato-PEGMA cubierto con EVAc. A, implante antes de sumergirse en solución Ringer; B, 24 h; C, 48 h; y D, 72 h después de sumergirse en solución Ringer. La barra de escala indica 1mm.

La evaluación del proceso de hinchamiento mediante la ganancia de peso de los diferentes implantes de alginato se hizo en el periodo en el que los implantes liberaron BSA. A excepción de los implantes elaborados por el método de gelificación externa, que se desintegraron después 24 horas, al comparar el proceso de hinchamiento del resto de los implantes se encontraron diferencias significativas ($p= 0.00$), entre los que fueron elaborados mediante gelificación interna sin cobertura y los demás tratamientos con diferentes coberturas, ya que los primeros implantes aumentaron en peso más de 20 veces a las 24 horas. Entre los tratamientos restantes no se encontraron diferencias significativas (Tabla 2).

A las 48 horas los datos no mostraron homocedasticidad de varianzas, por lo tanto, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, pero es notable que en todos los casos la ganancia de peso continuó en aumento, no obstante, el incremento no fue tan drástico como a las 24 horas. Finalmente, a las 72 horas solo se evaluaron los implantes que tenían las diferentes coberturas de EVAc, en estos tratamientos no se encontraron diferencias significativas en la ganancia de peso, es notable también que en este tiempo, los implantes cubiertos con EVAc_{st} y EVAc_i ya no ganaron peso (Tabla 2).

Tabla 2. Índice de ganancia de peso de diferentes implantes de alginato-PEGMA a través del tiempo. Las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos a>b.

Tratamiento/ Tiempo (h)	Alginato- PEGMA (gelificación interna)	Alginato- PEGMA cubierto HEMA - PEGMA	Alginato- PEGMA cubierto EVAc st	Alginato- PEGMA cubierto EVAc/ inulina	Alginato- PEGMA cubierto EVAc
24	23.84 ± 0.89 ^a	6.54 ± 0.37 ^b	6.60 ± 1.66 ^b	7.89 ± 0.96 ^b	8.18 ± 0.34 ^b
48	24.39 ± 1.25	6.62 ± 0.38	7.51 ± 2.11	8.97 ± 0.97	8.82 ± 0.07
72	-	-	6.85 ± 2.25	8.82 ± 1.18	8.85 ± 0.09

Se evaluó la ganancia de volumen de los diferentes implantes de alginato durante el periodo de tiempo que liberaron BSA. Se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, independientemente del tiempo evaluado. No obstante, es importante destacar que a las 24 horas en todos los implantes se incrementó el volumen (Tabla 3).

Tabla 3. Índice de ganancia de volumen de diferentes implantes de alginato-PEGMA a través del tiempo.

Tratamiento/ Tiempo (h)	Alginato- PEGMA (gelificación interna)	Alginato- PEGMA cubierto HEMA - PEGMA	Alginato- PEGMA cubierto EVAc st	Alginato- PEGMA cubierto EVAc/ inulina	Alginato- PEGMA cubierto EVAc
24	2.08 ± 0.52	0.77 ± 0.38	1.68 ± 0.79	1.62 ± 1.27	1.44 ± 0.49
48	2.09 ± 0.55	0.55 ± 0.08	1.57 ± 0.68	1.22 ± 0.56	1.92 ± 0.99
72	-	-	0.66 ± 0.65	1.14 ± 1.19	1.68 ± 0.67

3.1.5 Implantes de EVAc

Los implantes de EVAc evaluados para la liberación de BSA y GnRH α se muestran en la figura 27. Estos implantes son de color blanco, con una forma casi cilíndrica. Pesan en promedio 13.58 ± 1.20 mg, miden 3 mm de diámetro y 1.71 ± 0.10 mm de alto.



Figura 27. Implante de EVAc. A, vista superior; B, vista lateral.

El perfil de liberación de BSA de los implantes de EVAc se muestra en la figura 28. Es importante destacar que como se describió previamente en el apartado de materiales y métodos, la fabricación de estos implantes incluye la adición de BSA extra a la que se agregó para evaluar la liberación, por esta razón, fue necesario tener implantes control para restar la proteína liberada que es parte de la matriz diseñada por Mylonas *et al.* (2007), de esta manera se pudo corregir la cantidad de proteína liberada por estos implantes. La cantidad de proteína liberada por los implantes control es poca (1.19%) con respecto a los implantes tratamiento (10.46%).

Es destacable que los implantes de los tratamientos, al igual que los implantes anteriores elaborados con diferentes excipientes, también muestran una liberación tipo estallido a las 24 horas. No obstante, solo se registraron datos de liberación de BSA hasta las 96 horas ya que a las 120 horas la proteína no fue detectada por el método de cuantificación, sin embargo, es probable que, si la cuantificación se hubiera hecho después de varios días de incubación, se hubiera podido detectar por el kit de cuantificación de proteína.

Por otra parte, es importante destacar que la liberación de estos implantes es lenta, de hecho, hasta la última cuantificación que se hizo (96 horas) solo se había acumulado un 10.46% del total del contenido original de BSA en el implante (Figura 28).

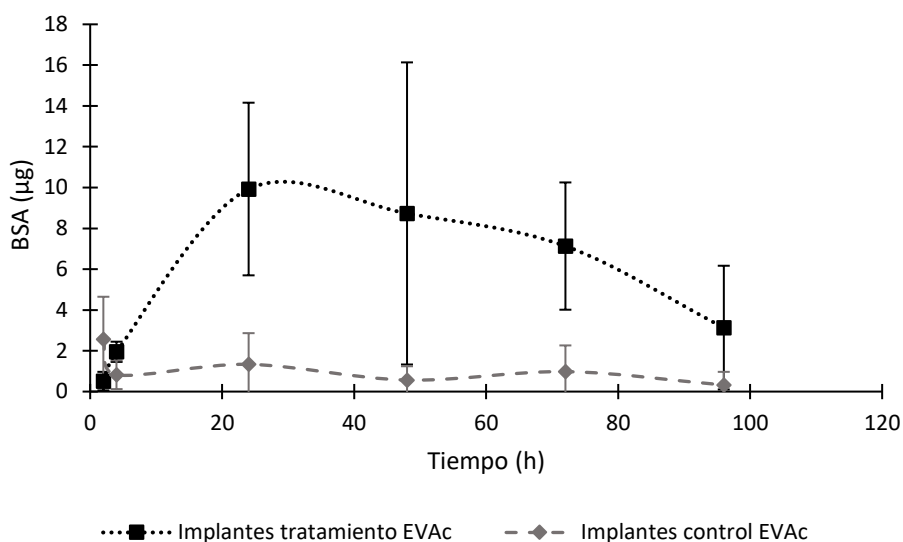


Figura 28. Perfil de liberación de albumina de suero bovino (BSA) de implantes tratamiento de EVAc con 300 µg de BSA+ 571 µg y un control con 571 µg de BSA. Promedio $\pm$ desviación estándar.

3.2 Liberación de GnRHa

3.2.1 implantes de colesterol y alginato- PEGMA cubiertos EVAc/inulina

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de liberación con BSA, para estudiar la liberación de GnRHa, se eligieron los implantes de colesterol y alginato que dieron como resultado las mejores curvas de liberación de BSA. Por lo tanto, en este caso se usaron los implantes con 95% colesterol, 5% celulosa como primer tratamiento, e implantes con 1.5% de alginato-PEGMA cubiertos de EVAc/inulina como segundo tratamiento.

