

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**“EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PROTECCIÓN DE LA  
TSH PARA SU ADMINISTRACIÓN POR VIA ORAL A LARVAS DE  
LEPISOSTÉIDOS Y OTRAS ESPECIES DE PECES”**

**POR**

**NYDIA BERENICE ALVARADO AYALA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MANEJO DE VIDA  
SILVESTRE Y DESARROLLO SUSTENTABLE**

**ENERO, 2014**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**TESIS**

**“EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PROTECCIÓN DE LA  
TSH PARA SU ADMINISTRACIÓN POR VIA ORAL A LARVAS DE  
LEPISOSTÉIDOS Y OTRAS ESPECIES DE PECES”**

**POR**

**L.C.A. NYDIA BERENICE ALVARADO AYALA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MANEJO DE VIDA  
SILVESTRE Y DESARROLLO SUSTENTABLE**

**ENERO, 2014**

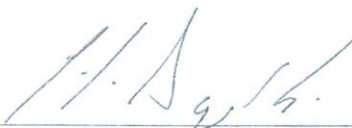
"EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PROTECCIÓN DE LA TSH  
PARA SU ADMINISTRACIÓN POR VIA ORAL A LARVAS DE LEPISOSTEIDOS  
Y OTRAS ESPECIES DE PECES"

COMITÉ DE TESIS



---

Dr. Roberto E. Mendoza Alfaro. *Director de Tesis*



---

Dr. Carlos J. Aguilera González. *Secretario*



---

Dr. Jesús Montemayor Leal. *Vocal 1*



---

Dr. Carlos E. Hernández Luna. *Vocal 2*



---

Dr. Juan G. Báez González. *Vocal 3*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Emulsión múltiple W1/O/W2. Objetivo: 100x	40
2	Emulsión múltiple W1/O/W2. Objetivo: 100x.	41
3	Actividad proteolítica ( $X \pm SD$ ) ácida total durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). Duncan < 0.05).	43
4	Actividad tipo tripsina ( $X \pm SD$ ) (A: actividad total U/larva; B: actividad específica U/mgP) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3) (Duncan < 0.05).	45
5	Actividad tipo leucina-aminopeptidasa ( $X \pm SD$ ) (A: actividad total U/larva; B: actividad específica U/mgP) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la hormona TSH microencapsulada en comparación con el tratamiento control y el control positivo (T3). (Duncan < 0.05).	47
6	Actividad tipo leucina-aminopeptidasa ( $X \pm SD$ ) (A: actividad total U/larva; B: actividad específica U/mgP) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la hormona TSH microencapsulada en comparación con el tratamiento control y el control positivo (T3). (Duncan < 0.05).	48
7	Actividad tipo tripsina ( $X \pm SD$ ) (A: actividad total U/larva; B: actividad específica U/mgP) durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos de dieta control, microparticulas blanco, tirotropina libre, tirotropina microencapsulada y triyodotironina. (Duncan < 0.05).	50
8	Actividad tipo leucina-aminopeptidasa (A: actividad total U/larva; B: actividad específica U/mgP) durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos de dieta control, microparticulas blanco, tirotropina libre, tirotropina microencapsulada y triyodotironina.	52
9	Peso (g) promedio ( $X \pm SD$ ) de larvas de pejelagarto pinto expuestas a TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). Literales iguales sobre las barras representan grupos homogéneos (Duncan < 0.05). las barras representan grupos homogéneos (Duncan < 0.05). positivo (T3).	53
10	Longitud Total (mm) ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo	54

	(T3). (Duncan < 0.05).	
11	Índice de supervivencia durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). (Duncan < 0.05).	54
12	Peso (g) ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de de tilapia expuestas a los tratamientos: dieta control, microparticulas blanco, tiotropina libre, tiotropina microencapsulada y triiodotironina. (Duncan < 0.05).	55
13	Longitud Total (mm) ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos: dieta control, microparticulas blanco, tiotropina libre, tiotropina microencapsulada y triiodotironina. (Duncan < 0.05).	56
14	Índice de supervivencia durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos: dieta control, microparticulas blanco, tiotropina libre, tiotropina microencapsulada y triiodotironina. (Duncan < 0.05).	58
15	Relación RNA:DNA ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de las larvas de pejelagarto pinto expuestas a la hormona TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). (Duncan < 0.05).	59
16	Relación DNA/peso seco ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). (Duncan < 0.05).	60
17	Relación RNA/peso seco ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3) (Duncan < 0.05).	61
18	elación RNA/peso seco ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3) (Duncan < 0.05).	62
19	Relación DNA/peso seco durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos: dieta control, microparticulas blanco, tiotropina libre, tiotropina microencapsulada y triiodotironina.	63
20	Relación RNA/peso seco durante el desarrollo de tilapia expuestas a los tratamientos de dieta control, microparticulas blanco, tiotropina libre, tiotropina microencapsulada y triiodotironina.	64
21	Relación RNA/peso seco durante el desarrollo de tilapia expuestas a los tratamientos de dieta control, microparticulas blanco, tiotropina libre, tiotropina microencapsulada y triiodotironina.	66

22	Concentración (ng/larva) de la hormona T4 (A) y T3 (B) ( $X \pm SD$ ) en larvas de de tilapia expuestas a los tratamientos de dieta control, microparticulas blanco, tiotropina libre, tiotropina microencapsulada y triiodotironina. (Duncan < 0.05).	68
----	--	----

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Etapas nutricionales para el catán ( <i>Atractosteus spatula</i> ) y el pejelagarto ( <i>A. tropicus</i> )	10
II	Efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo larvario.	15
III	Indicadores de condición nutricional en larvas.	24
IV	Etapas de maduración del sistema digestivo en peces	25
V	Formulación de la emulsión	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TSH	Tirotropina
DC	Dieta Control
MP B	Microparticulas blanco
TSH L	Tirotropina libre
TSH MP	Tirotropina microencapsulada
IU	Unidades Internacionales
µm	Micrometro
mg/P	Miligramo de proteína
W1/O/W2	Agua/Aceite/Agua
O/O	Aceite/Aceite
W/O	Agua/Aceite
DDE	Días Después de la Eclosión
ng	Nanogramos

# INDICE

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	6
<b>2.1 Biología</b> .....	6
2.1.1 Pejelagarto pinto ( <i>Lepisosteus oculatus</i> ).....	6
2.1.2 Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	8
<b>2.2 Desarrollo larvario</b> .....	9
2.2.1 Pejelagarto pinto ( <i>Lepisosteus oculatus</i> ).....	9
2.2.2 Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	10
<b>2.3 Hormonas tiroideas</b> .....	11
2.3.1 Regulación de la función tiroidea.....	11
2.3.2 Efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo larval.....	14
<b>2.4 Microencapsulación</b> .....	16
2.4.1 Emulsión múltiple.....	18
2.4.2 Emulsión múltiple con evaporación de solvente.....	20
2.4.3 Características de los materiales de microencapsulación.....	20
2.4.1 Goma arábiga.....	20
2.4.2 Eudragit.....	22
<b>2.5 Índices de condición fisiológica e indicadores de desarrollo</b> .....	23
2.5.1 Actividad de las enzimas digestivas.....	24
2.5.2 Ácidos nucleicos.....	26
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	29



<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	30
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	31
<b>6.. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	32
6.1.1 Microencapsulación de tirotropina por emulsión múltiple.....	32
6.1.2 Microencapsulación de tirotropina por emulsión múltiple con evaporación de solvente.....	32
6.1.3 Adición de T3 al alimento.....	33
6.1.3Adición de TSH libre en el alimento.....	33
<b>6.2 Bioensayo de alimentación de larvas de peces</b> .....	<b>34</b>
6.2.1 Pejelagarto pinto ( <i>Lepisosteus oculatus</i> ).....	34
6.2.2 Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> .....	34
<b>6.3 Actividad de las enzimas digestivas</b> .....	<b>35</b>
6.3.1 Obtención del extracto enzimático.....	35
6.3.2 Cuantificación de proteína soluble.....	35
6.3.3 Actividad proteolítica ácida total.....	35
6.3.4 Actividad tipo tripsina.....	36
6.3.1 Actividad tipo leucina-aminopeptidasa.....	36
<b>6.4 Análisis de ácidos nucleicos</b> .....	<b>37</b>
<b>6.5 Cuantificación de hormonas tiroideas</b> .....	<b>38</b>
<b>6.6 Análisis estadístico</b> .....	<b>39</b>
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>7.1 Microencapsulación de la tirotropina</b> .....	<b>40</b>
<b>7.2 Bioensayos de alimentación de larvas de peces</b> .....	<b>43</b>
<b>7.2.1 Actividad de las enzimas digestivas</b> .....	<b>49</b>
<b>7.2.2 Condición morfológica y supervivencia</b> .....	<b>53</b>
<b>7.2.3 Análisis de ácidos nucleicos</b> .....	<b>59</b>
<b>7.2.4 Cuantificación de hormonas tiroideas</b> .....	<b>65</b>

<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>8.1 Microencapsulación de la tirotropina.....</b>	<b>69</b>
<b>8.2 Efecto de las hormonas tiroideas en pejelagarto pinto y tilapia.....</b>	<b>70</b>
8.2.1 Ontogénesis enzimática.....	70
8.2.2 Morfología y supervivencia.....	76
8.2.3 Relación de ácidos nucleicos.....	78
8.2.4 Cuantificación de hormonas tiroideas.....	81
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>83</b>

## RESUMEN

Los Lepisosteidos son sobrevivientes de un grupo ancestral de peces que floreció durante el Triásico. Dentro de este grupo se encuentran el pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*), la cual es una especie extinta en México y el catán (*Atractosteus spatula*), que es la especie dulceacuícola de mayor tamaño que habita en las aguas continentales Mexicanas. Estos organismos presentan hábitos ictiófagos desde la etapa larvaria, no obstante se han desarrollado dietas artificiales que muestran un mejor desempeño comparado con el alimento vivo, de acuerdo a variables morfológicas y bioquímicas. Por otra parte, se ha demostrado que presentan mayor homogeneidad de tallas cuando las larvas son expuestas a hormonas tiroidianas (HT). Estas hormonas igualmente provocan un incremento significativo en el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de las larvas. Uno de los principales reguladores de HT es la tirotropina (TSH), que sería deseable administrar a las larvas. Sin embargo, la problemática que se presenta es que al llegar al estómago ésta sería susceptible de ser desnaturalizada debido a la importante actividad enzimática que presentan las larvas. Es por esto que se busca microencapsular la TSH por distintos métodos con el fin de protegerla. Se llevaron a cabo dos métodos de protección para la TSH: emulsión múltiple y emulsión doble con evaporación de solvente. La emulsión múltiple se preparó siguiendo el método de dos etapas donde la primera fase fue constituida por aceite de canola, mientras que los surfactantes hidrofílico y lipofílico usados fueron Tween 80 y Grinsted PGPR, respectivamente. La tirotropina (TSH) formó parte de la fase acuosa de la emulsión, usándose una concentración de 1%. La homogenización se llevó a cabo en un equipo de ultrasonido Sonic Ruptor, a 70 khz por 5 min, integrando primero la fase acuosa (agua 29.2 g) y Tween 80 (0.8 g). Posteriormente, se agregaron los componentes de la fase oleosa. Una vez protegida la hormona se adicionó al alimento comercial. 30 larvas de catán pinto (*Lepisosteus oculatus*) de un desove fueron alimentadas con TSH, como tratamiento testigo se utilizaron 30 larvas con el alimento suplementado con T3 y un control (30 larvas) al que se le suministró solo alimento artificial. Para el método de emulsión doble con evaporación de solvente se realizaron distintas formulaciones con la finalidad de obtener una encapsulación eficiente, se procedió a la incorporación de las micropartículas al alimento y se llevó a cabo un segundo bioensayo con *Oreochromis niloticus* (50 larvas por tratamiento), agregando dos tratamientos (micropartículas blanco como control y TSH libre en el alimento). En ambos bioensayos se tomaron muestreos de 3 larvas cada tres días iniciado el bioensayo y se almacenaron a -70 °C para su posteriores análisis. Se evaluó el efecto de las hormonas sobre las larvas utilizando índices de condición morfológicos, bioquímicos y moleculares. Finalmente, se concluye que ambos métodos de encapsulación de la hormona resultaron eficientes. Se presentó un efecto claro de la TSH encapsulada en el pejelagarto con un incremento consecuente en el peso y longitud total de de las larvas, igualmente se vió reflejado en una mayor actividad metabólica (RNA/DNA, DNA Peso seco, RNA/Peso seco) que contribuye a explicar los resultados morfológicos observados. En cuanto a las larvas de tilapia los resultados fueron menos conspicuos, presumiblemente debido a su desarrollo más lento.

## ABSTRACT

The gars are survivors of an ancient group of fish that flourished during the Triassic. Within this group are the spotted gar (*Lepisosteus oculatus*), which is an extinct species in Mexico and alligator gar (*Atractosteus spatula*), which is the largest freshwater species inhabiting the Mexican inland waters. These organisms have piscivorous habits since the larval stage, however artificial diets have been developed and shown improved performance compared to live food, according to morphological and biochemical variables. On the other hand, has been shown to have greater homogeneity of size when the larvae are exposed to thyroid hormones (TH). These hormones also cause a significant increase in the growth, development and survival of larvae. One of the key regulators of HT is the thyrotropin (TSH), it would be desirable to administer to the larvae. However, the problem that arises is that upon reaching the stomach this would be likely to be denatured due to the significant enzymatic activity presented by the larvae. That is why we look to microencapsulate the TSH by different methods in order to protect it. We performed two methods to protect TSH: multiple emulsion and double emulsion solvent evaporation. The multiple emulsion was prepared by the two step method, where the first stage was composed of canola oil while the hydrophilic and lipophilic surfactants used were Tween 80 and Grinsted PGPR, respectively. Thyrotropin (TSH) comprised of the aqueous phase of the emulsion, using a concentration of 1%. Homogenization was carried out in an ultrasound Sonic Ruptor, 70 kHz for 5 min, first integrating the aqueous phase (water 29.2 g) and Tween 80 (0.8 g). Subsequently, oil phase components were added. Once protected the hormone was added to commercial food. 30 larvae pinto gar (*Lepisosteus oculatus*) from a spawning were fed whit TSH, as positive control treatment 30 larvae were used in food supplemented with T3 and a control (30 larvae) that was provided only artificial food. For the method of double emulsion solvent evaporation different formulations in order to obtain efficient encapsulation were performed, it was proceeded the incorporation of the microparticles to the food and was conduct a second bioassay *Oreochromis niloticus* (50 larvae per treatment) adding two treatments (control and blank microparticles as free food TSH). In both bioassays sampling were taken every third day, 3 larval bioassay started and stored at -70 ° C for further analysis. The effect of hormones on larvae using mean morphological, biochemical and molecular condition was evaluated. Both methods of encapsulation of the hormone were effective. A clear effect of TSH encapsulated in the alligator gar with a consequent increase in weight and total length of larvae was presented, also it was reflected in increased metabolic activity (RNA / DNA, DNA dry weight, RNA / Dry Weight) which helps to explain the observed morphological results. As tilapia larvae were less conspicuous results, presumably due to its slower growth.

## 1. INTRODUCCIÓN

La importancia de la acuicultura se ha ido incrementando a nivel global, ya que esta actividad representa una estrategia eficaz para garantizar la seguridad alimentaria. Se ha estimado que incremento anual es de 10% y 5 %, a nivel mundial y nacional, respectivamente, con producciones mundiales que alcanzan los 60 millones de toneladas (Mendoza *et al.*, 2010), mientras que la producción nacional fue de 262,855 toneladas (SAGARPA, 2011).

Para el continuo desarrollo de esta industria se requiere de la incorporación de nuevas especies, lo que necesariamente implica su domesticación. Este proceso requiere del estudio de la capacidad de los organismos de interés para vivir la mayor parte de su ciclo de vida bajo condiciones artificiales (FAO / PNUMA, 1984). Las principales características en una especie para ser domesticada son: la facilidad o capacidad de reproducirse y desovar en cautiverio, la posibilidad de realizar el cultivo masivo de larvas, la adaptación al consumo de dietas artificiales y la capacidad de crecer y mantenerse en altas densidades (Aquacop y Calvas, 1990). Las razones para iniciar la domesticación de una especie se relacionan con aspectos tales como económico (valor comercial de la especie), sociocultural (pesca tradicional) y ecológico (especies sobre-explotadas o en peligro de extinción) (Mendoza *et al.*, 2000c; Rojas y Mendoza, 2000).

En relación con lo anterior, los niveles poblacionales de catán (*Atractosteus spatula*) y pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*) se encuentran amenazadas en EUA (Ferrara, 2001; Aguilera *et al.*, 2002; SEMARNAT, 2004; Mendoza *et al.*, 2008a), mientras que en México los niveles poblacionales de catán se han visto disminuidos debido, entre otras cosas, al deterioro de su hábitat, al impacto ocasionado por la pesca comercial y a la falta de normatividad para regular su captura (Morales, 1987). Una solución radica en el desarrollo de técnicas dirigidas hacia el control del desarrollo de las larvas para incrementar su fortaleza y supervivencia. Dentro de las alternativas para lograr este control se encuentran las hormonas tiroidianas, ya que existen resultados alentadores que muestran una mayor homogeneidad de tallas cuando las larvas son expuestas a estas hormonas. Esto se debe a que las hormonas tiroidianas tienen un papel muy importante en el desarrollo y la

metamorfosis de todos los vertebrados; y se ha demostrado que, al ser administradas de manera exógena, provocan un incremento significativo en el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de las larvas de numerosas especies de peces (Power *et al.*, 2001).

Dentro del eje endócrino que controla la producción de las hormonas tiroideas, la TSH (tirotropina) es una hormona crucial ya que actúa sobre la tiroides estimulando la síntesis y secreción de hormonas tiroideas y estimulando el crecimiento tiroideo como consecuencia de un aumento tanto del número como del tamaño de las células foliculares. Desafortunadamente, al intentar administrar esta hormona por medio del alimento, se ha encontrado que al llegar al estómago de la larva se desnaturaliza debido a la acción enzimática digestiva. Esta acción es aún más notoria en el caso de los lepisosteidos ya que en estos peces ha sido detectada una elevada actividad digestiva proteolítica ácida desde el inicio de la alimentación exógena, en el 5° día después de la eclosión (DDE) (Mendoza y Aguilera, 2001; Castillo *et al.*, 2013). Una de las posibles formas en la que se puede proteger esta hormona es por medio de su microencapsulación para que pueda superar la digestión estomacal y de esta manera incrementar la posibilidad de ser absorbida en el intestino para poder cumplir su función en la larva.

La microencapsulación está definida como la tecnología de los sólidos o líquidos empacados en cápsulas que pueden liberar su contenido a tasas controladas bajo condiciones específicas, esta metodología ha tenido múltiples usos dentro de los que destacan el enmascaramiento del sabor desagradable de ciertos ingredientes, la conversión de líquidos en sólidos y la liberación controlada de diversas sustancias como medicamentos o ingredientes alimenticios. Una de las ventajas de la técnica es contar con un disparador para llevar a cabo la liberación del compuesto encapsulado, pudiendo ser este un cambio de pH (recubrimiento entérico y anti-entérico), el estrés mecánico, la temperatura, la actividad enzimática, tiempo, fuerza osmótica, etc. (Gouin, 2004).

Durante el desarrollo de esta investigación se realizó la microencapsulación de la tirotropina, con la finalidad de protegerla de la actividad proteolítica ácida presente en el estómago de las larvas, para incrementar su incorporación y acción sobre la tiroides, buscando mejorar la supervivencia y desarrollo de las larvas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Biología

#### 2.1.1 Pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*)

El pejelagarto pinto se distribuye desde los Grandes Lagos (Canadá/ EEUU) y Alto Río Mississippi (EEUU), excepto la mayor parte de Florida, hasta la Laguna Madre (Mendoza *et al.*, 2010). Se encuentra con frecuencia en lagos, pantanos y áreas de remanso (Goodyear, 1966; Snedden *et al.*, 1999), prefiriendo las zonas de espesa vegetación o cubierta, tales como árboles caídos (Goodyear, 1966).

Durante los meses de primavera se mueve a zonas de llanura inundadas para desovar y alimentarse, permaneciendo a lo largo de las costas de lagos y pantanos durante el otoño y el invierno, en los períodos de estiaje. (Snedden *et al.*, 1999). Estos peces prefieren salinidades que varían de 0 a 10 ppt, no obstante se les ha observado en salinidades de hasta 18 ppt en Mississippi (Goodyear, 1966). De las especies de lepisosteidos, el pejelagarto pinto y el catán de la Florida son las menos tolerantes a la salinidad (Suttkus, 1963). En muchas zonas, el pejelagarto pinto, como el resto de los lepisosteidos, es uno de los principales predadores que controlan la abundancia de las poblaciones de peces de menor nivel trófico (Scarnecchia, 1992; Ostrand *et al.* 2004).

Esta especie presenta una coloración marrón con oliva en las regiones dorsales laterales y la parte superior, con tonos más claros en regiones laterales y ventral inferior (Ross, 2001; Gilbert y Williams, 2002). Su cabeza y cuerpo están cubiertos por numerosos lunares y manchas oscuras. Alcanzan una talla máxima de 819 mm, tienen un hocico y rostro medianamente alargados. Su anchura mínima es 4.5 a 11 veces menor a su longitud. Tiene entre 53-59 escamas en la línea lateral y 45-54 predorsales. Cuentan con 14-33 branquiespinas totales (Contreras y Ruiz, 2010).

Las preferencias alimenticias de los lepisosteidos parecen depender de varios factores, entre los que se cuentan la disponibilidad del alimento, la etapa de desarrollo y las especies de presas (Mendoza *et al.*, 2010). Su dieta en las primeras etapas de vida consiste

en crustáceos e insectos, peces pequeños, y su alimentación cambia convirtiéndose predominantemente piscívora al crecer (Suttkus, 1963; Goodyear, 1967). El pejelargato pinto es un depredador de emboscada. Son más activos por la noche y durante el día pueden permanecer inmóviles durante varias horas (Snedden *et al.*, 1999). Nadan muy lentamente cuando están acechando a sus presas (Ostrand *et al.*, 2004) o permanecen inmóviles permitiendo que la presa se acerque, cuando la presa se encuentra a un par de centímetros, el pejelargato mueve rápidamente su cabeza lateralmente y agarra la presa tragando su cabeza primero (Redmond, 1964).

La reproducción se presenta durante la época primavera-verano. A lo largo de la temporada de reproducción se pueden encontrar decenas de individuos a pesar de que presentan un comportamiento poco gregario (Dean, 1895; Holloway, 1954; Alemán, 1987). Las hembras encabezan los grupos de reproductores, mientras que los machos avanzan detrás expulsando el esperma para fecundar los óvulos, los cuales son adherentes y se fijan a la vegetación sumergida (Contreras, 1987). Generalmente, una hembra grande es acompañada de tres machos de menor tamaño. Son considerados desovadores parciales con una fecundidad promedio de 5,000 huevos por temporada reproductiva, el desove ocurre en aguas superficiales con abundante vegetación enraizada (Love, 2004; Contreras y Ruiz, 2010).

El pejelargato pinto presenta dimorfismo sexual, las hembras suelen ser más largas y más pesadas que los machos de la misma edad (Tyler y Granger, 1984, Ferrara 2001; Love, 2002). A este respecto, Love (2002) reportó que las hembras muestreadas en el estuario del Lago Pontchartrain, Louisiana, viven más que los machos además de poseer hocicos más largos que éstos. Sin embargo, la relación de la longitud del hocico a la cabeza cambia de acuerdo al tamaño de los peces y, por lo tanto, no se considera una manera precisa para identificar el sexo (Suttkus, 1963).

Algunos estudios sobre el pejelargato pinto incluyen: determinación de la edad y fecundidad (Redmond, 1964), la historia de las primeras etapas de vida (Simon y Tyberghein 1991), la tasa de crecimiento (Redmond, 1964); hábitos alimenticios (Redmond, 1964, Goodyear, 1967), movimiento estacional (Snedden 1999) y la aplicación de hormonas tiroideas para acelerar la metamorfosis (Castillo, 2012).



### 2.1.2 Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Las tilapias son organismos oriundos de aguas tropicales de África y han sido introducidas hacia otros países tropicales y subtropicales en todo el mundo. Estos peces son robustos y de baja demanda respiratoria. Tienen gran resistencia a temperaturas altas lo que facilita su transporte. Además se reproducen con facilidad. Por lo anterior, se han dispersado enormemente fuera de su área natural (Northcott, 1992).

En general, las tilapias son de hábitos alimenticios herbívoros con tendencia omnívora, su dieta natural está constituida en mayor o menor grado por plantas superiores, detritos vegetales, algas azul-verdes, diatomeas, fitoplancton, fitobentos, perifiton, macrofitas acuáticas, zooplancton y bacterias, existiendo variaciones en cuanto a preferencias alimentarias según la especie y condiciones de cultivo (Northcott, 1992).

El cultivo comercial de tilapia en Latinoamérica ha crecido enormemente en los últimos 25 años (FAO, 2004). En México se ha creado infraestructura con la intención de hacer de la piscicultura una actividad productiva rentable y rutinaria del campo, debido a que es una actividad capaz de proporcionar, además de alimento, recursos económicos y empleo (Arce, 1989).

La tilapia es una de las especies más importantes y útiles de cíclidos, no sólo para la acuicultura de agua dulce (FAO, 2004), sino también para la investigación en la fisiología (Wright y Land, 1998; Melamed *et al.*, 1998; Seale *et al* 2002), la biología y la genética molecular (Majumdar y McAndrew, 1986; Kocher *et al.*, 1998; Oliveira y Wright 1998; McConnell *et al* 2000; Lee *et al*, 2003; Katagiri *et al*, 2005; Lee *et al.*, 2005, Santini y Bernardi, 2005). *O. niloticus* tiene una alta fecundidad pudiendo ovopositar cientos de huevos en un desove. Por otra parte, la capacidad de reproducción se mantiene durante todo el año (ciclo de desove de 2 a 3 semanas).

Estas características hacen que *O. niloticus* sea un excelente modelo de especie para el estudio de la biología del desarrollo de los cíclidos.

## 2.2 Desarrollo larvario

### 2.2.1 Pejelagarto pinto

Los peces presentan diferentes patrones de desarrollo, los cuales dependen de diversos factores, entre los que se pueden mencionar el nivel evolutivo del grupo, el tamaño y cantidad de huevos producidos, así como el posible cuidado que los padres proporcionen a las crías, los hábitos alimenticios, las reservas de vitelo en el huevo y las adaptaciones que presenta la especie al medio y al alimento. (Baragi y Lovell, 1986).

En este sentido Dean (1895) describió el desarrollo embrionario de los lepisosteidos, desde la fecundación hasta la eclosión, además realizó una comparación con el desarrollo embrionario de los esturiones, destacando de su estudio que los lepisosteidos presentan un desarrollo embriológico con características intermedias entre los holosteos y teleósteos. Por otro lado, Simon y Tyberghein (1991) realizaron un estudio morfológico del desarrollo temprano de esta especie, en el que reportan una tasa de crecimiento de 0.83 mm/día.

Los huevos de los lepisosteidos son moderadamente grandes y las larvas se caracterizan por un periodo vitelino extendido, como consecuencia las larvas son relativamente grandes y están muy desarrolladas cuando empieza la alimentación exógena. Esta etapa es altamente susceptible a la depredación debido a que los huevos y las larvas con saco vitelino se adhieren a la vegetación, sin embargo los lepisosteidos han desarrollado un mecanismo de defensa incorporando sustancias cardiotóxicas en los huevos. Dentro de la familia de los lepisostéidos, los catanes poseen los huevos más tóxicos (Burns *et al.*, 1981).

En los lepisosteidos, así como en los esturiones, el periodo que va de la eclosión hasta el inicio de la alimentación exógena puede ser tan largo como el desarrollo embrionario y es conocido como período pre-larval (Aguilera, 1999). Las etapas nutricionales para el catán (*Atractosteus spatula*) y el pejelagarto (*A. tropicus*) pueden ser distinguidas de acuerdo a los criterios establecidos por Beccaria *et al.*, (1991) descritos en la tabla 1.

**Tabla I. Etapas nutricionales para el catán (*Atractosteus spatula*) y el pejelagarto (*A. tropicus*)**

<b>Etapas</b>	<b>Longitud total (mm)</b>	<b>Descripción</b>
<b>Lecitotrófica (1-4 DDE)</b>	6.8 y 13.5	Las larvas permanecen adheridas a la vegetación y se alimentan únicamente del vitelo, cuyas reservas todavía permanecen en el saco vitelino
<b>Lecitoexotrófica (5-8 DDE)</b>	12.5 y 22.5	Inicia la etapa de alimentación exógena, sin embargo, algunas larvas aún presentan reservas vitelinas
<b>Exotrófica</b>	22	En esta etapa las larvas dependen totalmente de la alimentación exógena

El estudio más reciente sobre el desarrollo larvario del pejelagarto pinto es el de Castillo (2012), quien se evaluó el efecto de las hormonas tiroideas (T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y TSH) administradas a las hembras reproductoras, a los huevos y a las larvas. En esta investigación determinó la condición de las larvas utilizando índices de condición morfométricos, moleculares y cuantificó la actividad de las proteasas digestivas. Este autor pudo observar efectos favorables de las hormonas tiroideas como el incremento en el número de desoves y un aumento en la tasa de eclosión, así como la aceleración del metabolismo (utilización de las reservas vitelinas, desarrollo del hocico, incremento en la actividad de las proteasas alcalinas totales y actividad tipo tripsina).

### **2.2.2 Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

El desarrollo larvario inicia después del período de eclosión, definiendo el final de este como la absorción del vitelo (etapas 19-25). El desarrollo larvario se subdivide en dos períodos: larvas tempranas y larvas tardías. El período larval temprano consiste de cuatro etapas; etapas 19-22. Las larvas tempranas comienzan a mover sus mandíbulas, aletas opérculos y aletas pectorales. El período larval tardío consiste en tres etapas; etapas 23-25. Este se caracteriza por el inflamamiento de la vejiga natatoria y la funcionalización del esqueleto faríngeo antes de iniciar la alimentación exógena. El término "larva" es de uso frecuente para el período del pez en metamorfosis (Kunz, 2004).

Sin embargo, durante la ontogenia, todos los peces experimentan un período de cambio estructural postembrionario, el grado de cambio varía entre especies (Youson, 1988; Sanderson y Kupferberg, 1999). Este hecho ha dado lugar a un debate amplio y permanente en relación con la terminología (Balon, 1975, 1990, Kendall *et al.*, 1915; Kunz, 2004).

En el periodo temprano del estadio larvario se presentan varios cambios dinámicos: (1) la diferenciación de las aletas, (2) el desarrollo de los dientes, (3) la diferenciación de varios huesos dérmicos, (4) la formación de los primordios de las aletas pélvicas; (5) el inflamamiento de la vejiga natatoria; (6) la aparición de iridóforos; (7) la expansión de los melanóforos, y (8) la maduración del intestino.

La metamorfosis de la tilapia del Nilo también es mediada por estímulos endocrinos como la acción de las hormonas tiroideas. Se ha observado que en esta especie los folículos tiroideos se desarrollan de la etapa 21 a la etapa 22 (Morrison *et al.*, 2001), mientras que en otras especies de tilapia (*e.g. O. mossambicus*), las hormonas tiroideas comienzan a aumentar justo antes de la absorción del vitelo (Reddy *et. al.*, 1992).

## **2.3 Hormonas tiroideas**

### **2.3.1 Regulación de la función tiroidea**

Las hormonas tiroideas juegan un papel esencial en la ontogenia de los vertebrados, y resultan particularmente importantes para el desarrollo normal del sistema nervioso central y periférico, corazón, hígado, tracto intestinal, esqueleto y músculo liso (Hsu y Brent, 1998). Los niveles séricos equilibrados de estas hormonas son cruciales para la eficiencia reproductiva normal y el desarrollo embrionario en todos los vertebrados, incluyendo peces (Swapna y Senthilkumararan, 2007).

La tirogénesis implica la síntesis de tiroglobulina por los tirocitos, la exocitosis de esta proteína en el lumen folicular del tejido de la tiroides, la yodación extracelular, la oxidación y la glicosilación de la proteína. La liberación de las hormonas implica pinocitosis de tiroglobulina por los tirocitos y la liberación proteolítica en vesículas citoplasmáticas compuestas de tironina yodada, siendo estos elementos de la estructura de

la tiroglobulina. Debido a la complejidad de la tirogenesis y la liberación o secreción de hormonas tiroideas, estos eventos sólo se han descrito en mamíferos adultos, y relativamente poco se sabe de los procesos en los embriones de vertebrados (Raine, 1999).

A raíz de datos históricos, como el aislamiento de hormonas tiroideas (L-tiroxina (T<sub>4</sub>) y 3,5,3',5'-tetrayodo-L-tironina (T<sub>3</sub>)), extractos de tiroides por Kendall (1915), y la síntesis de la 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T<sub>3</sub>) por Gross y Pitt-Rivers (1954), se reconoció que éstas hormonas estaban involucradas en la diferenciación, crecimiento, metamorfosis, desarrollo, y reproducción. Así mismo, se supo que eran esenciales para el metabolismo de la energía aeróbica, y que se encargaban de preparar el mecanismo celular para las demandas de la tasa metabólica, la subsecuente respiración aeróbica y el consumo de oxígeno. La glándula tiroidea deriva de la porción del endodermo cefálico del tubo digestivo del embrión (endodermo de la base de la faringe). En los teleosteos, a diferencia de los mamíferos, no existe una organización típica de la glándula. Los folículos se encuentran aislados o bien formando pequeños grupos dispersos en el tejido conjuntivo debajo de la faringe. Sin embargo, la distribución es bastante aleatoria debido a que la glándula no se encuentra encapsulada por el material conjuntivo (Gudernatsch, 1911).

El tejido tiroideo está compuesto por un epitelio cuboide dispuesto en una sola capa que limita los espacios esféricos llenos de una sustancia coloidal. Esta estructura forma folículos tiroideos de diámetro variable según la especie y el estado funcional del tiroides. Los folículos tiroideos son la unidad básica de la glándula tiroidea. De esta forma, en la glándula tiroidea con células foliculares activas (forma cúbica), el tamaño del lumen disminuye, mientras que, si contiene células inactivas (formas aplanadas) aumenta el lumen. La tiroides se encuentra vascularizada y presenta capilares fenestrados para facilitar el paso de las hormonas tiroideas (T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>) hacia los vasos (Handley, 1997).

La síntesis de hormonas tiroideas es un proceso que involucra múltiples pasos de transporte activo y concentración de yodo en los folículos tiroideos por un cotransportador (Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>), la oxidación de yodo atrapado por la peroxidasa tiroidea y la incorporación de residuos de tirosina de la glicoproteína tiroglobulina. La síntesis está regulada por la acción de la tirotropina, la cual es la hormona estimulante de la tiroides (TSH – *Thyroid*

*Stimulating Hormone*). Esta glicoproteína se forma por heterodimerización de subunidades a y b (Swapna y Senthilkumararan, 2007). La estimulación de la tiroides por la TSH tiene como resultado un gran aumento en la cantidad y actividad de la maquinaria sintética (retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi) de las células foliculares. Las células adquieren una forma columnar y el contenido luminal del coloide disminuye en gran medida. En ausencia de la TSH, la síntesis de las hormonas tiroideas es mínima o, simplemente, no existe (Handley, 1997). La TSH interacciona con sus receptores de la membrana de la célula folicular y, gracias a la acción de un segundo mensajero (AMPc), se origina la respuesta celular.

La secreción de las hormonas tiroideas se encuentra bajo control del llamado eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo. En el hipotálamo existen neuronas que sintetizan, transportan y liberan a la neurohipófisis diversos factores que estimulan (*TRH – Tirotropin Releasing Hormone*: hormona estimulante de la TSH) o inhiben (Somatostatina, *TIF – Tirotropin Inhibiting Factor*: factor inhibidor de la TSH) las células tirótropas localizadas en la *pars distalis proximalis* de la adenohipófisis. La TSH es sintetizada por dichas células y, gracias al torrente circulatorio, alcanza la glándula tiroides, donde estimula la síntesis y liberación de las dos hormonas tiroideas (T3 y T4) a la sangre (Handley, 1997). La secreción de estas hormonas implica la endocitosis de tiroglobulina yodada del lumen folicular seguida de la digestión proteolítica en fagolisosomas y su liberación, donde una parte importante de las hormonas tiroideas se liberan en forma de T4 y la cual es llevada en la circulación unida a la globulina de unión de tiroides y prealbúmina de unión de tiroides.

Estas hormonas son de naturaleza lipófila, por lo que pueden atravesar la membrana plasmática y llegar al citoplasma, en donde la T4 se convierte en T3 siendo esta última la forma fisiológicamente activa de la hormona. La mayor parte de la T3 presente en la circulación periférica se obtiene a través de la conversión extratiroidea de T4 en T3 cuando la enzima 5'-monodesiodinasa remueve una unidad yódica del anillo exterior de T4 (Power *et al.*, 2001; Yamano, 2005).

La T3 atraviesa la membrana nuclear para interactuar con su receptor, que se encuentra en el núcleo realizando una represión transcripcional. Una vez que se ha unido a su receptor, el complejo hormona-receptor se une a los elementos de respuesta tiroidea específicos presentes en los genes regulados por las hormonas tiroideas (Wiley y Sons, 1983).

### **2.3.2 Efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo larval**

En las últimas décadas se ha experimentado una gran dependencia del hombre en relación a los peces cultivados como una valiosa fuente alimenticia. En tal virtud, también se han incrementado los esfuerzos de los científicos y especialistas, para dominar las técnicas de reproducción y rápida propagación de alevines y juveniles en estanques y en muchos cuerpos de aguas libres y/o controlados, como represas, embalses, atajados, jagueyes, etc., así como lagos, lagunas y ríos (<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab491s/ab491s02.htm>).