El perfil de liberación de proteína equivalente a GnRHa de estos implantes se muestra en la figura 29. No se encontraron diferencias significativas en la liberación tipo estallido entre los tratamientos. Sin embargo, es importante destacar que esta liberación tipo estallido de los implantes de alginato se dio a las 6 horas, mientras que en los implantes de colesterol se dio hasta las 48 horas. Además, se probó que existían diferencias significativas entre el porcentaje acumulado de GnRHa liberada de cada implante ($p= 0.003$). Los implantes de colesterol liberaron el 49.93% de su contenido total, mientras que los implantes de alginato-PEGMA liberaron el 62.1% de su contenido total. Sin embargo, es importante destacar la diferencia en el tiempo de liberación en ambos tratamientos, ya que mientras los implantes de colesterol liberaron por 192 horas, los implantes de alginato solo liberaron por 72 horas.

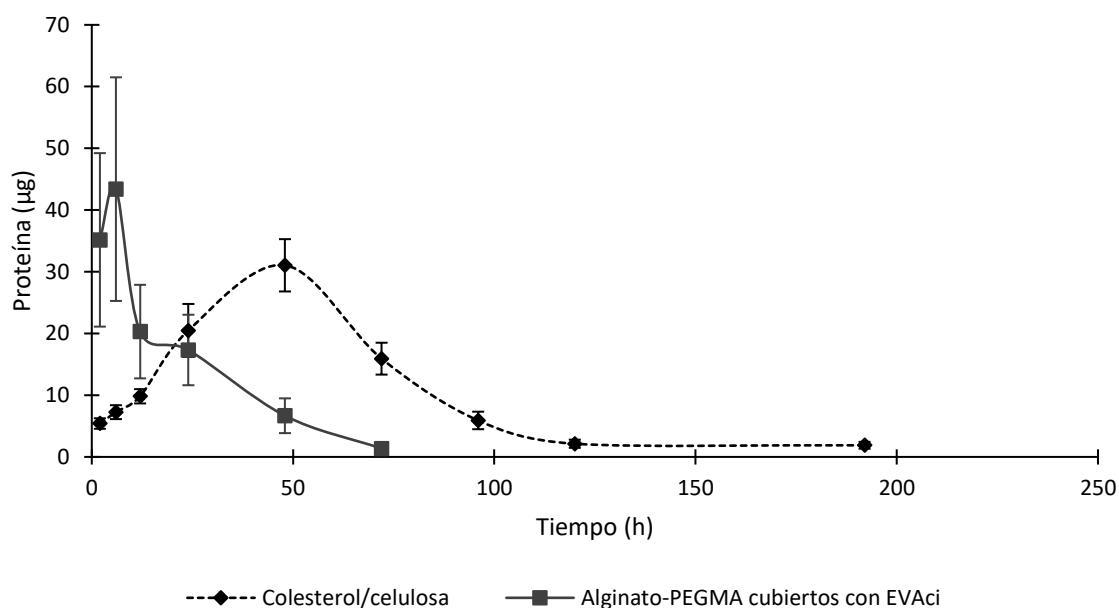


Figura 29. Perfil de liberación de proteína de los implantes de colesterol/celulosa (95 y 5%) e implantes con 1.5% de alginato de sodio-PEGMA cubiertos de EVAc/inulina. Cada implante contenía 200 µg de GnRHa. Promedio $\pm$ desviación estándar.

3.2.3 Implantes de EVAc

En la figura 30 se muestra el perfil de liberación de BSA y GnRHa de los implantes de EVAc. Como se explicó anteriormente, el método de preparación de estos implantes incluye la adición de BSA en la matriz. En los ensayos preliminares se evaluó la liberación de BSA de estos implantes, considerando la proteína (BSA) necesaria para la elaboración de la matriz y el contenido de la proteína que se quería liberar (BSA). Sin embargo, en este ensayo, en el que se sustituyó la BSA por GnRHa, no se logró discernir claramente la liberación de la hormona, ya que la liberación de BSA de los implantes control, fue mayor (11.12%) en comparación con la cantidad liberada en los ensayos preliminares (1.19%). Además, al restar la cantidad de proteína liberada (BSA) de los implantes control a los implantes con GnRHa, los resultados fueron incongruentes en dos réplicas, donde aparentemente no había liberación, por esta razón, estas réplicas se eliminaron de los cálculos con los que se obtuvo este perfil. La duración de la liberación de proteína en estos implantes se extendió hasta las 336 horas. No obstante, debido a las limitantes para cuantificar con precisión la fracción de proteínas que corresponde a la GnRHa, estos resultados son poco confiables.

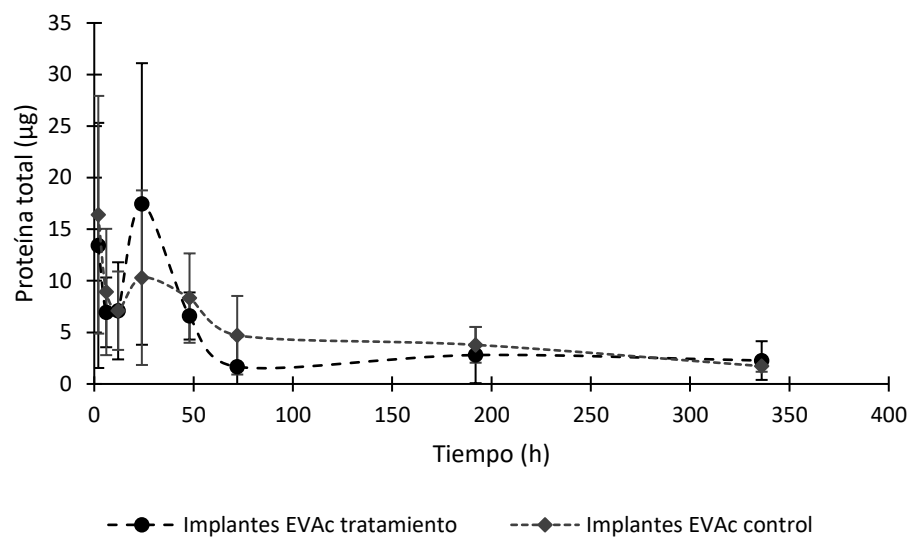


Figura 30. Perfil de liberación de proteína de implantes de EVAc. Promedio $\pm$ desviación estándar.

Capítulo 4. Discusión

En este estudio se desarrollaron y describieron protocolos de preparación de implantes con diferentes excipientes (colesterol-celulosa, alginato- PEGMA y EVAc) y algunas coberturas para los implantes de alginato (HEMA-PEGMA y EVAc). También se evaluó, describió y comparó el perfil de liberación *in vitro* de estos implantes usando como proteína modelo la BSA para finalmente elegir el mejor implante de cada excipiente y probarlo en la liberación *in vitro* de GnRHa. Para la elección de cada implante con potencial para la liberación de GnRHa se tomó en cuenta el tiempo de liberación, tiempo en el que se presenta la liberación tipo estallido, la liberación acumulada y en el caso de los implantes de colesterol también se tomó en cuenta la consistencia de los implantes, es decir, los implantes que fueron menos susceptibles a romperse.