En la acuicultura, la mejora en el crecimiento de los peces ha ganado gran importancia, en particular debido al aumento en los costos de producción. En este punto las ganancias pueden incrementarse mediante el uso de hormonas como alimentos aditivos para lograr una mayor tasa de crecimiento y una menor tasa de conversión de alimentos para producir la cosecha necesaria durante un período más corto y a un costo menor (Kaur, 1998).

Al igual que en los mamíferos, el mantenimiento adecuado de la glándula tiroidea en peces es un requisito previo para un crecimiento normal (Higgs, Fagerlund, Eales y McBride, 1982; Weatherley y Gill 1987). En relación con esto, se han encontrado cantidades medibles de hormonas tiroideas tiroxina (T4) y 3,5,3'-triyodotironina (T3), presumiblemente de origen materno, en los huevos de diversas especies de peces (Tagawa, Miwa, Inui, dejesus y Hirano 1990a, b; Reddy, Brown, Leatherland y Lam 1992, Lam 1994), no obstante se ha demostrado que la administración exógena de T4 y T3 estimula la absorción del saco vitelino, promueve el crecimiento, el desarrollo y/o mejora la supervivencia en muchas especies de teleósteos incluyendo tilapias (Lam 1980; Nacario

1983; Reddy Y Lam 1992a), salmónidos (Refstie 1982; Fagerlund, McCallum, Higgs, McBride, Plotnikoff y Dosanjh 1984, Higgs *et al.* 1992), y carpas, tales como *Cyprinus carpio* (Lam & Sharma, 1985; Kumar, Swarup y Singh 1991) y *Carassius auratus* (Reddy y Lam 1992b). El mecanismo probable de la estimulación del crecimiento por T4/T3 es a través del sinergismo con la hormona del crecimiento (Weatherley y Gill 1987; Farbridge y Leatherland 1988), sin embargo no ha sido descartada una influencia directa en el desarrollo de éstas por T4 en tejido somático, cartílago y hueso (Higgs *et al.* 1982).

Se han realizado una gran cantidad de estudios administrando hormonas tiroideas de manera exógena a larvas y reproductores en distintas especies de peces, a continuación se presenta una recopilación de algunos datos representativos:

**Tabla II. Efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo larvario.**

<b>Especie</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia</b>
<b>Sabalote</b> ( <i>Chanos chanos</i> )	T4 Se aceleró el crecimiento y desarrollo, se incrementó la pigmentación plateada.	Lam <i>et al.</i> , 1985
<b>Pez conejo</b> ( <i>Siganus guttatus</i> )	T4 Mostraron una mejor supervivencia y se incrementó la longitud.	Ayson y Lam, 1993
<b>Barbudo</b> <i>Polydactylus sexfilis</i>	T3 Se aceleró el inicio de la formación del intestino y se incrementó la pigmentación, mejoró la supervivencia, se observó un crecimiento más uniforme y una reducción en la tasa de canibalismo.	Brown y Bong, 1995
<b>Pez cebra</b> ( <i>Danio rerio</i> )	T3 Aumentó la pigmentación y se aceleró el periodo de incubación.	Walpita <i>et al</i> 2007
<b>Tilapia</b> ( <i>Oreochromis mossambicus</i> )	T4 Incremento en niveles de T4 y en longitud total y estándar.	Subburaju, <i>et al.</i> , 2007
<b>Lobina</b> ( <i>Morone saxatilis</i> )	T3 Aumento de longitud y peso seco.	Brown <i>et al.</i> , 1998
<b>Pira pitá</b> ( <i>Brycon orbignyanus</i> )	T3 Aumento de supervivencia y aumento de peso.	Landines <i>et al.</i> , 2010
<b>Pez roca</b> ( <i>Sebastes schlegeli</i> )	T3 Incremento del nivel de T3 y mejor tasa de supervivencia	Kang y Chang, 2005
<b>Salmon coho</b> ( <i>Oncorhynchus</i> )	T3 Incremento en longitud y peso.	Higgs <i>et al.</i> , 1979



<i>kisutch</i> )			
<b>Yamú</b> ( <i>Brycon siebenthale</i> )	T3	Desarrollo corporal más homogéneo.	Garcia <i>et al.</i> , 2004
<b>Carpa de la India</b> ( <i>Cirrhina cirrhosa</i> )	T3	Mejor índice de conversión de alimentos y tasa de crecimiento.	Kaur, 1998
<b>Trucha arcoiris</b> ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	TSH	Aumento de los niveles de T4 plasmáticos.	Milne y J.F. Leatherland, 1978
<b>Jurel</b> ( <i>Seriola lalandi</i> )	T3	Incremento de supervivencia.	Tachihara, 1997
<b>Lenguado</b> ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	TSH	Aceleración de metamorfosis.	Inui <i>et al.</i> , 1989.
<b>Channa gachua</b> ( <i>Ophicephalus gachua</i> )	TSH	Aumentó de la actividad de la peroxidasa tiroidea.	Chakraborti y Bhattacharya, 1977
<b>Salmón coho</b> ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> )	TSH	Cambios ultraestructurales en la proliferación del folículo, incremento en el número de organelos citoplasmáticos y secretores.	Nishioka <i>et al.</i> , 1987.
<b>Pez dorado</b> ( <i>Carassius auratus</i> )	TSH	Incremento en el nivel plasmático de T4	Miller <i>et al.</i> , 2010
<b>Trucha</b> ( <i>Salvelinus fontinalis</i> )	TSH	Incremento en el nivel plasmático de T4	Chan H. y Eales, 1976.
<b>Pez gato</b> ( <i>Galeichthys felis</i> )/ <b>Raya látigo</b> ( <i>Dasyatis sabina</i> )	TSH	Aumento de la liberación de tiroxina, incremento en el área ocupada por el epitelio en las secciones a través de la glándula.	Rodney y Sage, 1973

## 2.4 Microencapsulación

La encapsulación se puede definir como una técnica por medio de la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo una sustancia activa (Araneda y Valenzuela, 2009), esta membrana, barrera o película está generalmente hecha de componentes con cadenas para crear una red con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas (Fuchs *et al.*, 2006). Se utiliza de igual manera el

término de microencapsulación en la industria alimentaria, cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades, aunque los dos términos, encapsulación y microencapsulación, se emplean indistintamente (Yañez *et al.*, 2002).

Los procesos de encapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por la *National Cash Register* para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante (Yañez *et al.*, 2002). El inicio de los productos de microencapsulación comenzó en 1950 con las investigaciones relacionadas con la presión-sensitiva de cubierta para la elaboración de papel destinado a copias (Madene, Scher y Desobry, 2006).

Entre las primeras aplicaciones prácticas de la microencapsulación destacan las de la industria farmacéutica, médica, textil, de alimentos (Dutta *et al.*, 2009;), pesticida (Araneda y Valenzuela, 2009; Li *et al.*, 2009), cosmética, química (Fuchs *et al.*, 2006), de imprenta (Madene, Scher y Desobry, 2006) agroquímica (Villamizar y Martínez, 2008) fragancias, tintes, agentes antimicrobianos (Zong *et al.*, 2009) biomédica (Champagne y Fustier, 2007; Luo y Pozrikidis, 2009) y de plásticos (Dutta *et al.*, 2009).

La microencapsulación protege a los materiales encapsulados de factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad, también se ha utilizado para mejorar el sabor y la estabilidad de medicamentos y como barrera contra malos olores y sabores. Ayuda, además, a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia. En el caso de fármacos cuya liberación se lleva a cabo en el estómago o en el intestino, permite una máxima absorción de los compuestos con un mínimo de reacciones adversas. Además la microencapsulación protege a los probióticos de los bacteriófagos y de los ambientes adversos, como la congelación y las soluciones gástricas, y facilita la manufacturación de productos fermentados, ya que, proporciona condiciones más constantes.

Las micropartículas tienen un tamaño que oscila desde 1 a 250 nm. Dentro de este grupo se incluyen las microcápsulas, que son sistemas vesiculares en los que el fármaco está confinado en una cavidad rodeada de una única membrana polimérica; y las

microesferas que son sistemas con matrices en las que el fármaco está disperso en la partícula.

Existen varios métodos para lograr la encapsulación de ingredientes entre los que se encuentran: secado spray, recubrimiento en suspensión de aire, extrusión, *spray cooling* y *spray chilling*, coacervación, complejos de inclusión y polimerización interfacial (Dziezak, 1988). La selección del método de encapsulación está en función de los costos, de las propiedades del material a encapsular, del tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación y de los mecanismos de liberación (Pedroza, 2002).

#### **2.4.1 Emulsión múltiple**

Hoy en día muchas sustancias pueden ser encapsuladas en partículas en polvo sólidas o microencapsuladas en emulsiones estructuradas (Palzer, 2009).

Una emulsión es la mezcla de dos sustancias inmiscibles entre sí a través de un agente tensoactivo o surfactante. Las emulsiones están constituidas por tres regiones, las cuales presentan propiedades fisicoquímicas diferentes. Una fase dispersa, una fase continua y una interfase (membrana interfacial). Todas las moléculas o ingredientes de la emulsión se distribuyen de acuerdo con su concentración y polaridad, a lo largo de las regiones mencionadas anteriormente. Las moléculas polares tienden a localizarse en la fase acuosa, las moléculas no polares tienen afinidad por la fase oleosa, y las moléculas anfifílicas se localizan en la interfase (McClements, 2005).

Además de las emulsiones convencionales O (aceite) / W (agua) y W / O, también es posible preparar distintos tipos de emulsiones múltiples, por ejemplo, aceite/agua/aceite (O1/W/O2) o agua/aceite/agua (W1/O/W2) (Garti, 1997). Recientemente, se ha investigado como crear emulsiones múltiples estables que se pueden utilizar para controlar la liberación de determinados ingredientes, reducir el contenido total de grasa de los productos alimenticios a base de emulsión, o para aislar un ingrediente de otro ingrediente con el que normalmente podrían interactuar (McClements, 2005).

Las emulsiones múltiples del tipo agua/aceite/agua (W1/O/W2) consisten de gotas

de agua dispersas en grandes glóbulos de aceite, los cuales están dispersos a su vez en una fase acuosa continua (McClements, 2005). Aprovechando su estructura de doble compartimento, ha surgido un interés creciente hacia las emulsiones múltiples, desde su primera descripción en 1925 (Seifriz, 1925), al ser consideradas como reservorios de sustancias encapsuladas para ser liberadas bajo condiciones variables. Aunque las emulsiones múltiples permanecen sin ser usadas frecuentemente en la industria, sus aplicaciones potenciales son numerosas y el estudio de estos sistemas es actualmente un campo activo de la investigación, especialmente en áreas como biorremediación (Pimentel-González, *et al.*, 2008), farmacéutica, cosméticos (Bais y Lapasin, 2003) y alimentos (Dickinson y McClements, 1996). Las emulsiones W1/O/W2 permiten la encapsulación de moléculas activas en la fase acuosa interna, y esto hace posible enmascarar sabores u olores; proteger moléculas contra la oxidación, luz o degradación enzimática; o para asegurar la liberación controlada de los ingredientes activos encapsulados.

Las emulsiones dobles son preparadas tradicionalmente mediante el método de dos etapas con dos tensoactivos de solubilidad opuesta. Para producir una emulsión W1/O/W2, primero se utiliza un tensoactivo con un valor de balance hidrófilo-lipófilo bajo ( $HLB < 5$ ) el cual es disuelto en aceite. Después, se añade agua, se homogeniza y se forma una emulsión W1/O. El sistema es entonces re-emulsionado en una solución acuosa de tensoactivo con un HLB alto ( $>10$ ) para producir una emulsión doble (W1/O/W2). Ambos tensoactivos se mezclan en las interfaces agua/aceite, y el tiempo de vida de las películas formadas en las interfaces es gobernado por la composición de la mezcla binaria de surfactantes (Pays, *et al.*, 2001). Sin embargo las emulsiones formuladas así, no son del todo estables, particularmente cuando se usan en sistemas hidrodinámicos sujetos a altas tasas de corte, aquí radica la importancia de conocer las propiedades de los tensoactivos y polímeros de la encapsulación.

## **2.4.2 Emulsión múltiple con evaporación de solvente**

La evaporación del solvente es un método ampliamente usado en preparación de microcapsulas hechas de polímeros biodegradables. Primeramente, se requiere la formación de una emulsión que puede ser: aceite en agua (o/w), aceite en aceite (o/o) y agua en aceite en agua (w/o/w). La elección de la naturaleza de la fase interna y externa depende de las propiedades hidrofílicas-hidrofóbicas del principio activo que se va a asociar con el transportador (Kawashina *et al.*, 1998; Valero *et al.*, 1985).

Para acelerar el proceso de formación de las microparticulas el disolvente es eliminado a baja presión (y normalmente a baja temperatura) para aumentar la viscosidad de la fase interna, seguida del aislamiento de las microesferas (Saez *et al.*, 2004). Las microparticulas formadas son lavadas y recolectadas por filtración o centrifugación (Blanco *et al.*, 1995) y secadas por liofilización u otro proceso de secado (Ramos *et al.*, 2000).

Aunque este método es conceptualmente simple, muchas variables pueden influir en el producto final, tanto en las propiedades físico-químicas, incluyendo la eficiencia de encapsulación (Amstrong *et al.*, 1995), como en el comportamiento de la liberación del principio activo desde las microcapsulas in vitro e in vivo. Estas variables son: la velocidad de agitación en la emulsificación, el tipo y concentración del tensioactivo, la relación de la fase dispersa-fase continua (Conti *et al.*, 1995), las condiciones en las que el solvente es evaporado (Soriano *et al.*, 1995). También influye el tipo y porcentaje de principio activo, el tipo de solvente, la relación principio activo-polímero, los polímeros empleados, así como su concentración y masa molecular (Amstrong *et al.*, 1995).

## **2.4.3 Características de los polimeros de microencapsulación**

### **2.4.1 Goma arábica**

Las dispersiones coloidales están implicadas en múltiples productos alimenticios. En la mayoría, las proteínas y polisacáridos están presentes es su elaboración. Las proteínas son los principales estabilizadores, mientras que los polisacáridos confieren estabilidad a través de su espesamiento y estabilización estérica, como resultado de su actividad en la

superficie o la interacción con las proteínas. Varios polisacáridos incluyendo las gomas se han utilizado para mejorar la estabilidad de las emulsiones (Dickinson y Euston, 1991; Garti, 1999; Yilmazer, Carrillo, y Kokini, 1991).

Las propiedades reológicas resultantes varían dependiendo de la concentración de la goma, el tipo de polisacárido, peso molecular, la presencia de grupos funcionales y también del grado de interacción entre proteína-polisacárido. (Campanella, Dorward, y Singh, 1995).

La goma arábiga (GA) es el exudado gomoso comercial más común, es un polisacárido de alto peso molecular y se produce principalmente en las regiones de África de las cuales Sudán es el mayor productor del mundo (Verbeken, Dierckx, y Dewettinck, 2003). La GA se obtiene a partir de árboles de las especies de *Acacia* tales como *Acacia seyal senegal* y *Acacia spp.*, donde la primera es la principal fuente de ésta (Al-Assaf, Phillips, y Williams, 2005; Churms, Merrifield, y Stephen, 1983).

La estructura química de la GA se compone de una cadena de unidades de  $\beta$ -Galactopiranosas unidas a través de las posiciones 1-3, con cadenas laterales de unidades de Galactopiranosas 1-6 terminadas en residuos de ácido glucorónico o 4-O metil glucorónico. Algunos grupos adicionales se unen también a las posiciones C-3 sobre las cadenas naturales de Galactosa. La hidrólisis completa de la molécula produce los 4 azúcares constituyentes básicos: D- Galactosa, L-Arabinosa, L-Ramnosa y D-Ácido glucorónico (Street y Anderson, 1983).

La goma arábiga presenta actividad emulsificante que se produce en la interfase de la emulsión aceite-agua (O / W), esta propiedad se le atribuye a la fracción de proteína arabinogalactano (AGP) (Al-Assaf, Katayama, Phillips, Sasaki, y Williams, 2003; Islam, Phillips, Sljivo, Snowden, y Williams, 1997), la cual se une covalentemente con estructuras de polisacáridos altamente ramificados (Dickinson, Elverson, y Murray, 1989; Dickinson, Galazka, y Anderson, 1991; Randall, Phillips, y Williams, 1988).

Los restos de ésta proteína en la estructura ayudan a estabilizar la emulsión contra la coalescencia y la floculación a través de impedimento estérico derivados de los que sobresalen las cadenas de hidratos de carbono hidrófilos (Bergentåhl, Fogler, y Stenius,

1986; Dickinson, Galazka, y Anderson, 1991a; Savary, Hucher, Bernadi, Grisel, y Malhiac, 2010).

La goma árabe tiene múltiples usos en la industria farmacéutica, de alimentos (confitería, películas protectoras para sabores) y en gran medida en la industria de las bebidas para la estabilización de sabor disperso en los aceites. Se ha demostrado que la fracción de proteína que contiene se adsorbe fuertemente en la interfase aceite-agua (Randall, Phillips, y Williams, 1988). Por lo tanto, la goma árabiga no sólo mejora la viscosidad de la fase acuosa como la mayoría de los demás gomas de polisacáridos, también forma una capa macromolecular gruesa alrededor del gotitas de la emulsión, lo que resulta en una buena estabilización estérica.

#### **2.4.2 Eudragit**

Los sistemas de liberación controlada (micropartículas, nanopartículas, y liposomas, etc) son usados para obtener una liberación prolongada y controlada de un compuesto activo, así como para mejorar su biodisponibilidad (Cetin *et al.*, 2010).

Dentro de los materiales para la elaboración de estos sistemas, algunos polímeros como los derivados metacrílicos han despertado un indudable interés en diferentes áreas industriales como consecuencia de sus propiedades adhesivas, plásticas y de su capacidad de recubrimiento, estos se conocen comercialmente como Eudragit® (Lira, 2009). Estos son copolímeros derivados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico cuyas propiedades fisicoquímicas son determinadas por sus grupos funcionales (R). Los polímeros Eudragit (Poly-methacrylic acid-co-methyl methacrylate) L, S, FS y E con grupos ácidos o alcalinos permiten la liberación del principio activo en forma dependiente del pH (Evonik Industries AG Pharma Polymers. [www.evonik.com](http://www.evonik.com)). Estas resinas acrílicas son particularmente atractivas en este campo como consecuencia de su elevada estabilidad química, de su compatibilidad con diferentes materiales y del considerable número de variedades disponibles, que cubren un amplio espectro de características de solubilidad, permeabilidad y de formas de presentación (Rowe *et al.*, 2006).

Entre las numerosas aplicaciones que han encontrado los Eudragit como excipientes en formas de dosificación sólidas, hay que destacar, en primer lugar, su empleo como materiales de recubrimiento. Así, los grupos funcionales amino de la cadena lateral de las variedades E dan lugar a la formación de películas solubles a pH ácido que resultan de utilidad para la liberación de fármacos a nivel gástrico, para conseguir un efecto protector frente a la humedad y frente a otros factores ambientales o para el enmascaramiento de las propiedades organolépticas de algunos fármacos. Las formas aniónicas de Eudragit (FS, L y S), que incorporan en su estructura grupos carboxílicos, son solubles a valores más elevados de pH y han encontrado aplicación como materiales gastroresistentes (Moustafine *et al.*, 2006).

Una serie de estudios de reciente publicación ratifican la utilidad y el interés de este grupo de copolímeros como materiales de recubrimiento para comprimidos, cápsulas, gránulos y pelets (Kühl y Mielck, 2002; Mura y col., 2003; Lee y col., 2005; Siepmann y col., 2005; Huyghebaert y col., 2005; Moustafine y col., 2006; Young y col., 2007; Poelvoorde y col., 2008; Tian y col., 2008; Kucera y col., 2008).

## **2.5 Índices de condición fisiológica e indicadores de desarrollo**

El crecimiento y sobrevivencia de las larvas de peces depende, en gran medida, de su alimentación, la cual, a su vez, está determinada tanto por la disponibilidad de alimento, como por su habilidad para consumirlo durante el periodo crítico de la reabsorción del vitelo (Ehrlich, 1974). El principal objeto de preocupación de la mayoría de los biólogos pesqueros y acuacultores ha sido la determinación de la condición nutricional y el punto de no-retorno (PNR), tanto de las larvas capturadas en su medio ambiente natural, como de aquéllas mantenidas en cautiverio (Mendoza *et al.*, 2002).

La condición de las larvas y el estudio de su metabolismo, han sido estimados por medio de diferentes parámetros, entre los que se encuentran una gran variedad de indicadores morfológicos, histológicos o bioquímicos. A continuación se presenta una breve descripción en la Tabla III. (Mendoza *et al.*, 2002, Ferron y Legget, 1994).



**Tabla III. Indicadores de condición nutricional en larvas.**

<b>Indicador</b>	
<b>Morfológicos</b>	Estos cambios se expresan como tasas o vectores multivariados de medidas corporales.
<b>Histológicos</b>	Se detectan a través del análisis de la apariencia y arreglo de las células en los diferentes tejidos del pez, especialmente en el tejido digestivo.
<b>Bioquímicos</b>	La condición se estima por medio de la cuantificación de los constituyentes químicos utilizados como sustratos energéticos.
<b>Moleculares</b>	Se basan en las variaciones de los niveles de ácidos nucleicos y en su relación con la expresión diferencial de proteínas y el peso de los individuos.

### **2.5.1 Actividad de las enzimas digestivas**

En la acuicultura, el desarrollo de dietas capaces de sustituir a los alimentos vivos requiere del conocimiento de los procesos digestivos que ocurren durante la ontogenia. De esta manera, la formulación del alimento adecuado para cada especie, contribuye a obtener un incremento en las tasas de crecimiento y supervivencia para cada especie (Cahu y Zambonino, 1997; Lazo *et al* 2000a).

Los cambios que se presentan durante el desarrollo morfológico del tracto digestivo están acompañados necesariamente por cambios en su funcionamiento, principalmente en el tipo de enzimas digestivas producidas y en el nivel de actividad de las mismas. La falta de un equipamiento enzimático completo, al inicio de la alimentación exógena, ha sido una de las principales razones atribuidas a la dificultad para utilizar dietas artificiales por las larvas de peces. Al mismo tiempo, se ha encontrado una correlación entre el incremento de la actividad enzimática con el funcionamiento del estómago y la habilidad para digerir los alimentos artificiales (Alliot *et al.*, 1977; Lauf y Hofer, 1984; Buddington, 1985; Ueberschar, 1985; Person-Le Ruyet, 1990; Dabrowski y Culver, 1991; Moyano *et al.*, 1996).

Debido a su papel esencial en las reacciones metabólicas, las enzimas son buenos indicadores de la condición de un organismo. De aquí que para las larvas de peces, el nivel

de actividad de las enzimas digestivas resulte adecuado como indicador bioquímico de la actividad de alimentación (Lazo *et al.*, 2011).

Para la correcta evaluación de la condición y desarrollo del sistema digestivo en las larvas de peces es necesario segmentar sus características durante el desarrollo. A este respecto, Budington (1985) definió tres etapas para completar una maduración total del sistema digestivo en peces (Tabla IV)

**Tabla IV. Etapas de maduración del sistema digestivo en peces.**

<b>Etapas</b>	
<b>Primera fase (alimentación endógena)</b>	Se produce la diferenciación del tracto y se presenta una actividad enzimática incipiente
<b>Segunda fase (inicio de la alimentación exógena)</b>	El sistema digestivo no está aún completamente diferenciado y por ende la digestión es semejante a la de las especies sin estómago, caracterizadas por su baja capacidad digestiva, lo cual compensan por medio de la macro-pinocitosis de proteínas y su digestión intracelular
<b>Tercera fase (alimentación exógena)</b>	El sistema digestivo se completa y se presenta una actividad enzimática similar a la de juveniles

En función de lo anterior, se considera que la diferenciación del sistema digestivo finaliza con la formación de glándulas gástricas funcionales en el estómago y este evento se encuentra estrechamente relacionado con la terminación del periodo larval (Verret y Van Tongeren, 1989; Verret *et al.*, 1992; Walford y Lam, 1993; Moyano *et al.*, 1996).

La ontogenia de la actividad enzimática digestiva del catán comienza con una actividad proteolítica ácida desde el inicio de la alimentación exógena (5 DDE), antes de la completa absorción del saco vitelino. Del 2 al 9 DDE, las actividades de tipo tripsina, quimotripsina y aminopeptidasa se incrementan gradualmente. A partir de los 8 DDE, la actividad de las fosfatasas alcalinas aumenta, vinculado a esto se presenta un aumento en la altura de las células del epitelio intestinal, por lo cual esta actividad resulta indicativa de la maduración del intestino (Aguilera, 1999; Ruiz, 2000, Mendoza *et al.*, 2000d; Mendoza *et al.*, 2002a).

Castillo (2012) describe que el pejelagarto pinto sigue un patrón de desarrollo muy similar al de las larvas de otras especies de lepisosteidos, iniciando la actividad total de la

tripsina, proteasas alcalinas totales y leucina-aminopeptidasa a los 3 DDE mientras que la actividad proteolítica ácida se comienza a detectar a los 6 DDE, coincidiendo con el momento en que inicia la alimentación exógena. En esta misma investigación larvas de pejelagarto pinto fueron expuestas a tratamientos con hormonas tiroideas, observándose un incremento significativo de la actividad de las proteasas alcalinas totales y de la tripsina a los 9 y 6 DDE, respectivamente. Igualmente, la actividad tipo leucina-aminopeptidasa resultó mayor a los 3 y 9 DDE, en los tratamientos T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina), indicando que las hormonas tiroideas aceleran el desarrollo del tracto digestivo.

### **2.5.2 Ácidos nucleicos**

La necesidad de contar con indicadores confiables y sensibles a la condición nutricional y el crecimiento, ha conducido diferentes esfuerzos hacia el desarrollo de indicadores moleculares. Se ha mostrado que entre varios indicadores, la tasa entre el contenido total de RNA con respecto al del DNA (RNA/DNA) resulta un indicador muy útil para evaluar la condición nutricional de diferentes organismos acuáticos (Mendoza *et al.*, 2010).

El principio teórico de la utilización de la relación RNA/DNA asume que el contenido de DNA es virtualmente constante en las células somáticas, de tal manera que las concentraciones tisulares reflejan el número de células y es independiente de la condición nutricional. Mientras que, la cantidad de RNA celular, y principalmente de RNA ribosomal (RNAr) disponible en los tejidos, es directamente proporcional al nivel de síntesis de proteínas, por lo cual puede verse afectada por la condición nutricional (Mendoza *et al.*, 2002). De esta forma, la relación entre el contenido total de RNA y DNA representa un índice de la intensidad metabólica celular (Clemmesen, 1996).

El RNAr representa más del 90% del RNA celular, por lo tanto los cambios en la relación RNA/DNA estarán más relacionados con cambios en la relación de síntesis ribosomal, el turnover de los ribosomas, o una combinación de ambos mecanismos. Por consiguiente, el aumento en la relación de crecimiento y la relación RNA/DNA sería el resultado de un incremento en la síntesis de RNAr y la formación de nuevos ribosomas, o

un aumento en la eficiencia de los ribosomas al inicio de la síntesis de proteínas, en conjunto con un *turnover* más bajo de los ribosomas en los tejidos. Sin embargo, este incremento de la cantidad de RNAr se acompaña de un aumento de la traducción y por lo tanto de la síntesis de las proteínas celulares (Westerman y Holt, 1988)

La relación RNA/DNA no se ve afectada por el número de células. Sin embargo, se ha reportado que la sola estimación de la concentración de RNA puede ser un buen indicador del crecimiento. Incluso, se ha argumentado que puede resultar de mayor utilidad que la estimación de la relación RNA/DNA, ya que esta relación está influenciada no sólo por el contenido de RNA, sino también por la concentración nuclear y el tamaño de las células (Moss, 1994). En contraste, se ha reportado que la concentración de DNA, además de ser un indicador del número de células, no es sensible a los cambios en las condiciones ambientales. De aquí que la relación RNA/DNA sea un índice más preciso de la actividad metabólica que la estimación de la concentración de RNA (Steinhart y Eckmann, 1992).

Al igual que la relación RNA/DNA se han propuesto diferentes índices con el objetivo de buscar respuestas más precisas que reflejen la condición fisiológica de las larvas, como la concentración de RNA total, relación DNA/peso seco y relación RNA/peso seco (Buckley *et al.*, 1999).

Esto provee una excelente herramienta para confirmar la actividad de crecimiento de las larvas y juveniles y ha probado ser un indicador útil de la condición nutricional, como ha sido mostrado en diferentes estudios con larvas de peces (Westerman y Holt, 1988; Grant, 1996; Rooker, 1997; Buckley *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 2001).

Dentro de este contexto, Mendoza *et al.*, (2010) cuantificaron los ácidos nucleicos totales en larvas de catán, de acuerdo al método de Westerman y Holt (1988), y observaron que mientras las larvas de catán alimentadas con presas o con dietas artificiales aumentaban en peso y en tamaño, las concentraciones de DNA y RNA se incrementaban igualmente. Lo que permitió suponer un aumento de la proliferación celular y un incremento paralelo en la

cantidad total de RNA disponible para la síntesis de proteínas, mismas que serían canalizadas para el crecimiento como había sido previamente reportado por otros autores (Houlihan, 1993; Mathers *et al.*, 1994). Por otra parte, se observó un aumento gradual en la tasa RNA/DNA en el día 13 DDE y de ahí en adelante permaneció constante, sugiriendo que el crecimiento como producto de una mayor síntesis proteica intracelular se estabilizaba en esta etapa y que las larvas continuaban creciendo con la misma intensidad metabólica.

Por otro lado, Castillo (2012) sometió larvas de catán a distintos tratamientos de hormonas tiroideas, observando que la administración de T3 provocaba un aumento significativo en la relación DNA:Peso Seco y RNA:Peso Seco a los 0 DDE. Sin embargo la relación RNA:DNA no funcionó como un indicador del efecto de las hormonas tiroideas en esta especie. A diferencia del catán, en el pejelagarto pinto, la relación RNA:DNA fue significativamente menor en el tratamiento control con respecto a los tratamientos con hormonas a los 0 DDE.

### **3. HIPOTESIS**

Si se administra de manera oral la TSH protegida (microencapsulada) en las etapas larvales de Lepisosteidos y cíclidos, entonces se facilitará su incorporación, lo que permitirá observar efectos positivos en su desarrollo y supervivencia.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*), perteneciente a la familia de los lepisosteidos, es una especie endémica y pancrónica con importancia científica y comercial que se encuentra amenazada en EUA y en peligro de extinción en México, por lo que es imperativo buscar alternativas para preservarla. Una de estas alternativas es la administración de hormonas a los peces ya que permiten incrementar el desarrollo y la supervivencia de las larvas, además ofrecen la ventaja de que las larvas puedan presentar un crecimiento mayor y más homogéneo lo que a su vez permite reducir el canibalismo en el cultivo. Desafortunadamente la importante y precoz actividad digestiva de las larvas impide que los lepisosteidos pueda ser alimentados con una dieta artificial suplementada con TSH libre. Por lo que en el presente estudio se decidió evaluar distintos métodos de microencapsulación con el fin de proteger la TSH y que de esta manera pudiera ser aprovechada por los organismos, mejorando su supervivencia y desarrollo.

## 5. OBJETIVOS

### **Objetivo general**

- Encapsular la tirotropina (TSH) para su administración por vial oral a larvas de Lepisosteidos y otras especies con la finalidad de incrementar su supervivencia y acelerar su desarrollo.

### **Objetivos particulares:**

- Evaluar métodos para la microencapsulación de TSH que puedan ser utilizados en alimentos para peces
- Evaluar el efecto de diferentes formas de administración oral de TSH en el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto y tilapia por medio de diferentes criterios (bioquímicos, morfológicos y moleculares)



## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Incorporación de tirotrópina en alimento para peces**

#### **6.1.1 Microencapsulación de tirotrópina por emulsión múltiple**

La emulsión múltiple se preparó siguiendo el método de dos etapas de Ibarra *et al.*, (2012). La fase acuosa interna de la emulsión fue formada por el surfactante hidrofílico Tween 80 (polysorbato, 0.8 g) y agua destilada (29.2 g). La TSH formó parte de la fase acuosa interna en una concentración de (0.8 IU). Para la fase oleosa se utilizó Grinsted PGPR (polyglicerol, 6.4 g) como surfactante lipofílico y Aceite de canola comercial (63.6 g). La fase acuosa y oleosa fueron homogenizadas en el equipo OMNI GLH 01 a 1000 rpm por 10 min. Posteriormente para formar la emulsión múltiple, se agregaron 10 g de la emulsión primaria a 85.08 g una solución del biopolímero Goma arábiga (35.73 % sólidos totales) a 1500 rpm, una vez integrada la emulsión múltiple se adicionó al alimento comercial (Nutripec, Alimento balanceado para peces, 44% de proteína y 15% de grasa) por medio de una propela de agitación (WiseStir HS-50<sup>a</sup>).

#### **6.1.2 Microencapsulación de tirotrópina por emulsión múltiple con evaporación de solvente**

Esta emulsión se preparó a 4° C en un equipo de homogenización VD11,12,VWR siguiendo la metodología de Galindo *et. al.*, 2004 con algunas modificaciones. La TSH (0.8 IU) formó parte de la fase acuosa interna (1 mL de agua destilada), mientras que la fase oleosa constó del polímero resistente a los cambios de pH Eudragit E100 (Evonik 24938-16-7) disuelto en el solvente diclorometano (5 mL). La fase acuosa se agregó gota a gota a la fase oleosa. Una vez lista la primera emulsión, se agregó a la fase externa alcohol polivinílico (PVA) en distintas concentraciones, según la formulación utilizada, y así completar la emulsión doble. Finalmente, el solvente se evaporó en un rotavapor Heidolph Labrota 4003 a 140 rpm/28 ° C/ 28 min. Las microcapsulas fueron incorporadas a la dieta comercial por medio de un atomizador, inmediatamente se mezcló el alimento por 20 min en un recipiente y se cribó en malla (medidas 1.19 mm),

finalmente se dejó secar por 3 h en estufa a 35 ° C y se almacenó en refrigeración a - 14 °C.

### **6.1.3 Adición de T3 al alimento**

La T3 (3,3',5-Triiodo-L-thyronine, SIGMA No. Cat. 564605), utilizada como control positivo del efecto de la TSH, se incorporó al alimento por medio de atomización (0.1 mg de T3 en 100 g de alimento), posteriormente se mezcló en un recipiente por 20 min. De acuerdo con el requerimiento de las larvas se cribó en malla (1.19 mm) para obtener un tamaño apropiado de alimento, se agregó betaina (1 %) como attractante para los peces y se dejó secar por 3 h en estufa a 35° C, al finalizar se almacenó en refrigeración hasta el bioensayo (-14° C).

### **6.1.4 Adición de TSH libre en el alimento**

La tirotropina se incorporó al alimento por medio de atomización en una concentración de 0.8 IU en 100 g de alimento, posteriormente se mezcló en un recipiente por 20 min y se cribó en malla (1.19 mm) para obtener un tamaño apropiado de alimento, se agregó betaina (1 %) como attractante para los peces y se dejó secar por 3 h en estufa a 35° C, al finalizar se almacenó en refrigeración hasta el bioensayo (-14° C).

## **6.2 BIOENSAYOS DE ALIMENTACIÓN DE LARVAS DE PECES**

### **6.2.1 Pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*)**

Larvas de pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*) de 9 DDE, obtenidas de un desove único fueron alimentadas con 3 tratamientos, (dieta control, alimento suplementado con T3, alimento con microparticulas de TSH por emulsión múltiple). Para cada tratamiento se utilizaron 30 larvas por acuario con 3 repeticiones, manteniendo una temperatura de 21 °C. El alimento correspondiente fue administrado al 12% en base al peso larvario cada 4 horas. El cultivo tuvo una duración de 15 días. Se recolectaron 3 larvas por acuario cada tercer día (9, 12, 16, 21 DDE). El muestreo se realizó durante la mañana, antes de la primera alimentación, se fotografiaron para el análisis morfométrico y se congelaron a -70°C para la cuantificación de las hormonas tiroideas, análisis de ácidos nucleicos y actividad de las enzimas digestivas.

### **6.2.2 Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

En el bioensayo realizado se utilizaron larvas de tilapia (*Oreochromis niloticus*) de 6 DDE, obtenidas de distintos desoves, a las cuales se les administraron los tratamientos: dieta control sin hormona, dieta suministrada con T3, dieta suministrada con microparticulas blanco (sin TSH), dieta adicionada con TSH libre y dieta con TSH encapsulada por emulsión doble con evaporación de solvente. Para cada tratamiento se utilizaron 50 larvas por acuario con 3 repeticiones, manteniendo una temperatura de 26° C. El alimento correspondiente fue administrado al 12 % en base al peso larvario cada 4 horas. El cultivo tuvo una duración de 21 días. El muestreo se realizó durante la mañana, antes de la primera alimentación, recolectando 3 larvas por acuario cada tercer día (6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 DDE), las larvas se fotografiaron para el análisis morfométrico y se congelaron a -70°C para la cuantificación de las hormonas tiroideas, análisis de ácidos nucleicos y actividad de las enzimas digestivas.

## **6.3 Actividad de las enzimas digestivas**

### **6.3.1 Obtención del extracto enzimático**

La determinación de enzimas digestivas se llevó a cabo utilizando el sistema digestivo de las larvas (3 larvas por acuario) con el propósito de eliminar los inhibidores enzimáticos que pudieran estar presentes en la musculatura, así como otras enzimas relacionadas con el metabolismo de las proteínas musculares (Castillo, 2012). Las muestras se homogenizaron con un Potter-Wheaton en 700 uL de agua destilada en un baño de hielo, se tomó una alícuota de 200 uL y el resto del homogenizado se centrifugó a 16,000g durante 30 min a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417 R). El sobrenadante se almacenó en alícuotas de 200 µL a -20°C hasta ser analizadas.