4.1 Liberación de BSA

4.1.1 Implantes de colesterol

No se encontraron estudios previos que describan la liberación de BSA a partir de implantes elaborados a base de colesterol-celulosa, sin embargo, Sherwood *et al.* (1988) estudiaron la liberación de GnRHa usando implantes con diferentes porcentajes de colesterol (0, 25, 50, 75, 95 y 100 %) complementando el resto con celulosa (100, 75, 50, 25,5 y 0 %). Estos autores determinaron que los implantes con un mayor contenido de celulosa (25-100%) liberaban alrededor del 90% de total de su contenido en las primeras 24 horas en comparación con los implantes con menor inclusión de celulosa (0-5%) donde a las 24 horas solo habían liberado del 5-6 % de su contenido total, así mismo, estipulan que hay una liberación tipo estallido en las primeras horas (1 y 3 h) en todos los tratamientos, siendo esta significativamente mayor en los tratamientos donde el contenido de colesterol era más bajo. Las diferencias en el tiempo de liberación, así como en la intensidad de la liberación tipo estallido se atribuyen a la adición de celulosa y a los canales que forma cuando esta se hidrata debido a su naturaleza. En este sentido, los resultados de este ensayo difieren de lo descrito por estos autores, ya que en los tratamientos Col95 y Col100 la liberación tipo estallido se presentó a las 8 y 24 h respectivamente, además, el porcentaje liberado a las 24 h en los tratamientos fue de 18 y 13% respectivamente. Es probable que estos resultados se deban a variaciones en el proceso de fabricación de los implantes, ya que, a pesar de seguir los procedimientos descritos en trabajos anteriores, no es posible replicar de manera exacta el procedimiento, es decir, hay condiciones

que no se pudieron controlar, por ejemplo, la presión que se aplicó en la prensa para elaborarlos. Probablemente la presión con la que se elaboraron estos implantes fue menor en comparación con la de otros trabajos y esto ocasionó que la estructura del implante fuera más porosa.

Por otra parte, es importante destacar la duración del tiempo de liberación de la proteína observado en este experimento, ya que con los tratamientos de 95 y 100%, después de las 72 y 96 horas respectivamente, no se detectó proteína liberada. Estos resultados difieren de los descritos por Sherwood *et al.* (1988) y Matsuyama *et al.* (1995), en el primer estudio reportan la liberación de proteínas hasta los 28 días con una liberación acumulada del 36 al 38% de su contenido total, mientras que, en el segundo estudio, la liberación se prolonga hasta el día 70. La diferencia entre los resultados de este trabajo y los estudios anteriores puede deberse primero a las diferencias entre las proteínas estudiadas, específicamente al tamaño de estas moléculas. La BSA es una proteína formada por 583 aminoácidos, mientras que la GnRHa solo está formada por 10, por lo que la diferencia en los pesos moleculares es grande. Por otra parte, la sensibilidad de las técnicas de cuantificación varía entre ensayos, en este ensayo el rango mínimo de detección de proteína fue de 2 µg/ml, esto sugiere que se pudo haber detectado nuevamente la liberación de proteínas si se hubiera permitido su acumulación durante varios días sin cambiar la solución Ringer. Otro aspecto que resultó importante en este experimento para la elección del implante más adecuado para la evaluación de la liberación de GnRHa fue la facilidad de elaboración y manejo. Se eligió el implante formulado con el 95% colesterol y 5% de celulosa, ya que la celulosa actúa como aglutinante para el colesterol (Sherwood *et al.*, 1988), lo que hace a los implantes menos susceptibles a romperse.

4.1.2 Implantes de alginato

El alginato es un biopolímero no tóxico abundante en la naturaleza, es ampliamente usado en diversas industrias. Tiene diferentes propiedades que le permiten ser utilizado como excipiente en la industria farmacéutica para la encapsulación y suministro de diversas proteínas. Entre estas propiedades se incluyen: 1) un entorno acuoso relativamente inerte dentro de la matriz; 2) un proceso de encapsulación a temperatura ambiente y libre de solventes orgánicos; 3) una alta porosidad del gel, que permite velocidades altas de liberación de macromoléculas y 4) la capacidad de controlar la porosidad con recubrimientos simples (Gombotz y Wee, 1998; Tonnesen, 2002; Kristiansen *et al.*, 2009; Lee y Monney, 2012).

Por lo anterior, se eligió este material para encapsular las proteínas y evaluar su liberación, hipotetizando que la liberación de proteína sería más lenta y prolongada al ser comparada con otros excipientes. La gelificación del alginato generalmente se hace por reticulación iónica, que puede ser externa, con el uso de cloruro de calcio como reticulante, o interna, con el uso de una sal insoluble en agua, como el CaCO_3 (Draget, 2009; Paques *et al.*, 2014). Inicialmente, se evaluaron implantes elaborados por el método de gelificación externa, con 1.5 % de alginato de sodio y 0.375% de PEGMA, sin embargo, la liberación total de BSA se completó en un periodo de una hora después del inicio de la evaluación, por lo tanto, para los propósitos de este estudio esta técnica no funcionó. Es probable que estos resultados se debieran a la alta porosidad en la estructura interna de los implantes, lo que provocó una hidratación muy rápida de la matriz de alginato. Sin embargo, en otros estudios, esta cualidad de los hidrogeles de alginato ha dado buenos resultados en aplicaciones biotecnológicas como la cicatrización de heridas (Rubio-Elizalde *et al.*, 2019).

Por los resultados anteriores fue necesario buscar una alternativa para la elaboración de estos implantes, con la finalidad de mejorar su desempeño, alargando el tiempo de liberación, así como su consistencia. Se sabe que el incremento en el porcentaje de alginato en las matrices propicia la formación de geles más consistentes (Bonilla, 2016), aunado a esto, el cambio en el método de gelificación podría resultar en implantes con un periodo de liberación más largo. Todos los implantes: a) 1.5% de alginato sin PEGMA, b) 1.5% de alginato con PEGMA, c) 2% de alginato con PEGMA, y d) 2.5% de alginato con PEGMA tuvieron un perfil de liberación similar que duró 48 horas, además, todos los tratamientos presentaron una liberación tipo estallido a las 6 h después de iniciar su evaluación. Al comparar estos resultados con los obtenidos en los implantes elaborados por gelificación externa es evidente una mejora importante en el tiempo de liberación, sin embargo, aumentar el porcentaje de alginato no mostró ventajas evidentes sobre los implantes con un contenido menor de alginato elaborados por gelificación interna. Gombotz y Wee (1998), han descrito que es posible reducir la velocidad de liberación de fármacos a partir de matrices de alginato cuando se les agrega una cobertura adicional (ej. Poli-L-Lisina), ya que de esta manera se reduce la porosidad del hidrogel. En este estudio se evaluó la adición de una cobertura de HEMA-PEGMA en implantes de alginato, ya que redujo en forma eficiente la fuga celular desde esferas preparadas a partir de alginato de sodio (Castro-Ceseña *et al.*, 2016). A tal efecto, los implantes que se recubrieron con esta cobertura extendieron el tiempo de liberación hasta las 72 horas, sin embargo, la liberación tipo estallido se presentó nuevamente a las 6 h después de iniciar la evaluación.

Aunque los resultados obtenidos con los implantes cubiertos con HEMA-PEGMA mostraron una clara ventaja respecto a los implantes sin cubierta, para los propósitos de este estudio fue necesario probar

coberturas diferentes con el objetivo de alargar más el tiempo de liberación de proteínas. Por ser el EVAc un polímero biocompatible e insoluble en agua (Schneider *et al.*, 2017), se probaron tres coberturas diferentes para los implantes (1.5% de alginato de sodio-PEGMA) a base de EVAc: 1) EVAc_{st}; 2) EVAc_i y 3) EVAc. En los tres casos se presentó una liberación tipo estallido, sin embargo, esta se presentó en distintos tiempos, EVAc_{st} la presentó a las 2 h después del inicio de la evaluación, mientras que los dos tratamientos restantes la presentaron a las 24 h pero en mayor proporción. Se ha reportado que la adición de BSA e inulina en la matriz de EVAc genera canales cuando el agua penetra el interior de la matriz y disuelve la BSA e inulina, así mismo que la proporción BSA:inulina controlan la velocidad de liberación (Mylonas y Zohar, 2001); lo anterior podría explicar que la liberación tipo estallido del tratamiento EVAc_{st} se haya presentado antes, sin embargo, esto no justifica que estos implantes hayan liberado solamente el 55.8% de su contenido total, ya que de acuerdo con lo antes descrito se habría esperado que este tratamiento hubiera liberado una mayor proporción de proteínas que los tratamientos EVAc_i y EVAc. En cuanto al tiempo de liberación, la proteína fue detectada hasta las 72 h después de que inició la evaluación en los tres tratamientos, en este sentido, los implantes no mejoraron su desempeño respecto a los cubiertos con HEMA-PEGMA, sin embargo, al menos en dos tratamientos la liberación tipo estallido se retrasó en comparación con estos.

Derivado de la similitud de los resultados obtenidos para los implantes cubiertos con EVAc_i y EVAc, se eligió el implante alginato-PEGMA cubierto con EVAc_i para probar la liberación de GnRHa *in vitro*, ya que la liberación tipo estallido inicial se registró hasta las 24 h y liberó una cantidad mayor de proteína en 72 h comparado con el implante cubierto con EVAc_{st}, esto, en términos económicos se traduciría en una menor pérdida, ya que en este caso el implante no retendría tanta proteína. Sin embargo, desde otro punto de vista es importante recordar que la GnRHa tiene un periodo de vida media en el organismo de 23 min (Zohar, 1988; Crim y Bettles, 1997), por lo que en ensayos *in vivo* aunque la proteína sea liberada en grandes cantidades como se refleja en la liberación tipo estallido, su efecto inductor solo requeriría la concentración necesaria de la hormona para desencadenar los efectos en la maduración y el excedente, en el mejor de los casos no sería útil. En este sentido, los implantes cubiertos con EVAc_{st} también tienen un perfil de liberación prometedor, ya que mostraron una liberación tipo estallido menor que las otras cubiertas, además, su perfil de liberación fue más sostenido, sin embargo, es importante evaluar si la concentración de la hormona liberada es suficiente para inducir el desove en diferentes especies de peces.

Para describir las características físicas de los implantes de alginato con diferentes coberturas, en este estudio se utilizaron diferentes aproximaciones, sin embargo, la técnica usada en este estudio no nos proporcionó un panorama claro de la estructura de los implantes. Los cortes obtenidos de los implantes

fabricados por gelificación externa se hidrataron inmediatamente después de que se descongeló el medio de inclusión en el que se encontraba, por lo tanto, no fue posible distinguir su estructura interna. En contraste, se obtuvo un corte más representativo de la estructura interna de los implantes elaborados por gelificación interna sin cobertura, resultó notable su estructura porosa, previamente descrita por Gombotz y Wee (1998). Sin embargo, de acuerdo con Papageorgiou *et al.* (1994), la estructura de las matrices de alginato formadas por este método de gelificación es más homogénea, no obstante, es importante destacar que la reacción ácido/base que se produce entre CH_3COOH y el CaCO_3 da como resultado la formación de dióxido de carbono (CO_2), agua (H_2O) y acetato de calcio ($\text{CaCH}_3\text{COO}_2$), por lo que se atribuye que las burbujas de CO_2 que quedan atrapadas en la matriz de alginato contribuyen en la formación de poros. Por otra parte, no fue posible obtener un buen corte de los implantes con la cobertura de HEMA-PEGMA, sin embargo, derivado de los resultados de liberación de estos implantes se asume que la cobertura estaba presente. Finalmente, se encontró evidencia de la cobertura de EVAc en el corte de este implante. Debido a que los implantes cubiertos fueron fabricados por el método de gelificación interna, se espera que la estructura interna sea igual a la observada en implantes sin cobertura elaborados con el mismo método, aunque esto no quedó documentado mediante fotografías.

La capacidad de retención de agua les confiere a los geles de alginato su utilidad en distintas industrias, incluida la farmacéutica (Draget *et al.*, 2005). En este sentido, el índice de ganancia de peso y volumen de los implantes de alginato con y sin sus diferentes coberturas nos brinda un panorama amplio del efecto que tienen las coberturas sobre los implantes. Fue destacable que los implantes sin cobertura aumentaron casi 24 veces su peso comparado con los implantes que tenían algún tipo de cubierta, que aumentaron solo entre 6.5 y 8.1 veces en peso. Esto demuestra que el añadir una cobertura a los implantes reduce el grado de hinchamiento (Gombotz y Wee, 1998), lo que finalmente se traduce en una velocidad de difusión menor que en los implantes sin cobertura. Por otra parte, no hubo diferencias en el aumento de volumen entre los tratamientos, sin embargo, los implantes sin cobertura mostraron un aumento en volumen dos veces mayor que el inicial, mientras que en los tratamientos con cobertura el incremento de volumen fue menor.

4.1.5 Implantes de EVAc

El EVAc es un material biocompatible ampliamente usado en la administración de diversos fármacos, incluidas algunas proteínas (Langer *et al.*, 1981). En este estudio, los implantes a base de EVAc,

presentaron una liberación reducida de BSA (10.4% de su contenido total) durante las 72 horas en las que se pudo cuantificar la liberación de proteína por el método de BCA, sin embargo es probable que la liberación de proteína continuara, aunque en cantidades menores, que no eran detectadas por la sensibilidad del método de cuantificación, ya que se ha reportado que la liberación de proteínas con alto peso molecular a partir de implantes de EVAc puede extenderse hasta por 100 días (Langer y Folkman, 1976), por lo anterior, en estudios futuros es recomendable usar una técnica específica para la cuantificación de las proteínas de interés. Por otra parte, a pesar de que la matriz del implante ya incluía una cantidad de BSA, cuyo propósito era generar canales en el polímero plástico, fue posible discernir claramente entre la liberación de las proteínas de los implantes control y la de los tratamientos, por lo tanto, estos implantes fueron usados para su posterior evaluación en la liberación de GnRHa.

4.2 Liberación de GnRHa

4.2.1 Implantes de colesterol/celulosa y alginato-PEGMA cubiertos con EVAc/inulina

El presente estudio fue diseñado para describir diferentes protocolos de preparación de implantes con potencial para estimular la reproducción de peces, así como hacer una descripción de los perfiles de liberación de proteínas y en particular de GnRHa. Después de la evaluación de la liberación de BSA se eligieron los implantes que se consideraron aptos para probar la liberación de GnRHa *in vitro*. No hay estudios previos de liberación de GnRHa a partir de implantes de alginato-PEGMA cubiertos, en cambio, la liberación de GnRHa a partir de implantes de colesterol ya se ha descrito anteriormente por Sherwood *et al.* (1988); Crim *et al.* (1988); Crosfeld *et al.* (1988) y Matsuyama *et al.* (1995). En todos los estudios relacionados con implantes de colesterol-celulosa se reporta la liberación de GnRHa por periodos que van desde 4 hasta 12 semanas. En nuestro trabajo, el método usado para medir la liberación de proteína no es específico para GnRHa, por lo tanto, no podemos hacer una comparación directa, no obstante, lo que cuantificamos es GnRHa ya que fue la única fuente proteica que se incluyó en los implantes. En este ensayo, los implantes elaborados con 95% colesterol y 5% celulosa mostraron una liberación tipo estallido a las 48 h y liberaron GnRHa por un periodo total de 192 h, es probable que estos resultados difieran de otros debido a la limitada sensibilidad en la cuantificación de proteína y a las diferencias en la fabricación de los implantes, ya que no siempre los protocolos de preparación de implantes se describen claramente. Hasta ahora es claro que los implantes de colesterol-celulosa siguen siendo una buena opción para la liberación de GnRHa, sin embargo, son necesarios más ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar en qué

medida la concentración de GnRHa liberada a la mitad y al final del periodo de liberación puede tener el efecto reproductivo que finalmente se busca para cada especie.