### **6.3.2 Cuantificación de proteína soluble**

La cantidad de proteína soluble en las larvas se cuantificó de acuerdo al método de Bradford (1976). La curva estándar se preparó con albumina de suero bovino (0-1000 µg/ml). Se manejó el protocolo para microplacas de 96 pozos, realizando diluciones de las muestras hasta encontrar una concentración adecuada de lectura. En cada pozo se colocaron (10 uL) de muestra con 250 uL del reactivo (azul de Coomassie). Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 5 min y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas a 595 nm (Biotek ELx800).

### **6.3.3 Actividad proteolítica ácida total**

Para la medición de la actividad proteolítica ácida se utilizó una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989). A 10 uL de extracto enzimático se le añadieron 100 µL de hemoglobina al 2%, 500 uL de buffer de acetato y 500 uL de ácido tricloroacético frío al 5% (TCA), se incubaron los tubos de replicado por 30 min a 37° C. Al terminar la incubación se agregaron 500 uL de TCA frío a los tubos de replicado. Se mantienen en refrigeración por 15 min y se elimina la proteína precipitada por centrifugación a 14,000 rpm/4° C/5 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm contra un blanco en el que el extracto enzimático se inactivó por adición del ácido antes de iniciar la reacción. El

control usado fue pepsina comercial (SIGMA No. Cat. P-7012) en una concentración de reacción de 10 µg/ml como control

#### **6.3.4 Actividad tipo tripsina**

Para la medición de la actividad tipo tripsina se utilizó una modificación de la metodología de Rotllant *et al.* (2008). Se utilizó tripsina comercial (SIGMA No. Cat. T-0303) como control. En una microplaca de 96 pozos con pared oscura, se añadieron 10 µL de extracto enzimático y 100 uL de buffer Tris (50mM con CaCl<sub>2</sub>), se pre-incubo en el lector de placas por 5 min y al terminar se agregó rápidamente 100 uL de sustrato fluorescente (Boc-Gln-Ala-Arg-methyl coumarin hydrochloride, SIGMA B4153). Se leyó la fluorescencia a 380nm de excitación y 440 nm de emisión en un en un fluorometro (BioTek Synergy).

#### **6.3.1 Actividad tipo leucina-aminopeptidasa**

Para la medición de la actividad tipo leucina-aminopeptidasa se utilizó una modificación de la metodología de Appel (1974). Se utilizó aminopeptidasa comercial (SIGMA No. Cat. L5006) en una concentración de reacción de 10 µg/ml como control. El extracto obtenido no debe ser centrifugado debido a que puede perderse la enzima asociada al epitelio intestinal. En una microplaca de 96 pozos, se añadieron 10 µL de extracto enzimático y 90 µL de l-leucina-p-nitroanilida (SIGMA No. Cat. L-9125). Se tomó una lectura inicial de la absorbancia a 410 nm, se incubó la placa a 37°C durante 30 min, y al término de este tiempo se tomó una lectura final de la absorbancia a 410 nm, a la cual se le restó el valor de la lectura inicial (blanco).

## 6.4 Ácidos nucleicos

Para la cuantificación de los ácidos nucleicos se utilizó la técnica descrita por Kaplan *et al.*, (2001). Anteriormente se midió el peso seco del tejido de cada muestra (mg), para calcular la relación DNA:peso seco y RNA:peso seco. El pedúnculo caudal de las larvas (3 larvas/acuario) fue homogenizado con un homogenizador de tejidos Potter-Wheaton (Fisher Scientific No. Cat. 08-414-16A) en 0.5 ml de una solución con NaCl 0.1 M, se digirieron durante 2 horas a 55°C con 2.5 uL de Proteínasa K (BIOLINE No. Cat. 37084). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13,000 g por 10 min. En una microplaca de 96 pozos se colocó una alícuota de 10 uL del sobrenadante y 50 µL de una solución con PicoGreen (Invitrogen No. Cat. P7589). La fluorescencia de las muestras se cuantificó en un fluorómetro (BioTek Synergy) a 500nm de excitación y 535nm de emisión. Se realizó una curva estándar (0-500 ng, Lambda DNA Standard, Invitrogen PicoGreen dsDNA Assay Kit No. Cat. P7589) para calcular la concentración de dsDNA (ng)

Para evaluar la concentración de RNA total (ng) en las muestras, se colocaron 10 µL del sobrenadante en otra microplaca de 96 pozos con 50 µL de una solución con la enzima DNasa I libre de RNasa (2 unidades/pozo, FERMENTAS No. Cat. EN0521) disuelta en Tris 50 mM pH 7.5 y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Esta placa se incubó durante 30 min a 37°C y, posteriormente se añadieron 50 µL de una solución con RiboGreen (Invitrogen No. Cat. R11490). El RiboGreen es un fluoróforo que se une a los ácidos nucleicos en general, por lo que al degradar el DNA de las muestras con la enzima DNasa, la fluorescencia resultante corresponde al RNA.

Se colocó en un vial 40 uL de muestra, 2 uL de una solución con la enzima DNasa I libre de RNasa (2 unidades/pozo, FERMENTAS No. Cat. EN0521) y 4 uL de buffer (Tris 50 mM pH 7.5 y MgCl<sub>2</sub> 10 mM.), se incubó 30 min/37° C. Al terminar la incubación se agregó 10 uL de la muestra a la microplaca y 50 uL de una solución con RiboGreen (Invitrogen No. Cat. R11490). La concentración de RNA se cuantificó por medio de fluorimetría (Fluorómetro BioTek Synergy, 500nm de excitación y 535nm de emisión) y se realizó una curva estándar (0-500 ng) con RNA Ribosomal 16s de *E. coli*, Invitrogen RiboGreen RNA Assay Kit No. Cat. R11490). Al finalizar los análisis se calculó la relación

RNA:DNA (ng de RNA/ng de DNA), la razón RNA:peso seco (ng de RNA/mg de tejido utilizado) y la razón DNA:peso seco (ng de DNA/mg de tejido utilizado).

### **6.5 Cuantificación de hormonas tiroideas**

Se realizó la extracción de las hormonas de las larvas en un homogenizador de tejidos Potter-Wheaton, esta extracción se basó en la técnica de Kobuke *et al.*, (1987). Las muestras fueron homogenizadas en 1 ml de etanol con 6N-Propyl-2Thiouracil 1 mM (SIGMA No. Cat. P3755). Se centrifugaron a 1,7000g por 10 min a 4° C (Eppendorf Centrifuge 5804 R), el sobrenadante fue secado en estufa a 37° C durante toda la noche, Finalmente se reconstituyó en 50 uL de etanol y 450 uL de buffer barbital 0.11 M con un pH de 8.6 (SIGMA No. Cat. B6632).

Las muestras se mantuvieron en refrigeración y fueron analizadas en el Laboratorio de Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León para cuantificar la concentración de las hormonas T3 y T4 por medio de un inmunoensayo por electroquemitiluminiscencia.

## 6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar el efecto de las hormonas en las larvas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional de acuerdo a cada muestreo durante el bioensayo, además de la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan y Tukey a un nivel de significancia de P menor a 0.05 apoyado en el Software “*Statistics 17.0*”.

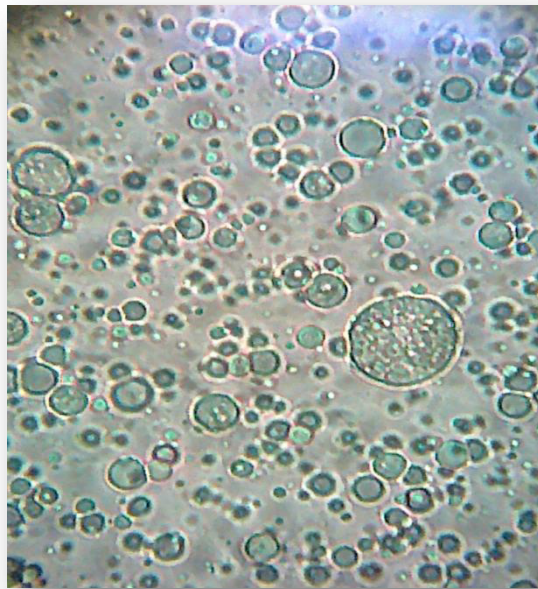


## 7. RESULTADOS

### 7.1 Microencapsulación de la tirotropina

- Emulsión doble

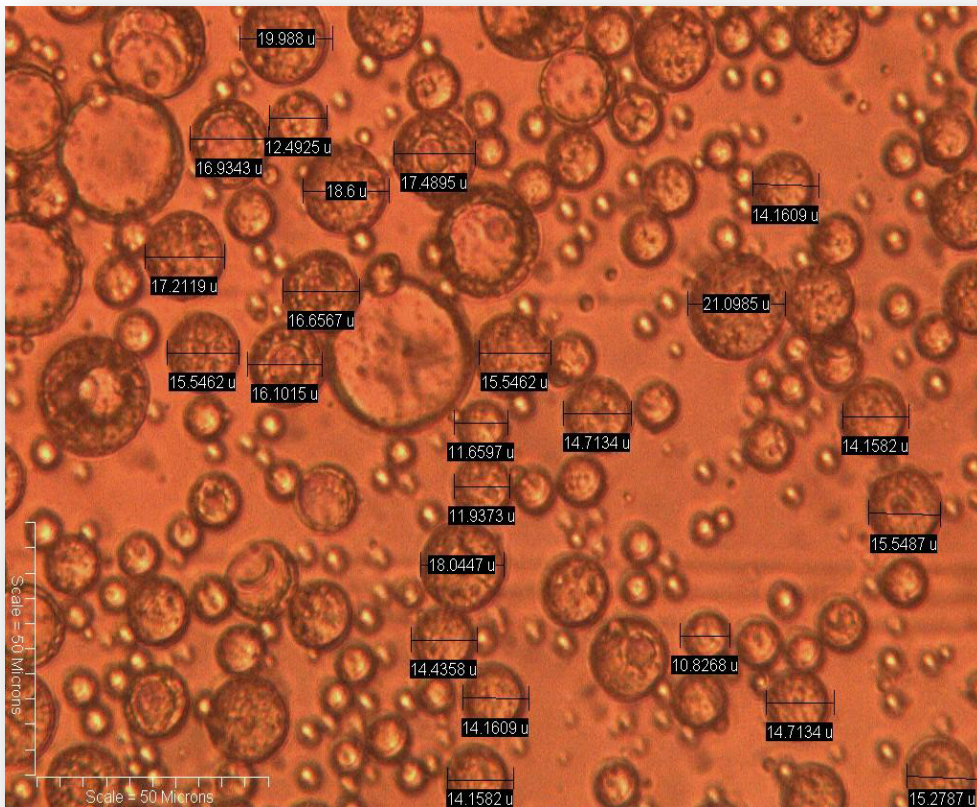
La distribución de las gotas de la emulsión múltiple se mantuvo estable durante el tiempo de almacenamiento, con un tamaño de partícula entre 5-10  $\mu\text{m}$  (Figura 1). Lo anterior permitió la incorporación de las microcapsulas a la dieta por medio de una propela de agitación hasta obtener una dieta homogénea.



**Figura 1.** Emulsión múltiple W1/O/W2. Objetivo: 100x

- **Emulsión doble con evaporación de solvente**

El mejor tamaño de partícula de la emulsión con evaporación de solvente fue de 14.16 a 21.09  $\mu\text{m}$ , lo que permitió un mayor grado de encapsulación de la hormona (Figura 2). Esto se logró modificando una serie de variables en la formulación de la emulsión, como el porcentaje de fase externa, volumen de fase orgánica e inorgánica y velocidad (rpm) de agitación (Tabla V). Este tipo de microcapsulas fueron incorporadas a la dieta comercial por medio de un atomizador, obteniendo una dieta homogénea cribada en malla de 1.19 mm.



**Figura 2.** Emulsión múltiple W1/O/W2. Objetivo: 100x

Tabla V. Formulación de la emulsión

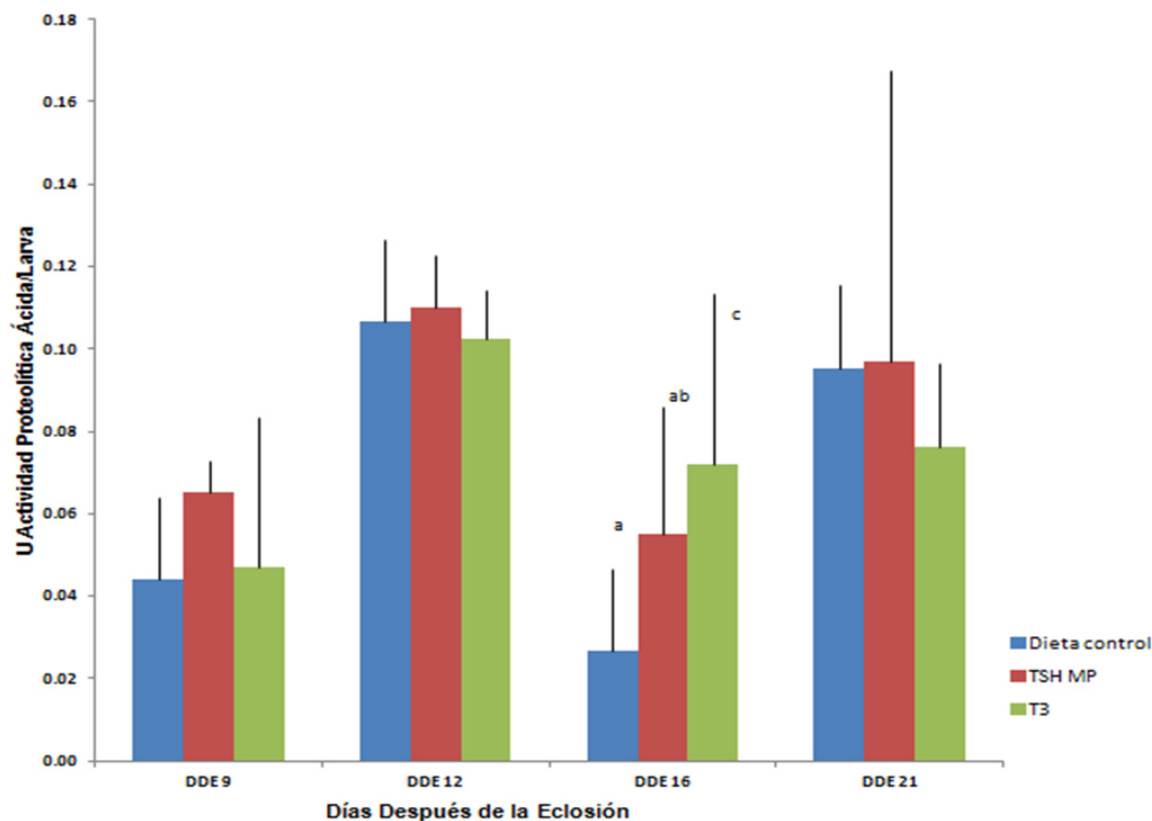
Lotes	Fase externa	Fase orgánica	Fase interna	Fase orgánica + fase interna (rpm)	Fase externa (rpm)	Tamaño de partícula (µm)
Lote 1	20 mL (PVA 5%)	250 mg E100 en 5 mL de diclorometano	30 uL agua	1900 rpm / 20 min	1900 rpm / 20 min	3.05 - 5.27
Lote 2	20 mL (PVA 4%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	1900 rpm / 20 min	1900 rpm / 20 min	3.64 - 6.94
Lote 3	20 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	1900 rpm / 20 min	1900 rpm / 20 min	5.52 - 7.73
Lote 4	20 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	1600 rpm / 20 min	1600 rpm / 20 min	5.27 - 7.21
Lote 5	20 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	$\frac{1000 \text{ rpm}/10 \text{ min}}{1250 \text{ rpm}/ 5 \text{ min}} \frac{1500 \text{ rpm}/ 5 \text{ min}}$	1600 rpm / 20 min	6.94 - 8.88
Lote 6	20 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	$\frac{1000 \text{ rpm}/10 \text{ min}}{1250 \text{ rpm}/ 5 \text{ min}}$	1600 rpm / 20 min	6.38 - 8.05
Lote 7	20 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	$\frac{1000 \text{ rpm}/10 \text{ min}}{1250 \text{ rpm}/ 5 \text{ min}}$	1600 rpm / 20 min	7.21 - 8.83
Lote 8	20 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	$\frac{500 \text{ rpm}/ 10 \text{ min}}{1000 \text{ rpm}/10 \text{ min}}$	1600 rpm / 20 min	5.55 - 10.82
Lote 9	20 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	1900 rpm / 20 min	$\frac{1000 \text{ rpm}/10 \text{ min}}{1250 \text{ rpm}/ 5 \text{ min}} \frac{1500 \text{ rpm}/ 5 \text{ min}}$	7.77 - 11.93
Lote 10	20 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	1900 rpm / 20 min	$\frac{1000 \text{ rpm}/10 \text{ min}}{1500 \text{ rpm}/ 10 \text{ min}}$	6.38 - 8.05
Lote 11	20 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	1900 rpm / 20 min	$\frac{1000 \text{ rpm}/5 \text{ min}}{1500 \text{ rpm}/ 15 \text{ min}}$	7.79 - 8.32
Lote 12	20 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	1900 rpm / 20 min	$\frac{1000 \text{ rpm}/5 \text{ min}}{1500 \text{ rpm}/ 15 \text{ min}}$	5.55 - 7.21
Lote 13	10 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	1900 rpm / 20 min	$\frac{1000 \text{ rpm}/5 \text{ min}}{1500 \text{ rpm}/ 15 \text{ min}}$	5.59 - 8.36
Lote 14	10 mL (PVA 3%)	300 mg E100 en 5 mL de diclorometano	500 uL agua	1900 rpm / 20 min	1000 rpm/20 min	14.16 a 21.09