Por otra parte, los implantes elaborados con 1.5% de alginato-PEGMA y cubiertos con EVAc_i mostraron una liberación tipo estallido a las 6 horas después de que inició su evaluación, estos resultados difieren en principio de los obtenidos en los ensayos de liberación de BSA, es posible que las diferencias se relacionen con las características de las proteínas liberadas, principalmente por la diferencia en el peso molecular de ambas proteínas, la BSA es una proteína muy grande que tiene un peso molecular de 66,000 g/mol, mientras que la GnRHa es una proteína pequeña y su peso molecular es de 1167.32 g/mol, por lo que es claro que esto modifica la velocidad de liberación entre proteínas. En el mismo sentido, el tiempo de liberación es evidentemente diferente al compararlo con los implantes de colesterol-celulosa evaluados con la misma proteína. Además, el periodo de liberación con los implantes de alginato fue de 72 h, aunque es destacable que liberaron una mayor proporción de su contenido total de proteínas (62.1%). Es claro que el alginato es un buen excipiente de liberación para diferentes fármacos (Draget, 2009), sin embargo, para el propósito de liberación a largo plazo y por la forma en que se elaboraron, no resultaron adecuados, por lo que será conveniente probar cambios en la formulación de la matriz o en las coberturas, con el fin de retrasar la liberación tipo estallido y alargar el tiempo de liberación.

4.2.2 Implantes de EVAc

Los implantes de EVAc se han probado con éxito para la liberación *in vitro* e *in vivo* de GnRHa, Mylonas *et al.* (2007) reportan que la liberación tipo estallido *in vitro* ($525 \pm 166 \mu\text{g}/\text{día}$) se presentó durante los primeros dos días y se extendió hasta el día 28. Estos autores observaron resultados similares en la evaluación *in vivo*, sin embargo, solo hasta el día 7 los niveles plasmáticos fueron significativamente diferentes a los controles, que consistieron en implantes elaborados siguiendo el mismo procedimiento, pero sin hormona. En el presente ensayo se pretendía describir el perfil de liberación de GnRHa, sin embargo, es necesario recordar que la fabricación de estos implantes involucra la adición de una proteína (BSA) diferente de la GnRHa, por lo que no fue posible hacer una cuantificación específica de la liberación de esta hormona proteica. En principio, se esperaba que los controles elaborados con BSA pero sin la adición de GnRHa se comportaran de manera similar a los controles fabricados de la misma forma para la prueba de liberación de BSA, ya que su contenido de BSA era igual, sin embargo no fue así, ya que los implantes control liberaron una mayor cantidad de proteína que los implantes que contenían BSA y GnRHa.

Esto probablemente se deba a que el contenido de GnRHa en cada implante era aproximadamente un tercio del contenido de BSA, por lo tanto, no fue posible discernir entre ambas proteínas. No obstante, se detectó la liberación proteica hasta las 336 h. En este punto del proceso de liberación solo se había liberado el 25.7% del contenido de GnRHa, por lo tanto, es probable que, con el uso de un método de detección de proteína más sensible, podría detectarse la liberación de GnRHa por un periodo más largo.

Al analizar en conjunto todos los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que los implantes de colesterol-celulosa y EVAc siguen siendo una alternativa viable para la liberación de GnRHa. Así mismo, es claro que el alginato es un excipiente con gran potencial para la liberación de fármacos, sin embargo, es necesario continuar explorando alternativas en la constitución de la matriz, así como en sus cubiertas para mejorar su desempeño en la liberación de GnRHa. Ha sido importante describir en este estudio claramente los protocolos de preparación de estos implantes para su futura replicación en campo. Finalmente en aplicaciones futuras, es importante considerar que un implante con potencial para la liberación *in vivo* de GnRHa, debería presentar un perfil de liberación prolongado y sostenido, ya que la FOM es un proceso que dependiendo de la especie puede durar varios días o incluso semanas, esto hace necesario que la GnRHa se mantenga en circulación constante para estimular la producción de LH.

Capítulo 5. Conclusiones

No existen diferencias significativas en la liberación tipo estallido y acumulada de BSA de implantes con 100 y 95% colesterol. Mientras que los implantes de EVAc_{st} liberan una décima parte de su contenido total de BSA en 96 h.

Los implantes de alginato-PEGMA elaborados con el método de gelificación externa presentaron un tiempo de liberación de BSA de 1 hora, mientras que los elaborados por el método de gelificación interna presentaron un tiempo de liberación de hasta 48 horas.

No hay diferencias significativas en la liberación tipo estallido, liberación acumulada y tiempo de liberación entre implantes elaborados con 1.5% de alginato-PEGMA y 1.5% de alginato, cubiertos de HEMA-PEGMA; sin embargo, la inclusión de esta cobertura alargó el tiempo de liberación de BSA hasta por 72 h en ambos tipos de implantes. Por otra parte, la inclusión de una cobertura de EVAc_{st}, EVAc_i y EVAc en los implantes de alginato-PEGMA alarga el tiempo de liberación de BSA hasta 72 h y retrasa la liberación tipo estallido.

Los implantes de alginato-PEGMA elaborados por el método de gelificación externa e interna mostraron una estructura interna porosa, sin embargo, para obtener una mejor caracterización se recomienda realizar la evaluación morfológica mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).

Las coberturas HEMA-PEGMA, EVAc_{st}, EVAc_i y EVAc reducen significativamente el grado de hinchamiento de implantes de alginato-PEGMA.

Los implantes de alginato-PEGMA cubiertos con EVAc_i tienen una liberación tipo estallido de GnRHa a las 6 h y liberan una alta proporción de su contenido en 72 h.

Los implantes 95% colesterol 5% celulosa son una buena opción como implantes de liberación prolongada de proteínas, mientras que los implantes de alginato-PEGMA cubiertos con EVAc/ inulina no son viables para los propósitos de este experimento. Por otra parte, los implantes a base de EVAc mostraron la liberación de GnRHa más prolongada, sin embargo, por los problemas presentados en la cuantificación, es necesario repetir la evaluación de estos implantes para una interpretación más certera.

Capítulo 6. Recomendaciones

Estudiar diferentes modificaciones en la matriz de alginato, así como diferentes coberturas para tratar de extender el tiempo de liberación y, retrasar y/o disminuir la liberación tipo estallido inicial.

Repetir la fabricación de implantes con diferentes excipientes cargados con GnRHa y sus respectivos controles y evaluar nuevamente la liberación de GnRHa con un método de cuantificación específico para esta proteína (ej. ELISA, inmunoelectroforesis).

Literatura citada

- Alban, S., Schauerte, A., y Franz, G. 2002. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure–activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydrate Polymers*, 47(3), 267-276
- Albuquerque, H. M., Santos, C. M., y Silva, A. 2019. Cholesterol-based compounds: recent advances in synthesis and applications. *Molecules*, 24(1), 116.
- Alok, D., Talwar, G. P., y Garg, L. C. 2000. In vivo activity of salmon gonadotropin releasing hormone (GnRH), its agonists with structural modifications at positions 6 and 9, mammalian GnRH agonists and native cGnRH-II on the spawning of an Indian catfish. *Aquaculture International*, 7(6), 383-392.
- Bedê, P. M., Silva, M. H. P. D., Figueiredo, A. B. H. D. S., y Finotelli, P. V. 2017. Dra. Nanostructured magnetic alginate composites for biomedical applications. *Polímeros*, 27, 267-272.
- Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Cooper, P. and Petrovsky, N. 2010. Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal Excipients and Food Chemistry* 1 (3): 27-50.
- Berlinsky D, W King, R Hodson, C Sullivan. 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *J World Aquacult Soc* 28, 79-86.
- Bidarra, S. J., Barrias, C. C., y Granja, P. L. 2014. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 10(4), 1646-1662.
- Bloch, K. 1991. Cholesterol: evolution of structure and function. In *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 20, pp. 363-381). Elsevier.
- Bonilla Valladares, P. 2016. Formación y caracterización de nanosistemas terapéuticos con alginato. Tesis de doctorado en investigación, desarrollo y control de medicamentos. Universidad de Barcelona. 218 pp.
- Brown, L., Siemer, L., Munoz, C., Edelman, E. and Langer, R. 1986. Controlled release of insulin from polymer matrices: Control of diabetes in rats. *Diabetes* 35, 692–697.
- Carolsfeld, J., Sherwood, N. M., Kreiberg, H., y Sower, S. A. 1988. Induced sexual maturation of herring using GnRH “quick-release” cholesterol pellets. *Aquaculture*, 70(1–2), 169–181. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90015-4)
- Carter, D. C., y Ho, J. X. 1994. Structure of serum albumin. *Advances in protein chemistry*, 45, 153-203.
- Castro-Ceseña, A. B., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., y Ruíz-Güereca, D. A. 2016. Optimization of entrapment efficiency and evaluation of nutrient removal (N and P) of *Synechococcus elongatus* in novel core-shell capsules. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2343-2351

- Chakraborty, S., Doktorova, M., Molugu, T. R., Heberle, F. A., Scott, H. L., Dzikovski, B., ... y Ashkar, R. 2020. How cholesterol stiffens unsaturated lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(36), 21896-21905.
- Chasin, M., Domb, A., Ron, E., Mathiowitz, E., Langer, R., Leong, K., Laurencin, C., Brem, H. y Grossman, S. 1990. Polyanhydrides as drug delivery systems. *In*: Chasin, M. and Langer, R. (eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 43–70.
- Cisneros, P. B. 2007. Efecto de la inyección de un análogo de GnRH sobre la maduración final ovocitaria y los perfiles plasmáticos de esteroides gonadales en anchoveta peruana (*Engraulis rigens*). Tesis de licenciatura en biología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 58 pp.
- Cohen, J., Siegel, R. A., y Langer, R. 1984. Sintering technique for the preparation of polymer matrices for the controlled release of macromolecules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(8), 1034–1037. <https://doi.org/10.1002/jps.2600730805>
- Coleman, R. J., Lawrie, G., Lambert, L. K., Whittaker, M., Jack, K. S., y Grøndahl, L. 2011. Phosphorylation of alginate: synthesis, characterization, and evaluation of in vitro mineralization capacity. *Biomacromolecules*, 12(4), 889-897.
- Contreras-García, M. D. J., Contreras-Sánchez, W. M., Hernández-Vidal, U., y Mcdonal-Vera, A. 2015. Induced spawning of the common snook (*Centropomus undecimalis*) in captivity using GnRH-a implants. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 2(6), 357-362.
- Crim, L. W., Sherwood, N. M., Wilson, C. E. 1988. Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture*, 74(1–2), 87–95. doi:10.1016/0044-8486(88)90089-0
- Crim, L.W. and Bettles, S. 1997. Use of GnRH analogues in fish culture. *In*: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. and Thompson, M.F. (eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol. 1: Endocrinology and Reproduction. Oxford& IBH Publishing Co., New Delhi, pp. 369–382.
- Crim, L.W., Sutterlin, A.M., Evans, D.M. y Weil, C. 1983. Accelerated ovulation by pelleted LHRH analogue treatment of spring-spawning rainbow trout (*Salmo gairdneri*) held at low temperatures. *Aquaculture* 35, 299–307.
- Dragert K I. 2009. Alginates: Handbook of hydrocolloids. 2nd ed. Woodhead. Cambridge, 379-395.
- Draget Kl., Smidsord O., Skajak-Braek G. 2005. Alginates from algae. Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, production and patents. Wiley-VHC, Weinheim, 1-30.
- Estay F, H Cerisola, V Tellez. 1994. Biología del desarrollo y reproducción artificial en la trucha arcoiris. CONICYT-FONDEF, Serie Publicaciones para la acuicultura N° 1.

- Estévez, M. A. C. 2008. La Reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Mundi prensa. España.
- FAO, 2020. El estado mundial de la pesca y acuicultura 2020. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. <https://doi.org/CC-BY-NC-SA3.0IGO>
- Fontaine M. 1975. Physiological mechanism in the migration of marine and amphihaline fish. *Adv Mar Biol* 13, 241-355.
- Forniés, M.A., Mañanos, E., Laureau, S., do Santos, A., Carrillo, M., Mylonas, C.C., Zohar, Y. and Zanuy, S. 2000. Different delivery systems for the optimization of the induction of the spawn in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Proceedings: Aqua 2000, Nice, France, May 2–6, 2000, European Aquaculture Society, p. 217.
- Franck, A., 2002. Technological functionality of inulin and oligofructoses. *British Journal of Nutrition* 87 (Suppl. 2): 287–291.
- Goh, C. H., Heng, P. W. S., y Chan, L. W. 2012. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 1-12.
- Gombotz, W. R., y Wee, S. 1998. Protein release from alginate matrices. *Advanced drug delivery reviews*, 31(3), 267-285.
- Gordon MR, KC Klotins, VM Campbell, MN Cooper. 1987. Farmed salmon broodstock management. Ministry of Environment Victoria, B.C. Industrial Research Assistance Program National Research Council of Canada, Sea-1 Aquafarms Ltd, Vancouver, BC, Canada.
- Goren, A., Gustafson, H. and Doering, D. 1995. Field trials demonstrate the efficacy and commercial benefit of a GnRHa implant to control ovulation and spermiation in salmonids. In: Goetz, F.W. and Thomas, P. (eds.), *Reproductive Physiology of Fish*. Fish Symposium 95, Austin, Texas, pp. 99–101.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J., y Thom, D. 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS letters*, 32(1), 195-198.
- Guzmán, J. M., Cal, R., García-López, Á., Chereguini, O., Kight, K., Olmedo, M., ... y Mañanós, E. L. 2011. Effects of in vivo treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(2), 235-245.
- Harvey, B.J., WS Hoar. 1980. Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Centro Internacional para el Desarrollo. Ottawa, Canadá. 50 pp.
- Houssay, B.A. 1930. Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 106, 686–688

- Kent, J.S., Vickery, B.H. and McRae, G.I. 1980. The use of a cholesterol matrix pellet implant for early studies on the prolonged release in animals of agonist analogues of luteinizing hormone releasing hormone. *Controlled Release of Bioactive Materials* 17, 123–125
- Kristiansen, K. A., Schirmer, B. C., Aachmann, F. L., Skjåk-Bræk, G., Draget, K. I., y Christensen, B. E. 2009. Novel alginates prepared by independent control of chain stiffness and distribution of G-residues: Structure and gelling properties. *Carbohydrate polymers*, 77(4), 725-735.
- Lam, T.J. 1982. Applications of endocrinology to fish culture. *Can. J. Aqua. Fish. Sci.* 39, 11–137.
- Langer, R. S., y Peppas, N. A. 1981. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, 2(4), 201-214.
- Langer, R., y Folkman, J. (1976). Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*, 263(5580), 797-800.
- Langer, R., Brem, H., y Tapper, D. 1981. Biocompatibility of polymeric delivery systems for macromolecules. *Journal of Biomedical Materials Research*, 15(2), 267-277
- Lee, C. S., Tamaru, C. S., y Crim, L. W. 1985. Preparation of a luteinizing hormone-releasing hormone cholesterol pellet and its implantation in the milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). In *Reproduction and Culture of Milkfish* (pp. 215-226). Oceanic Institute Hawaii.
- Lee, C.S., Tamaru, C.S., Kelley, C.D. y Banno, J.E. 1986. Induced spawning of milkfish, *Chanos chanos*, by a single application of LHRH-analogue. *Aquaculture* 58, 87–98.
- Lee, K. Y., y Mooney, D. J. 2012. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., y Cerdà, J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 367–389. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>
- Mallick, S., Lee, S., Park, J. I., y Choi, J. S. 2018. Liposomes containing cholesterol and mitochondria-penetrating peptide (MPP) for targeted delivery of antimycin A to A549 cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 356-364.
- Marino, G., Azzuro, E., Mylonas, C.C., Mandich, A. y Zohar, Y. 2000. Progress in induced breeding of the dusky grouper using a GnRH-delivery system. *Proceedings Aqua 2000, Nice, France, May 2–6, 2000. European Aquaculture Society*, p. 440.
- Matsuo, H., Y. Baba, R.M.G. Nair, A. Arimura, y A.V. Schally. 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Comm* 43: 1334-1339.
- Matsuyama, M., Hamada, M., Ashitani, T., Kashiwagi, M., Iwai, T., Okuzawa, K., Tanaka, H. y Kagawa, H. 1993. Development of LHRH-a copolymer pellet polymerized by ultraviolet and its application for