## 7.2 BIOENSAYOS DE ALIMENTACIÓN DE LARVAS DE PECES

### 7.2.1 Actividad de las enzimas digestivas

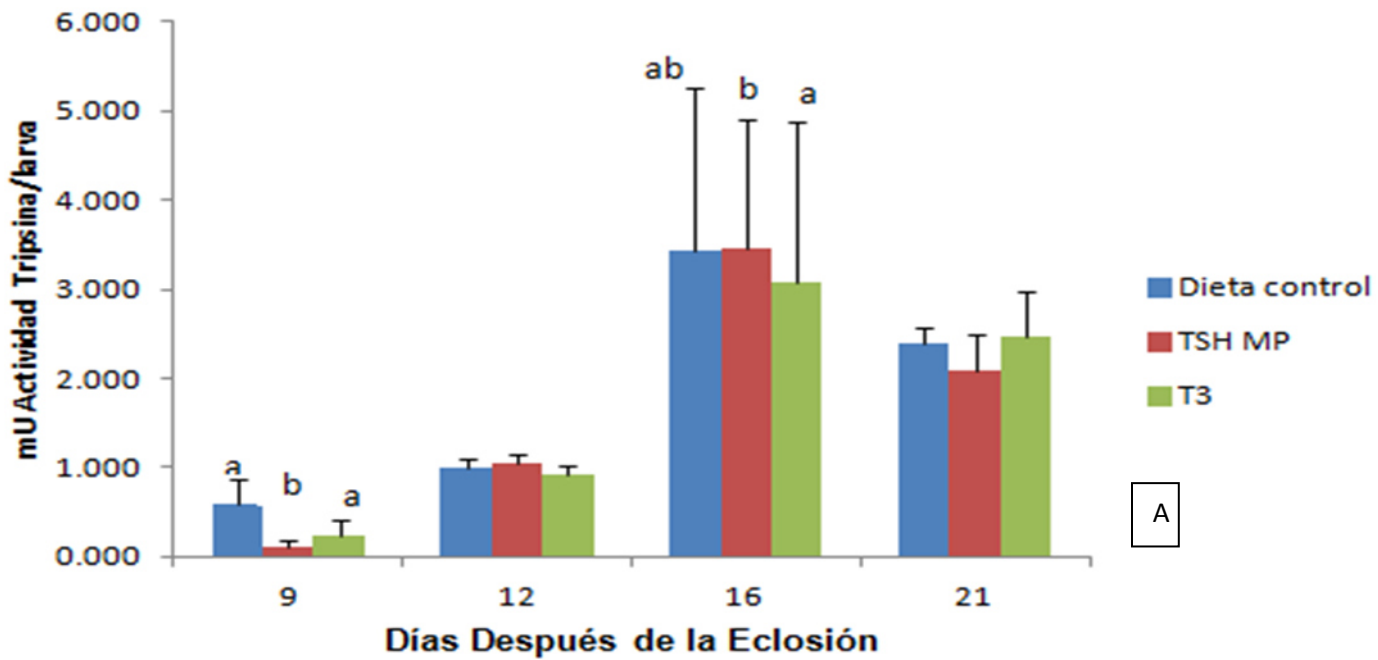
- **Pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*)**

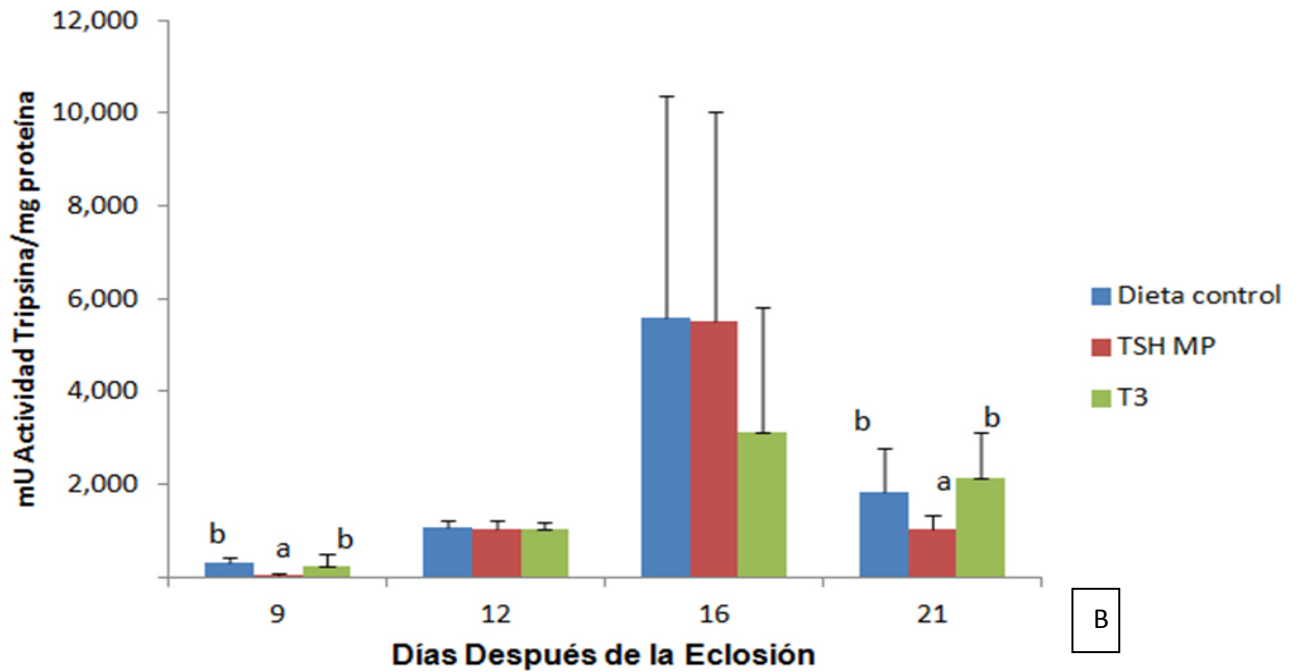
La actividad proteolítica ácida total se detectó a partir de los 9 DDE, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos, a excepción del 16 DDE ( $F=4.76$ ;  $p=0.018$ ;  $gl=26$ ). En este momento el tratamiento con T3 presento la mayor actividad proteolitica ácida y la dieta control la menor actividad. Mientras que el tratamiento con TSH MP presento valores intermedios, pero sin difrencias significativas con respecto a los otros (Figura 3). Vale la pena notar los mayores valores para el tratamiento con TSH hacia el final del experimento.



**Figura 3.** Actividad proteolítica ( $X \pm SD$ ) ácida total durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). Duncan  $< 0.05$ .

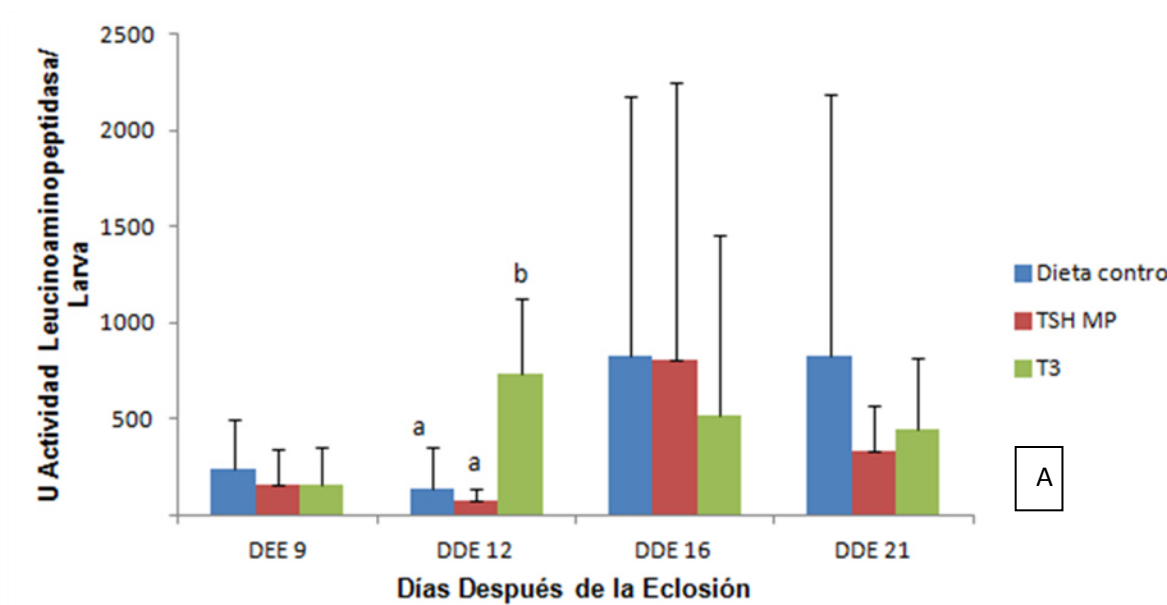
Se observaron diferencias significativas en cuanto a la actividad total tipo tripsina (U/larva) en el 9 (F=15.70; p=0.00; gl=26) y 16 DDE (F=2.71; p=0.087; gl=26), mientras que la actividad específica (U/mgP) presentó diferencias en los días 9 (F=6.57; p=0.00; gl=26) y 21DDE (F=4.57; p=0.021; gl=26).

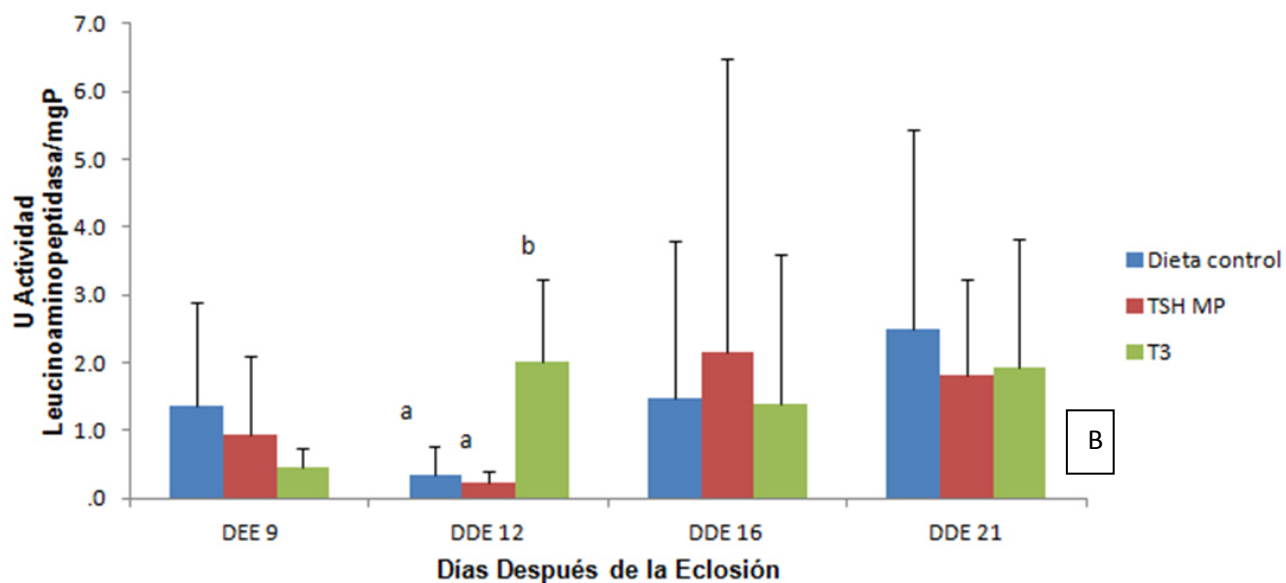




**Figura 4.** Actividad tipo tripsina ( $X \pm SD$ ) (A: actividad total U/larva; B: actividad específica U/mgP) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3) (Duncan < 0.05).

Por último, la actividad tipo leucina-aminopeptidasa se incrementó gradualmente durante el crecimiento de las larvas (Figura 5). Se detectó a partir del 9 DDE, y solo se detectaron diferencias significativas en el 12 DDE tanto para la actividad total (F=16.74; p=0.00; gl=26), como la actividad específica (F=15.81; p=0.00; gl=26).



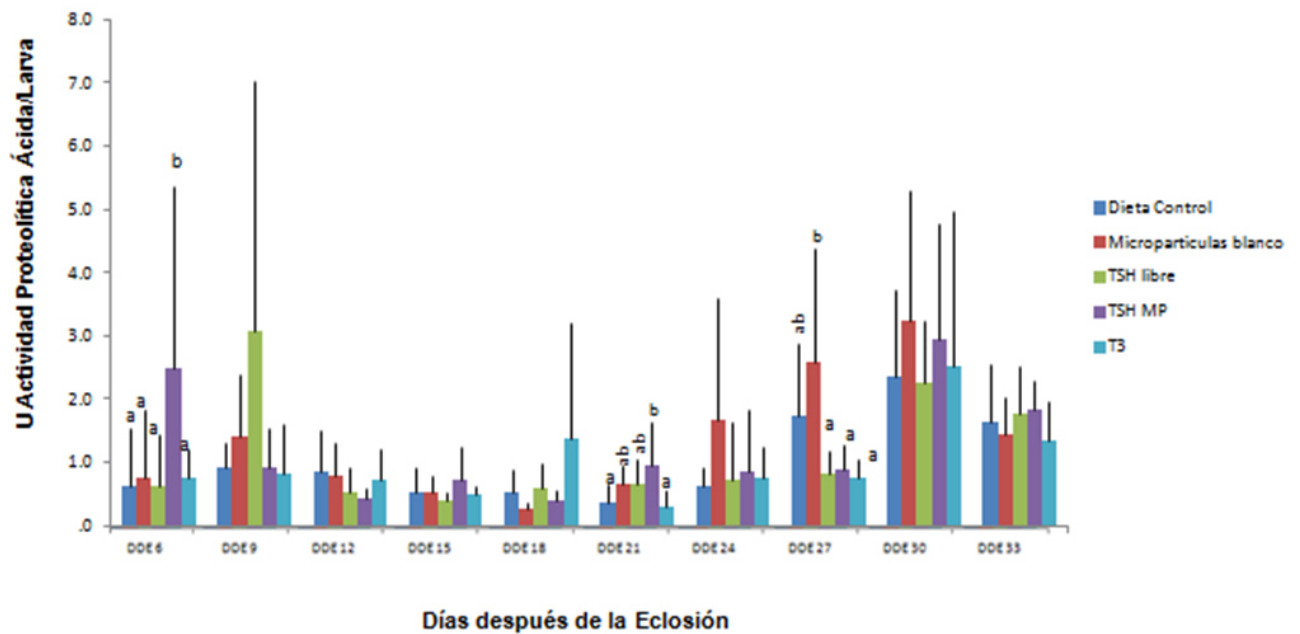


**Figura 5.** Actividad tipo leucina-aminopeptidasa ( $X \pm SD$ ) (A: actividad total U/larva; B: actividad específica U/mgP) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la hormona TSH microencapsulada en comparación con el tratamiento control y el control positivo (T3). (Duncan < 0.05).



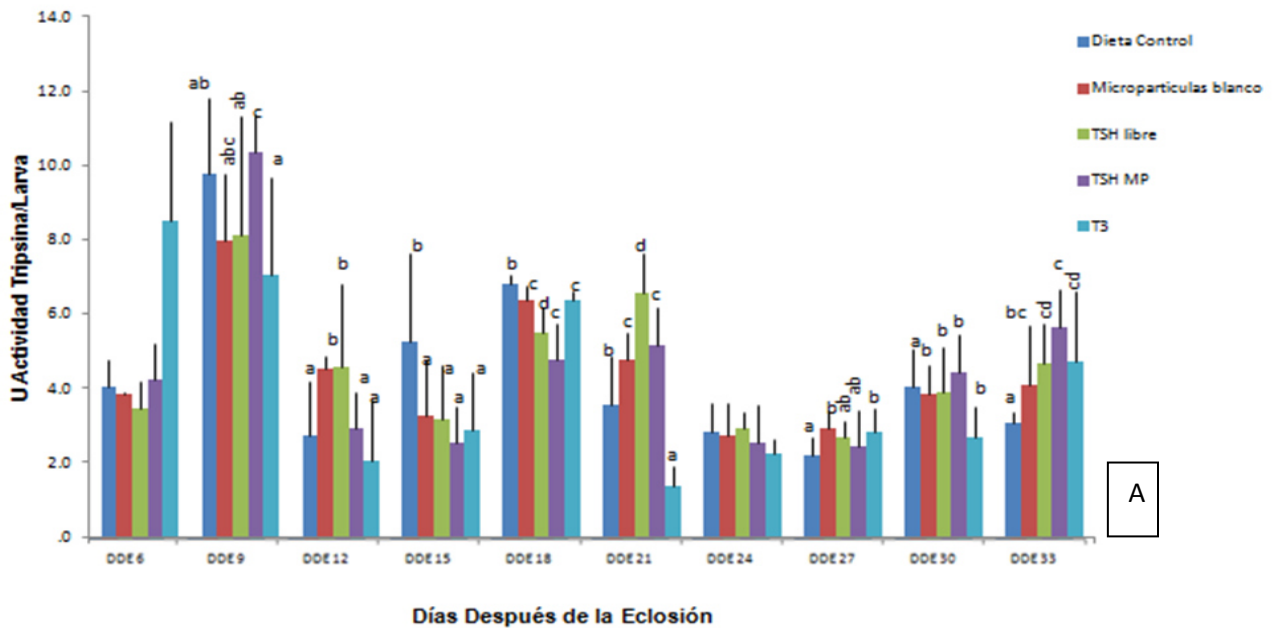
- **Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

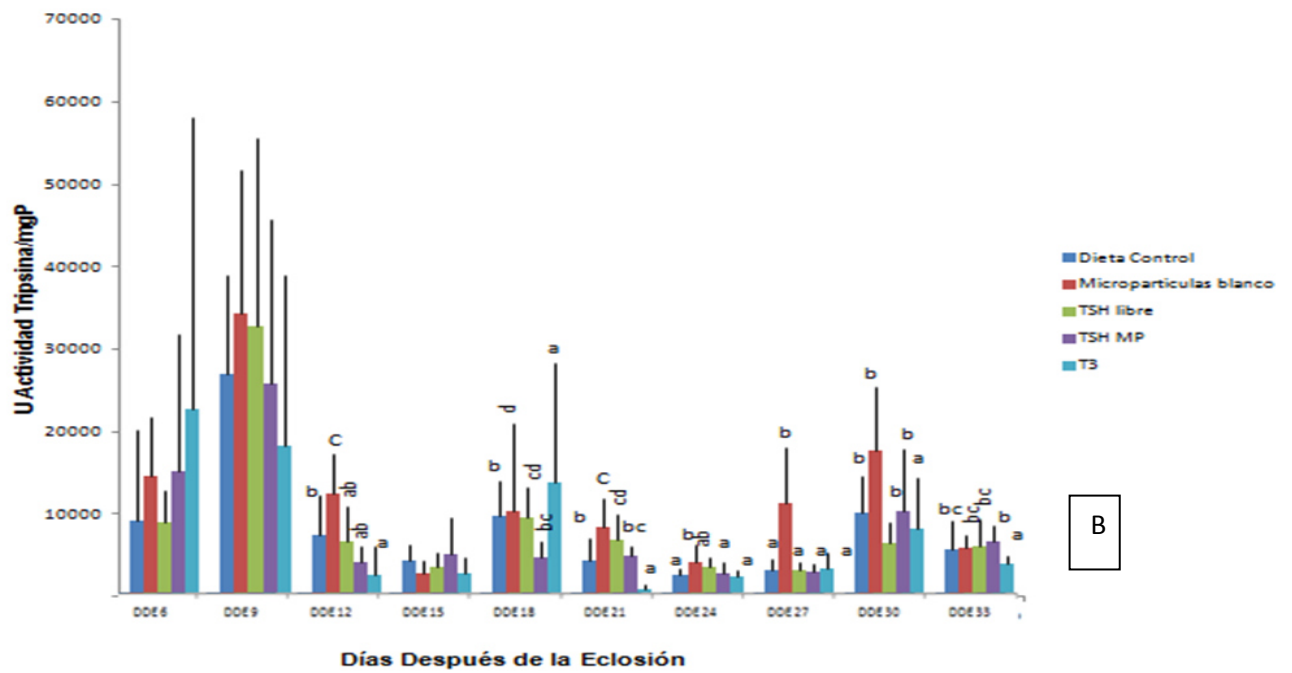
La actividad proteolítica ácida se detectó desde el 6 DDE (Figura 6), siendo el tratamiento de tirotrópina microencapsulada el que destacó con mayor actividad ( $F=2.57$ ;  $p=0.05$ ;  $gl=44$ ). En el 17 DDE ( $F=3.29$ ;  $p=0.02$ ;  $gl=44$ ) la tirotrópina microencapsulada mostró mayor actividad, mientras que a los 23 DDE ( $F=5.91$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=44$ ) se observó una mayor actividad en el tratamiento de micropartículas blanco. Finalmente, en los días posteriores no se presentaron diferencias significativas.



**Figura 6.** Actividad proteolítica ácida total ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos: dieta control, micropartículas blanco, tirotrópina libre, tirotrópina microencapsulada y triyodotironina. (Duncan < 0.05).

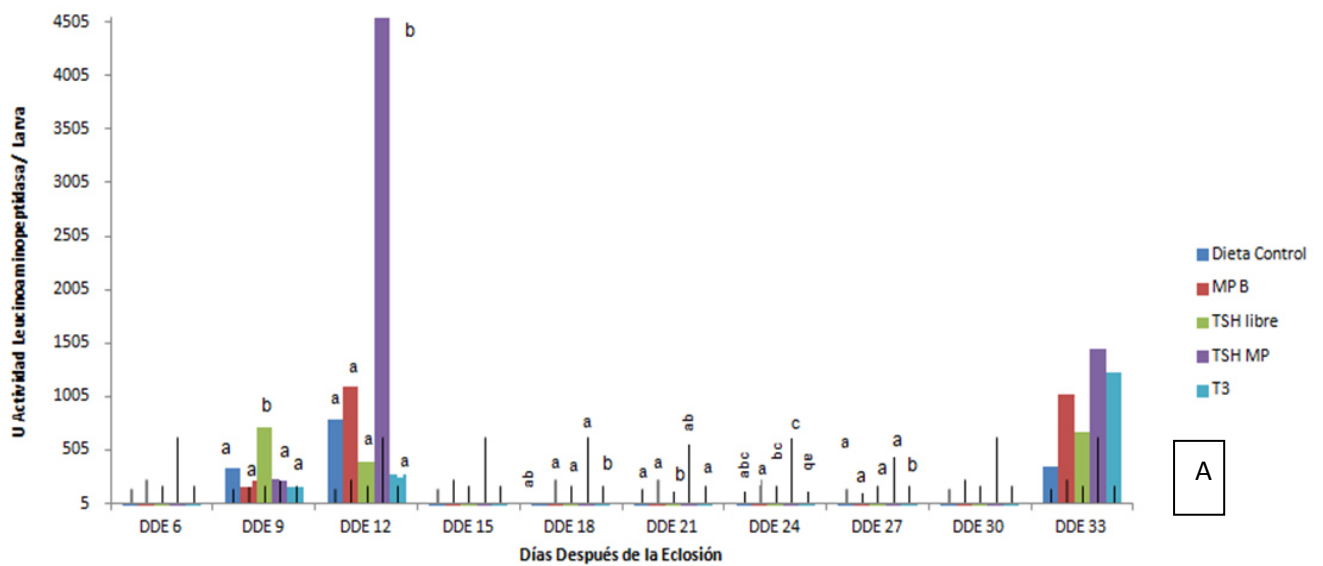
Se observaron diferencias significativas en la actividad tipo tripsina total en los días 9 (F=3.40 ; p=0.01 ; gl=44), 12 (F=4.86 ; p=0.00 ; gl=44), 15 (F=3.76 ; p=0.01 ; gl=44), 18 (F=30.08 ; p=0.00 ; gl=44), 21 (F=30.08 ; p=0.00 ; gl=44), 27 (F=2.70 ; p=0.04 ; gl=44), 30 (F=4.89 ; p=0.00 ; gl=44) y 33 DDE (F=5.63 ; p=0.00 ; gl=44). Mientras que en la actividad tipo tripsina específica se presentaron diferencias significativas en los días 12 (F=7.11 ; p=0.00 ; gl=44), 18 (F=11.72 ; p=0.00 ; gl=44), 21 (F=11.72 ; p=0.00 ; gl=44), 24 (F=3.08 ; p=0.02 ; gl=44), 27 (F=11.81 ; p=0.00 ; gl=44) 30 y 33 (F=4.39 ; p=0.00 ; gl=44). En ninguno de los dos casos se logró observar una tendencia uniforme entre los días de muestreo y las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

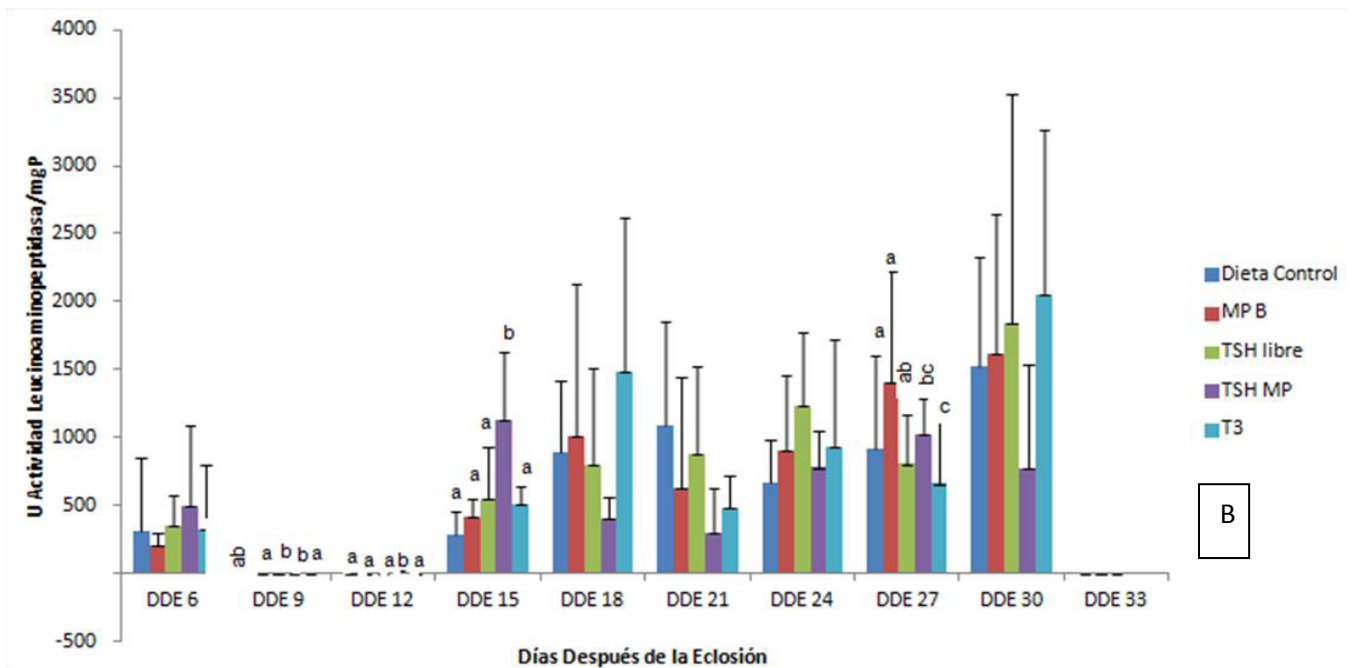




**Figura 7.** Actividad tipo tripsina ( $X \pm SD$ ) (A: actividad total U/larva; B: actividad específica U/mgP) durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos de dieta control, microparticulas blanco, tirotrpina libre, tirotrpina microencapsulada y triyodotironina. (Duncan < 0.05).

En la Figura 8 se muestra la actividad leucino-aminopeptidasa total, la cual se mantuvo con valores muy bajos en la mayoría de los DDE, excepto en el 9 DDE ( $F=2.91$ ;  $p=0.03$ ;  $gl=44$ ), en el 12 ( $F=3.35$ ;  $p=0.01$ ;  $gl=44$ ), 18 ( $F=3.64$ ;  $p=0.01$ ;  $gl=44$ ) DDE, 21 ( $F=3.59$ ;  $p=0.01$ ;  $gl=44$ ), 24( $F=4.16$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=44$ ) y 27( $F=4.71$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=40$ ). Mientras que en la actividad específica las diferencias se presentaron los días 9 DDE ( $F=3.26$ ;  $p=0.02$ ;  $gl=44$ ), 12 ( $F=3.72$ ;  $p=0.01$ ;  $gl=44$ ), 15 ( $F=10.62$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=44$ ) y 30( $F=5.90$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=40$ ).



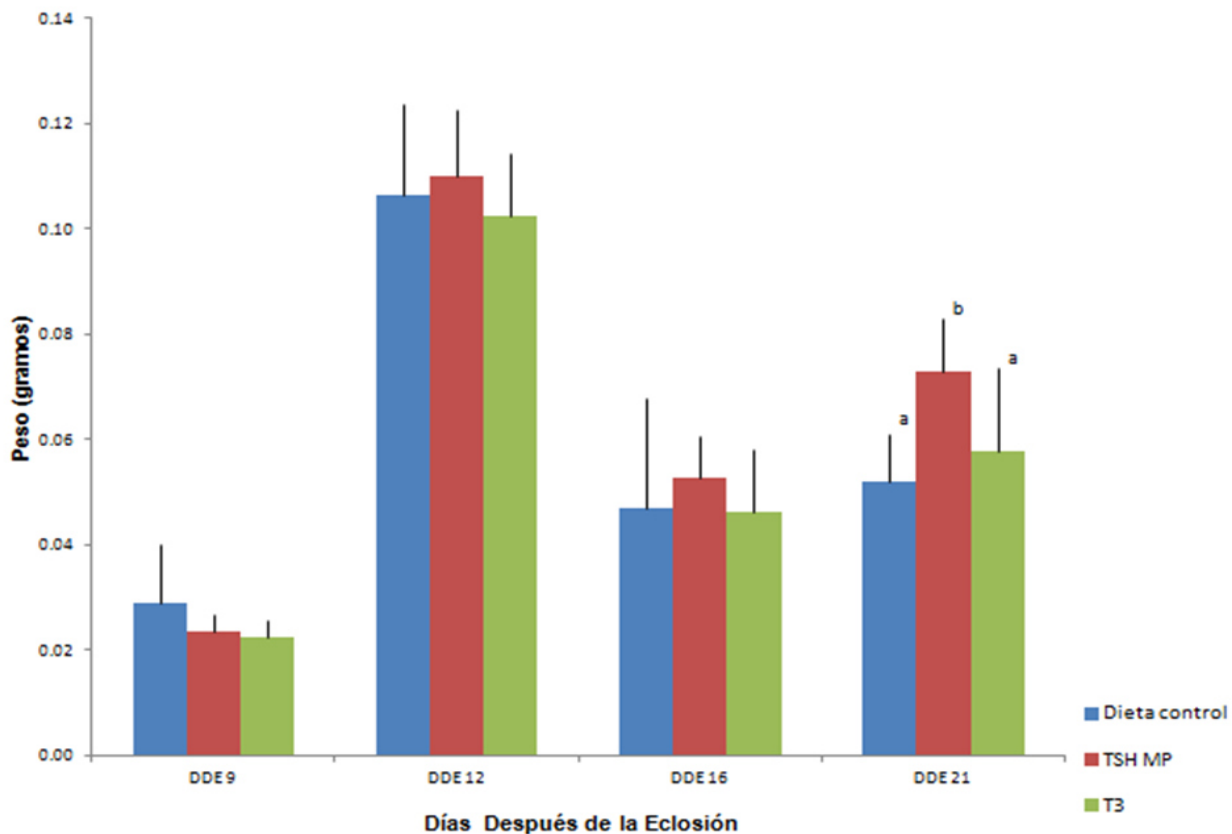


**Figura 8.** Actividad tipo leucina-aminopeptidasa (A: actividad total U/larva; B: actividad específica U/mgP) durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos de dieta control, microparticulas blanco, tirotrópina libre, tirotrópina microencapsulada y triyodotironina.

## 7.2.2 Condición morfológica y supervivencia

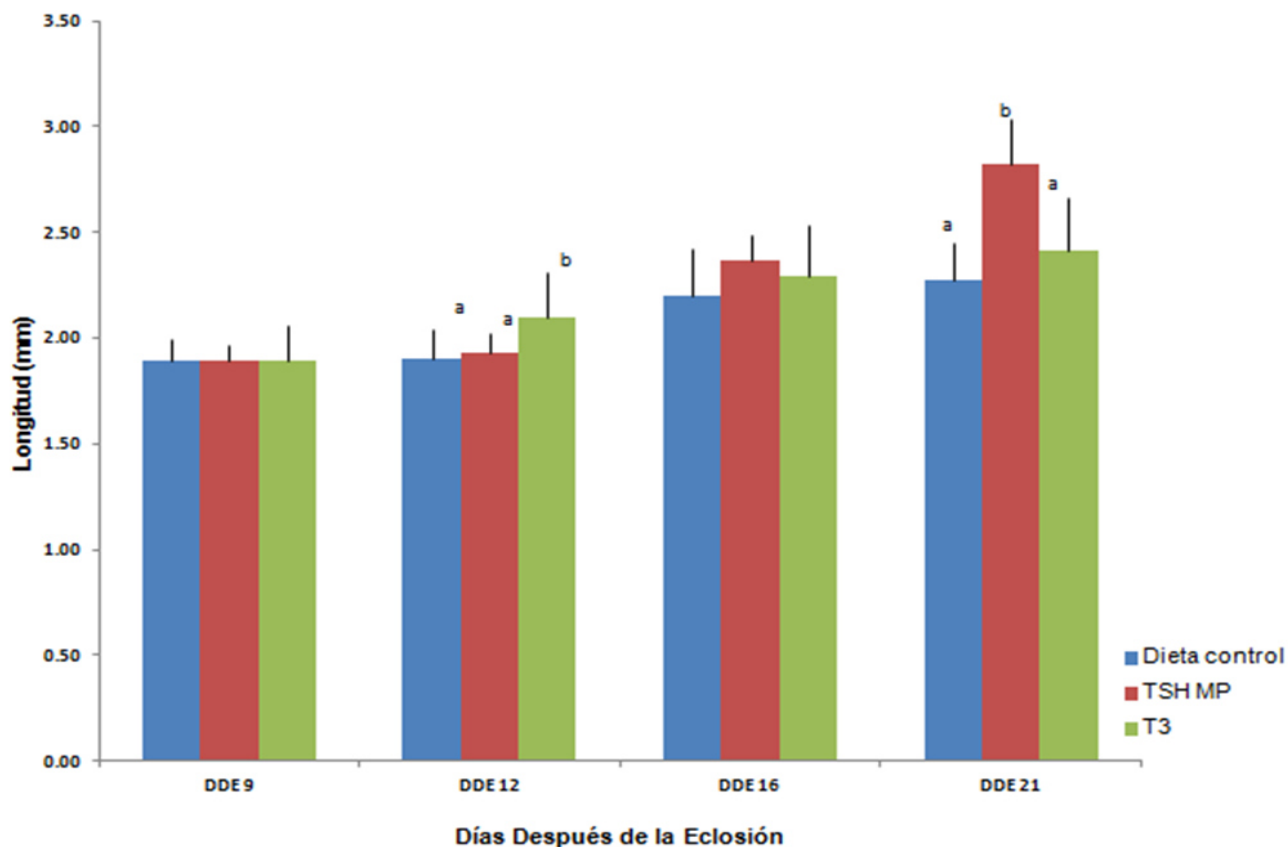
- **Pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*)**

No se observaron diferencias significativas con respecto al peso en el transcurso del desarrollo larval, sino hasta el 21 DDE ( $F=7.07$ ;  $p=0.004$ ;  $gl=26$ ) cuando se registró un mayor peso para las larvas bajo el tratamiento con tirotropina microencapsulada (Figura 9).



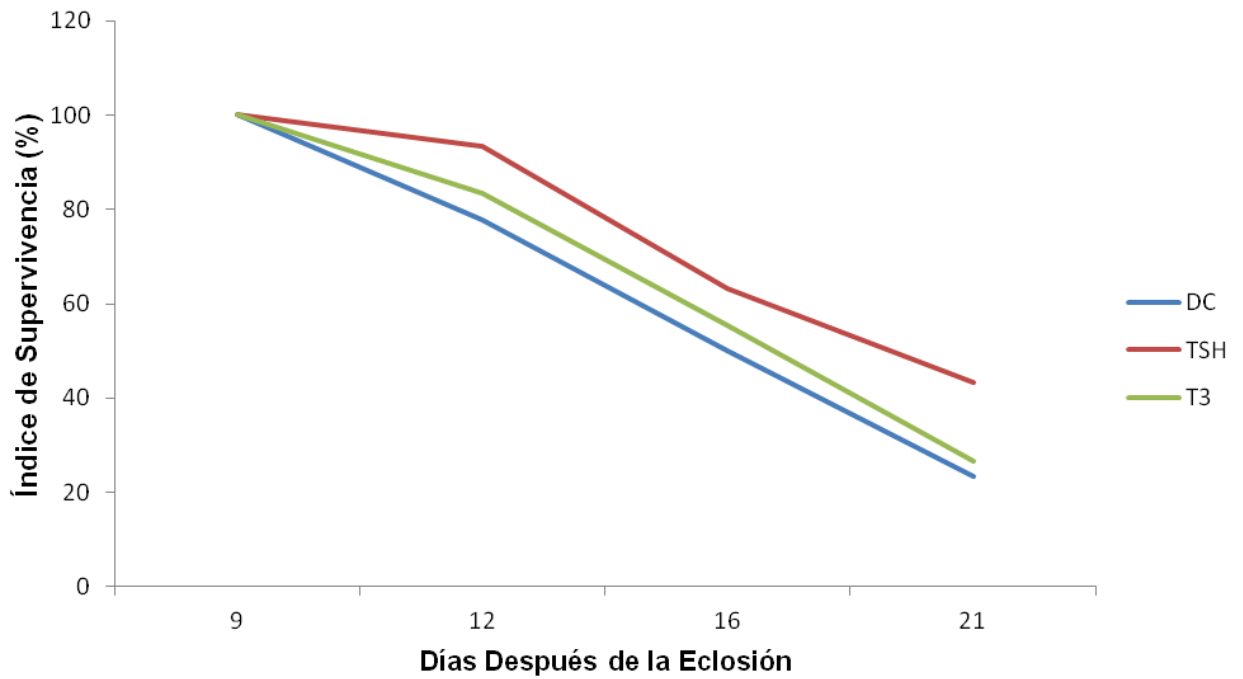
**Figura 9.** Peso (g) promedio ( $X \pm SD$ ) de larvas de pejelagarto pinto expuestas a TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). Literales iguales sobre las barras representan grupos homogéneos (Duncan  $< 0.05$ ).

La longitud total se fue incrementando a lo largo del bioensayo para los organismos de todos los tratamientos y solo se observaron diferencias significativas al 12 DDE (F=4.27; p=0.026; gl=26 ) y 21 DDE (F=15.53 ; p=0.00 ;gl=26 ). Registrandose un mayor peso para los organismos de los tratamientos T3 y TSH microencapsulada, respectivamente (Figura 10).