- maturation in red sea bream *Pagrus major* during the non-spawning season. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **59**, 1361–1369.
- Matsuyama, M., Takeuchi, H., Kashiwagi, M., Hirose, K. y Kagawa, H. 1995. Induced Gonadal Development and Spawning of Immature Red Sea Bream *Pagrus major* with LHRH-a Administration in Different Ways during Winter Season. *Fisheries Science*, 61(3), 472–477. doi:10.2331/fishsci.61.472
- Miura, T., Kasugai, T., Nagahama, Y. y Yamauchi, K. 1995 Acquisition of potential for sperm motility *in vitro* in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries. Sci.* 61, 533–534.
- Montero M, S Dufour. 1996. Gonadotropin-releasing hormones (GnRH) in fishes: evolutionary data on their structure, localization, regulation and function. *Zoological Studies* 35, 149 160.
- Morgan, J. L., Strumillo, J., y Zimmer, J. 2013. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493(7431), 181-186.
- Munro, A.D., Scott, A.P. y Lam, T.J. 1990. Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 254 pp.
- Mylonas CC, Y Zohar. 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Fish Biology and Fisheries* 10, 463-491.
- Mylonas, C. C., Bridges, C., Gordin, H., Ríos, A. B., García, A., De La Gándara, F., Fauvel, C., Suquet, M., Medina, A., Papadaki, M., Heinisch, G., De Metrio, G., Corriero, A., Vassallo-Agius, R., Guzmán, J. M., Mañanos, E. y Zohar, Y. 2007. Preparation and administration of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science*, 15(3), 183–210. <https://doi.org/10.1080/10641260701484572>
- Mylonas, C. C., Scott, A. P. y Zohar, Y. 1997. Plasma gonadotropin II, sex steroids, and thyroid hormones in wild striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation and final oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 108(2), 223–236. doi:10.1006/gcen.1997.6967
- Mylonas, C. C., Tabata, Y., Langer, R. y Zohar, Y. 1995. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. *Journal of Controlled Release*, 35(1), 23–34. doi:10.1016/0168-3659(95)00009-W
- Mylonas, C.C., Magnus, Y., Gissis, A., Klebanov, Y. y Zohar, Y. 1997b. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. *J. Fish Biol.* **51**, 234–250.
- Mylonas, C.C., Woods, L.C., III, Thomas, P. y Zohar, Y. 1998. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) during post-vitellogenesis, and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110, 276–289.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine control of gametogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 217–229

- Navarro-Flores, J., Ibarra-Castro, L., Martinez-Brown, J. M., y Zavala-Leal, O. I. 2019. Hermafroditismo en peces teleósteos y sus implicaciones en la acuicultura comercial. *Revista de biología marina y oceanografía*, 54(1), 1-10.
- Papageorgiou, M., Kasapis, S., y Gothard, M. G. 1994. Structural and textural properties of calcium induced, hot-made alginate gels. *Carbohydrate polymers*, 24(3), 199-207.
- Paques, J. P., van der Linden, E., van Rijn, C. J., y Sagis, L. M. 2014. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in colloid and interface science*, 209, 163-171.
- Peter RE, KL Yu. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev Fish Biol Fisher* 7, 173-197.
- Rhine, W.D., Sukhatme, V., Hsie, D.S.T. y Langer, R.S. 1980. A new approach to achieve zero-order release kinetics from diffusion-controlled polymer matrix system. *Controlled Release of Bioactive Materials* 1980, 177-186.
- Richards, H., Baker, P. y Iwuoha, E. 2012. Metal nanoparticle modified polysulfone membranes for use in wastewater treatment: a critical review. *Journal of surface engineered materials and advanced technology*, 2012.
- Rodriguez, A.D. 2015. Indicadores de Biología Reproductiva y Expresión de Vitelogenina en Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California (Tesis de Maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Mazatlán Sinaloa, México.
- Rosenfeld, H., Mylonas, C. C., Bridges, C. R., Heinisch, G., Corriero, A., Vassallo-Aguis, R., ... y Zohar, Y. 2012. GnRHa-mediated stimulation of the reproductive endocrine axis in captive Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. *General and Comparative Endocrinology*, 175(1), 55-64.
- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A., y Castro-Ceseña, A. B. 2019. Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate polymers*, 206, 455-467.
- Sabater Pascual, C. 2012. Eficacia de la inducción hormonal, con distintas dosis de GnRHa, en reproductores de corvina (*Argyrosomus regius*): efecto sobre la producción y la calidad de las puestas. Instituto Canario de Ciencias Marinas de Gran Canaria, España.
- Salisu, A., Sanagi, M. M., Abu Naim, A., Wan Ibrahim, W. A., y Abd Karim, K. J. 2016. Removal of lead ions from aqueous solutions using sodium alginate-graft-poly (methyl methacrylate) beads. *Desalination and Water Treatment*, 57(33), 15353-15361.
- Samavedi, S., Poindexter, L. K., Van Dyke, M., y Goldstein, A. S. 2014. Synthetic biomaterials for regenerative medicine applications. In ***Regenerative medicine applications in organ transplantation*** (pp. 81-99). Academic Press.

- Schneider, C., Langer, R., Loveday, D., y Hair, D. 2017. Applications of ethylene vinyl acetate copolymers (EVA) in drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 262, 284-295.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H. y Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. General and comparative endocrinology, 165(3), 390-411.
- Senni, K., Pereira, J., Gueniche, F., Delbarre-Ladrat, C., Siquin, C., Ratiskol, J., ... y Collic-Jouault, S. 2011. Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Marine drugs*, 9(9), 1664-1681.
- Sherwood, N. M., Crim, L. W., Carolsfeld, J., y Walters, S. M. 1988. Sustained hormone release. I. Characteristics of in vitro release of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-A) from pellets. *Aquaculture*, 74(1-2), 75-86.
- Sherwood, N., L. Eiden, M. Brownstein, J. Spiess, J. Rivier, y W. Vale. 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2794-2798.
- Skapura, D.P., Grier, H.J., Neidig, C.L., Sherwood, N., Rivier, J. y Taylor, R.G. 2000. Induction of ovulation in common snook, *Centropomus undecimalis*, using gonadotropin-releasing hormone. In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E. and Stefansson, S.O. (eds.), *Fish Reproductive Physiology*. University of Bergen, Bergen, Norway, pp. 430.
- Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Costerton, B., DeMeo, P., Shirtliff, M., Gawalt, E., y Kathju, S. 2013. Biofilms, biomaterials, and device-related infections. In *Handbook of polymer applications in medicine and medical devices* (pp. 77-101). William Andrew Publishing.
- Sumano López, H. S., y Ocampo Camberos, L. 2006. *Farmacología veterinaria*. México. Ed MC GRAW HILL.
- Teletchea, F. 2015. Domestication of marine fish species: Update and perspectives. *Journal of Marine Science and Engineering*, 3(4), 1227–1243. <https://doi.org/10.3390/jmse3041227>
- Tønnesen, H. H., y Karlsen, J. 2002. Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, 28(6), 621-630.
- True, C. D. 2012. Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de doctorado en ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. 136 pp.
- Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K. H., y Kim, S. K. 2015. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International journal of biological macromolecules*, 72, 269-281.
- Vilches, R. 1980. *Pesca prehispánica: Artes, usos, costumbres*. BANPESCA. México DF.
- Vincent, J. F. 1999. From cellulose to cell. *Journal of Experimental Biology*, 202(23), 3263-3268.

- Weil, C. y Crim, L.W. 1983. Administration of LHRH analogues in various ways: Effect on the advancement of spermiation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 35, 103–115.
- Yu, L., y Ding, J. 2008. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews*, 37(8), 1473-1481.
- Zhang, F., Cheng, G., y Ying, X. 2006. Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres. *Reactive and Functional Polymers*, 66(7), 712-719.
- Zarrintaj, P., Saeb, M. R., Jafari, S. H., y Mozafari, M. 2020. Application of compatibilized polymer blends in biomedical fields. In *Compatibilization of Polymer Blends* (pp. 511-537). Elsevier.
- Zohar Y, CC Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.
- Zohar Y. 1996. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. *Bull Natl Res Inst Aquacult, Suppl 2*, 43-48.
- Zohar, Y. 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleosts: basic and applied considerations. *Colloques de l'INRA (France)*.
- Zohar, Y. 1989. Fish reproduction: Its physiology and artificial manipulation. In: Shilo, M. and Sarig, S. (eds.), *Fish Culture in 491 Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, pp. 65–119.
- Zohar, Y., Goren, A., Tosky, M., Pagelson, G., Leibovitz, D. and Koch, Y. 1989. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 59–67.
- Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S. and Tandler, A. 1995. Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In: Bromage, N.R. and Roberts, R.J. (eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, Oxford, pp. 94–117.
- Zohar, Y., Pagelson, G., Gothilf, Y., Dickhoff, W.W., Swanson, P., Duguay, S., Gombotz, W., Kost, J. and Langer, R..1990. Controlled release of gonadotropin releasing hormones for the manipulation of spawning in farmed fish. *Controlled Release of Bioactive Materials* 17, 51–52.
- Zohar, Y. 2021. Fish reproductive biology—Reflecting on five decades of fundamental and translational research. *General and Comparative Endocrinology*, 300, 113544.

Anexos

Anexo A. Cálculo de CaCO_3 para diferentes porcentajes de alginato

Para elaborar implantes de alginato por el método de gelificación interna fue necesario cambiar la fuente de calcio, en este caso se usó CaCO_3 . Para determinar la cantidad necesaria de CaCO_3 correspondiente para cada porcentaje de alginato a probar (3,4 y 5% m/v) se usó como base el Ca^{+2} neto agregado en la solución de 1.5% m/v de CaCl_2 usada para la reticulación de los implantes elaborados con la solución de 3% de alginato de sodio por gelificación externa en este estudio. Los cálculos se realizaron usando los datos descritos en el Anexo C.

- ✓ Cálculo la cantidad de CaCl_2 al 1.5% m/v para preparar 5 ml de solución

$$5 \text{ ml} = 100\% \quad (3)$$

$$\mathbf{0.75 \text{ g de } \text{CaCl}_2 = 1.5\%}$$

- ✓ Cálculo la cantidad de Ca^{2+} en la solución de CaCl_2

$$110.99 \text{ g de } \text{CaCl}_2 = 100\% \quad (4)$$

$$40.078 \text{ g de Ca} = 36.10 \%$$

$$0.75 \text{ g de } \text{CaCl}_2 = 100\% \quad (5)$$

$$\mathbf{0.270 \text{ g de Ca} = 36.10\%}$$

- ✓ Cálculo del porcentaje de Ca en 1g de CaCO_3 (6)

$$100.09 \text{ g de } \text{CaCO}_3 = 100\%$$

$$40.078 \text{ de Ca} = 40.04\%$$

- ✓ Cálculo de la cantidad de CaCO_3 para cubrir el requerimiento de Ca para una solución de 3% de alginato

$$1 \text{ g de } \text{CaCO}_3 = 100\% \quad (7)$$

$$0.0404 \text{ g de Ca} = 40.04\%$$

$$1 \text{ g de } \text{CaCO}_3 = 0.4004 \text{ g de Ca} \quad (8)$$

$$\mathbf{0.67 \text{ g de } \text{CaCO}_3 = 270 \text{ g de Ca}}$$

- ✓ Cálculo de CaCO_3 para una solución de 4 y 5 % de alginato

0.067 g de CaCO_3 = 3% de alginato de sodio

0.089 g de CaCO_3 = 4% de alginato de sodio

0.111 g de CaCO_3 = 5% de alginato de sodio

(9)

Anexo B. Cálculo de los compuestos agregados para la solución HEMA-PEGMA

- Para estos cálculos se usaron los datos descritos en la tabla del Anexo C. Se definió preparar 5 ml de solución HEMA-PEGMA, por lo tanto:

✓ HEMA 10% v/v $\rightarrow$ 0.5 ml

$$5\text{ml} = 100\% \quad (10)$$

$$0.5\text{ ml} = 10\%$$

✓ PEGMA 75% M con respecto a HEMA $\rightarrow$ 1.43 ml

$$1.073\text{ g} = 1\text{ ml} \quad (11)$$

$$0.5365\text{ g} = 0.5\text{ ml}$$

$$\begin{aligned} 1\text{ mol HEMA} &= 130.14\text{ g} \\ 0.0041\text{ mol HEMA} &= 0.5365\text{ g} \end{aligned} \quad (12)$$

$$\begin{aligned} 0.0041\text{ mol} &= 100\% \\ 0.0030 &= 75\% \end{aligned} \quad (13)$$

$$\begin{aligned} 1\text{ mol PEGMA} &= 500\text{ g} \\ 0.0030\text{ mol PEGMA} &= 1.54\text{ g} \end{aligned} \quad (14)$$

$$\begin{aligned} 1\text{ ml PEGMA} &= 1.08\text{ g} \\ \mathbf{1.43\text{ ml PEGMA}} &= \mathbf{1.54\text{ g}} \end{aligned} \quad (15)$$

✓ EDGMA 4% M con respecto a HEMA $\rightarrow$ 0.0309 ml

$$\begin{aligned} 0.0041\text{ mol HEMA} &= 100\% \\ 0.000164\text{ mol} &= 4\% \end{aligned} \quad (16)$$

$$\begin{aligned} 1\text{mol EDGMA} &= 198.22\text{g} \\ 0.000164\text{ mol} &= 0.0325\text{g} \end{aligned} \quad (17)$$

$$\begin{aligned} 1\text{ ml} &= 1.051\text{ g} \\ \mathbf{0.0309\text{ ml}} &= \mathbf{0.0325\text{ g}} \end{aligned} \quad (18)$$

✓ APS 0.5% M con respecto a HEMA $\rightarrow$ 0.00467 g

$$\begin{aligned} 0.0041\text{ mol HEMA} &= 100\% \\ 0.0000205\text{ mol} &= 0.5\% \end{aligned} \quad (19)$$

$$\begin{aligned} 1\text{ mol APS} &= 228.20\text{ g} \\ 0.0000205\text{ mol} &= \mathbf{0.00467\text{ g}} \end{aligned} \quad (20)$$

Anexo C.

Tabla 4. Peso molecular y densidad de reactivos.

Reactivo	Peso molecular (g/mol)	Densidad (g/ml)
HEMA	130.14	1.073
PEGMA	500	1.08
EGDMA	198.22	1.051
APS	228.20	-
CaCl ₂	110.99	-
CaCO ₃	100.09	-
Ca	40.078	-