**Figura 10.** Longitud Total (mm) ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). (Duncan < 0.05).

En la Figura 11 se puede apreciar que el índice de supervivencia fue mayor para el tratamiento de tirotropina microencapsulada. Sin embargo, este valor no fue significativamente diferente del resto ( $F=0.81$ ;  $p=0.48$ ;  $gl=8$ ).

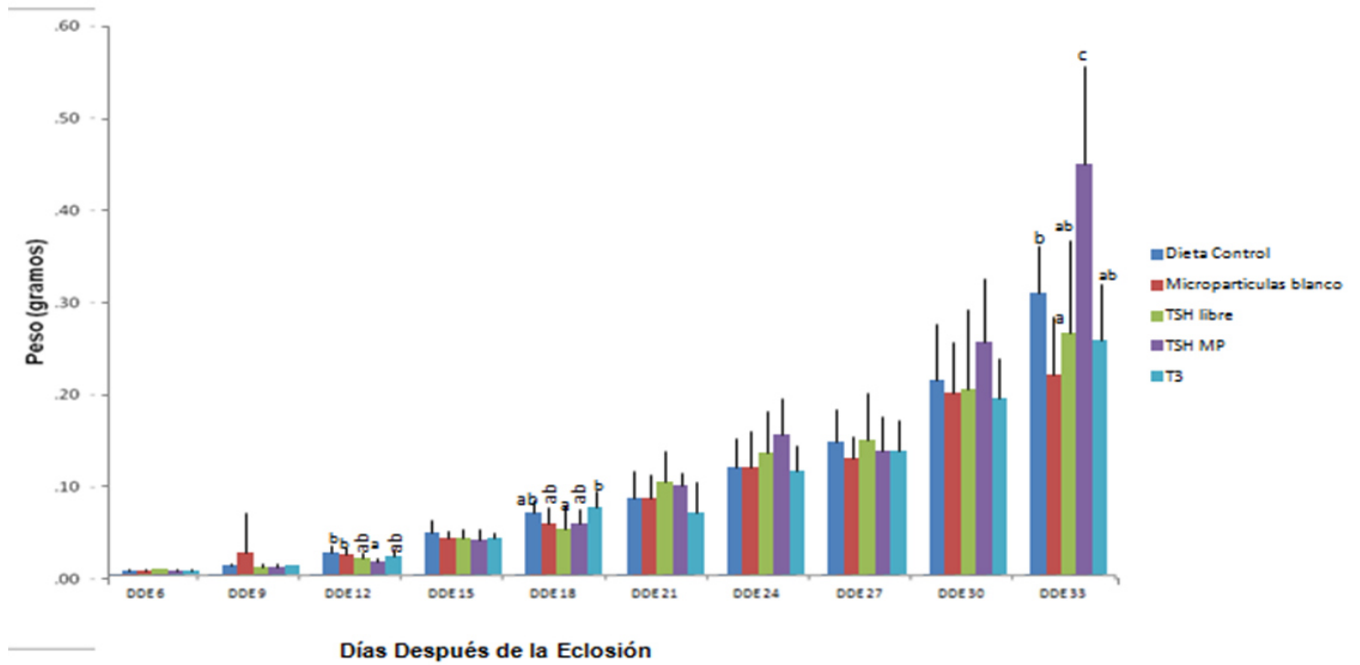


**Figura 11.** Índice de supervivencia durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). (Duncan < 0.05).



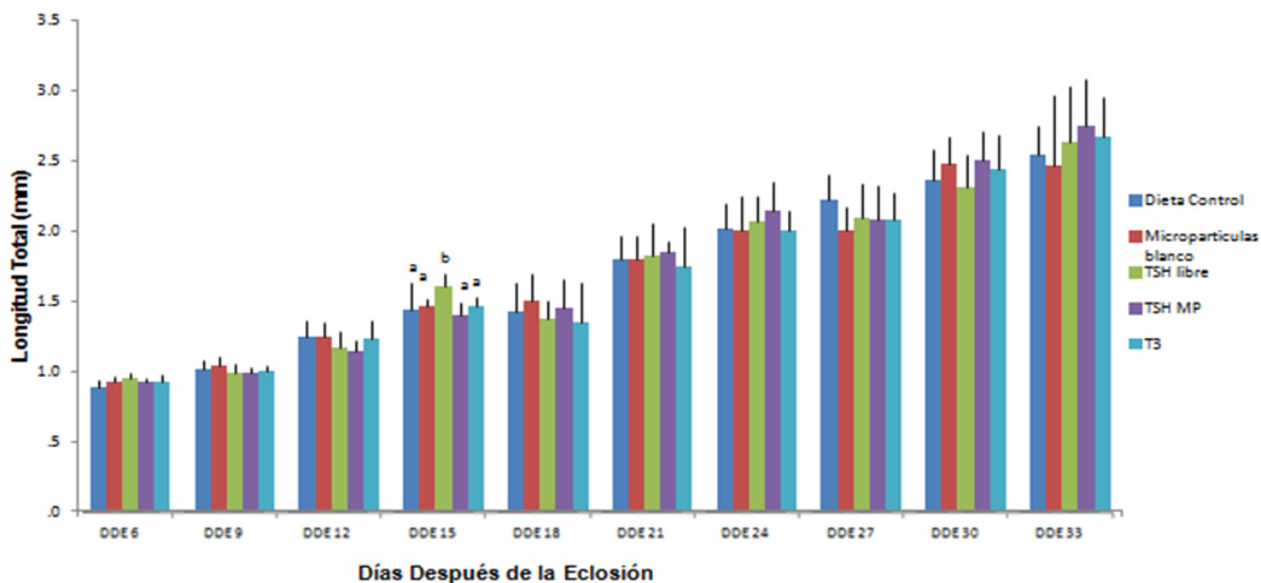
- **Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

Se observaron diferencias significativas con respecto al peso en los días 12 (F=3.14; p=0.024; gl=44), 18 (F=2.41; p=0.065; gl=44) y 33 (F=11.09; p=0.00; gl=44).



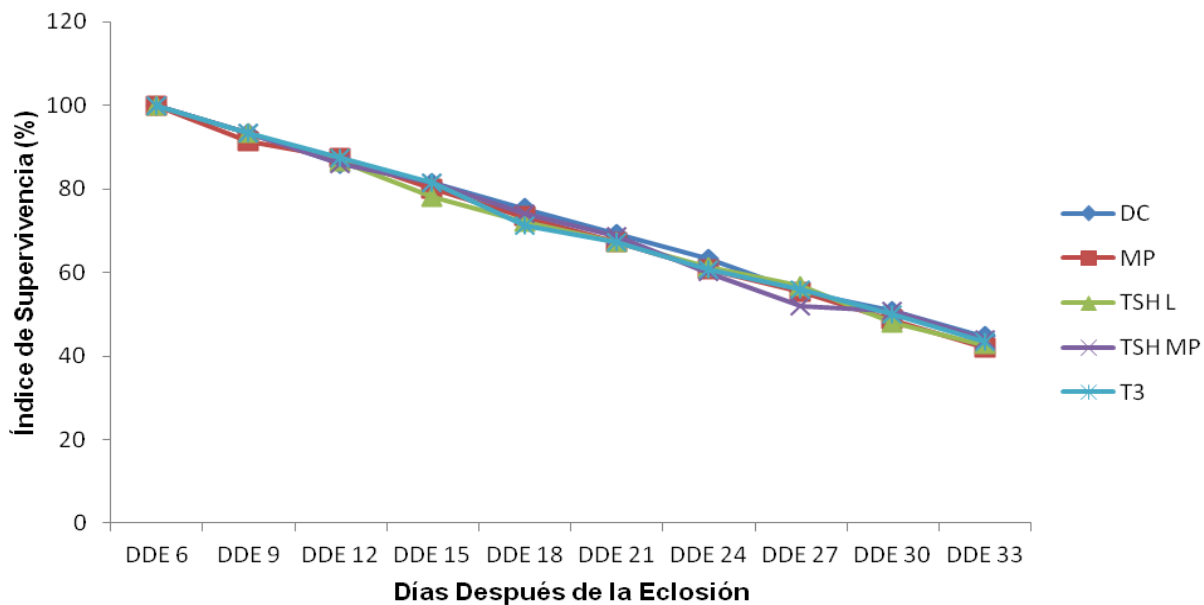
**Figura 12.** Peso (g) ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de de tilapia expuestas a los tratamientos: dieta control, microparticulas blanco, tirotrópina libre, tirotrópina microencapsulada y triyodotironina. (Duncan < 0.05).

La longitud total se incrementó gradualmente a lo largo del bioensayo para los organismos de todos los tratamientos y no se observaron diferencias significativas, excepto a los 15 DDE ( $F=4.15$ ;  $p=0.007$ ;  $gl=44$ ) cuando los organismos expuestos al tratamiento con TSH libre presentaron mayor longitud total que los del resto de los tratamientos (Figura 13).



**Figura 13.** Longitud Total (mm) ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos: dieta control, micropartículas blanco, tirotrópina libre, tirotrópina microencapsulada y triiodotironina. (Duncan  $< 0.05$ ).

El índice de supervivencia no presentó diferencias significativas en ningún tratamiento.

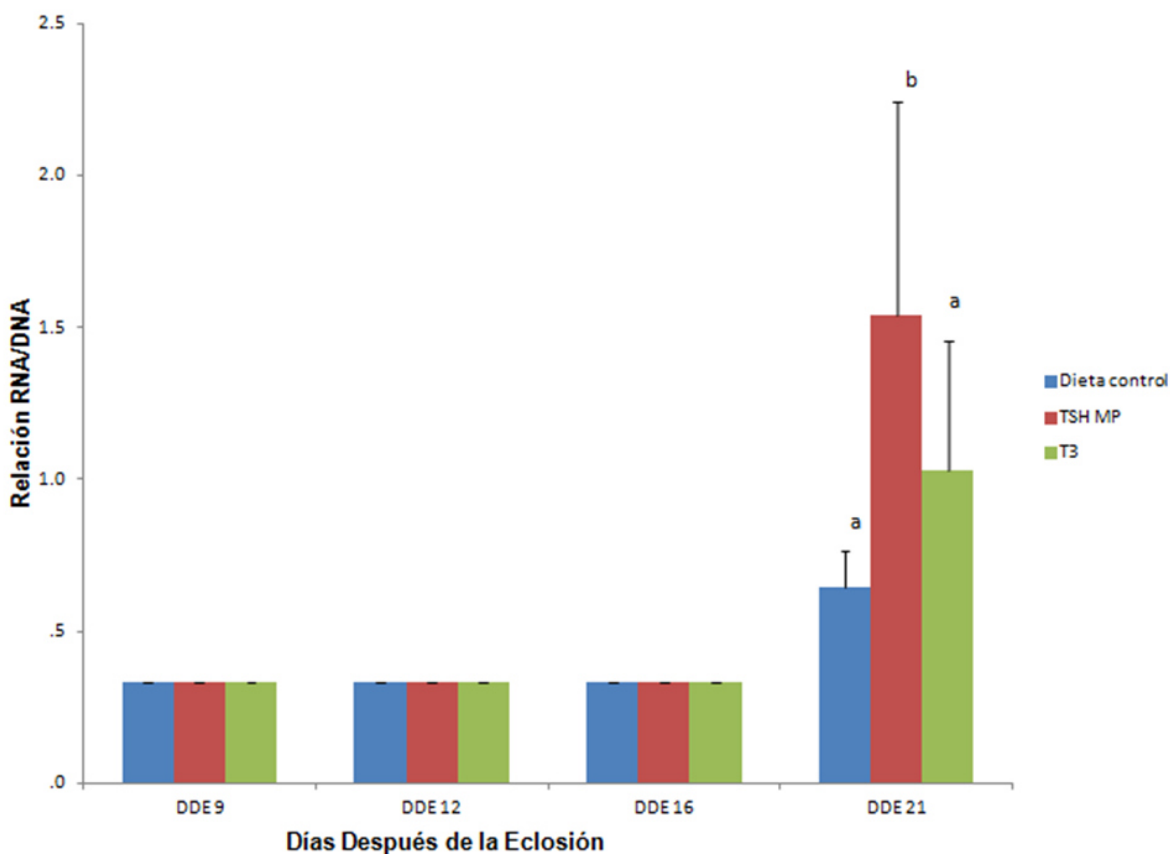


**Figura 14.** Índice de supervivencia durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos: dieta control, micropartículas blanco, tirotrina libre, tirotrina microencapsulada y triiodotironina. (Duncan < 0.05).

### 7.2.3 Análisis de ácidos nucleicos

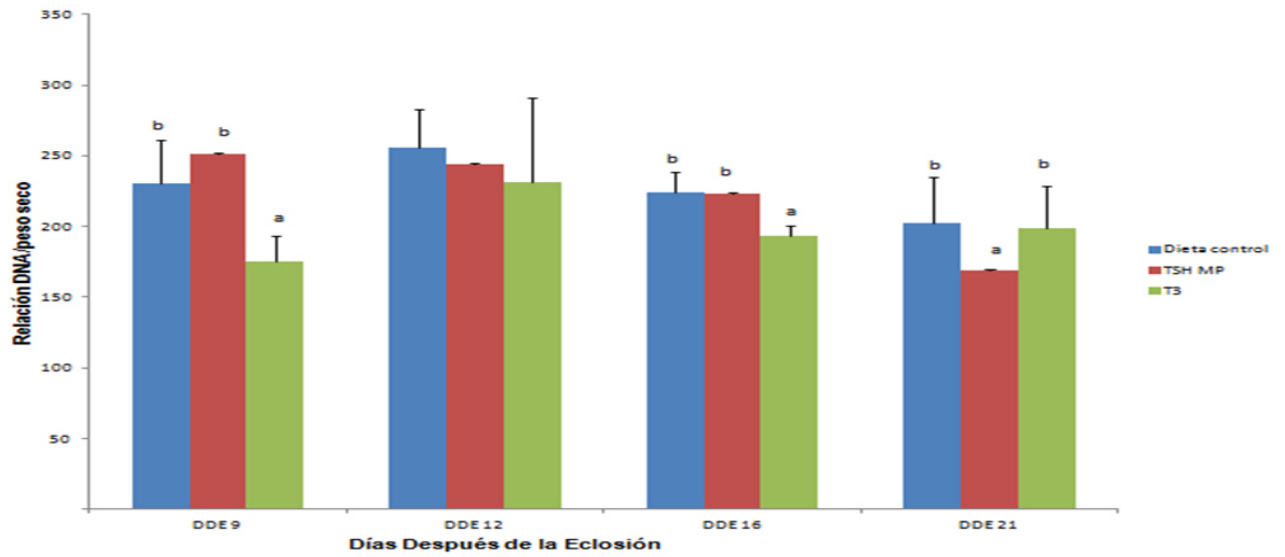
- Pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*)

Se observaron diferencias significativas en la relación RNA:DNA en el día 21 (F=7.77 ; p=0.00 ; gl=26) DDE, siendo mayores los valores para el tratamiento de tirotrópina microencapsulada en este último día de muestreo.



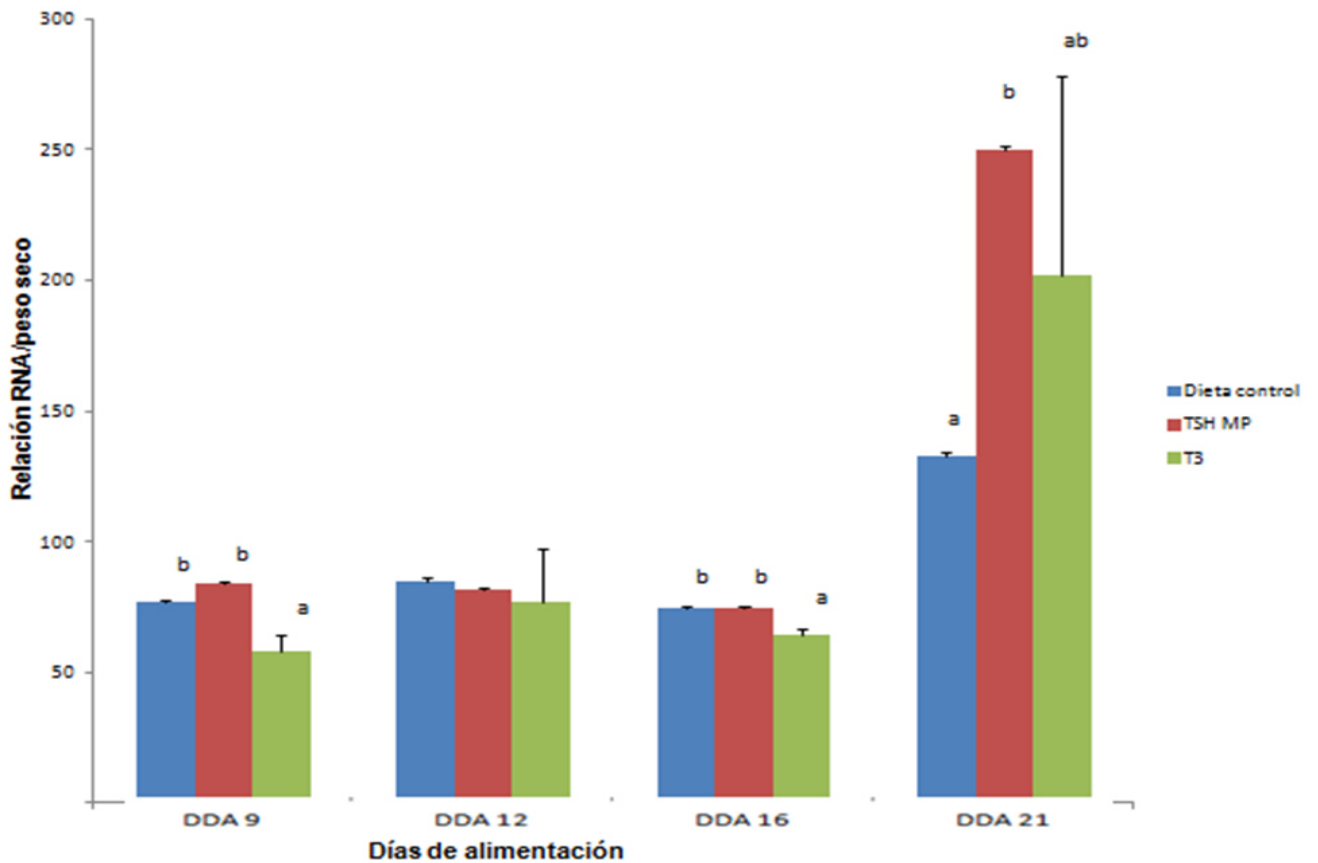
**Figura 15.** Relación RNA:DNA ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de las larvas de pejelagarto pinto expuestas a la hormona TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). (Duncan < 0.05).

Se observaron diferencias significativas con respecto a la relación DNA/peso seco en los días 9 ( $F=20.82$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=26$ ), 16 ( $F=9.70$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=26$ ) y 21 ( $F=3.43$ ;  $p=0.04$ ;  $gl=26$ ) DDE.



**Figura 16.** Relación DNA/peso seco ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3). (Duncan < 0.05).

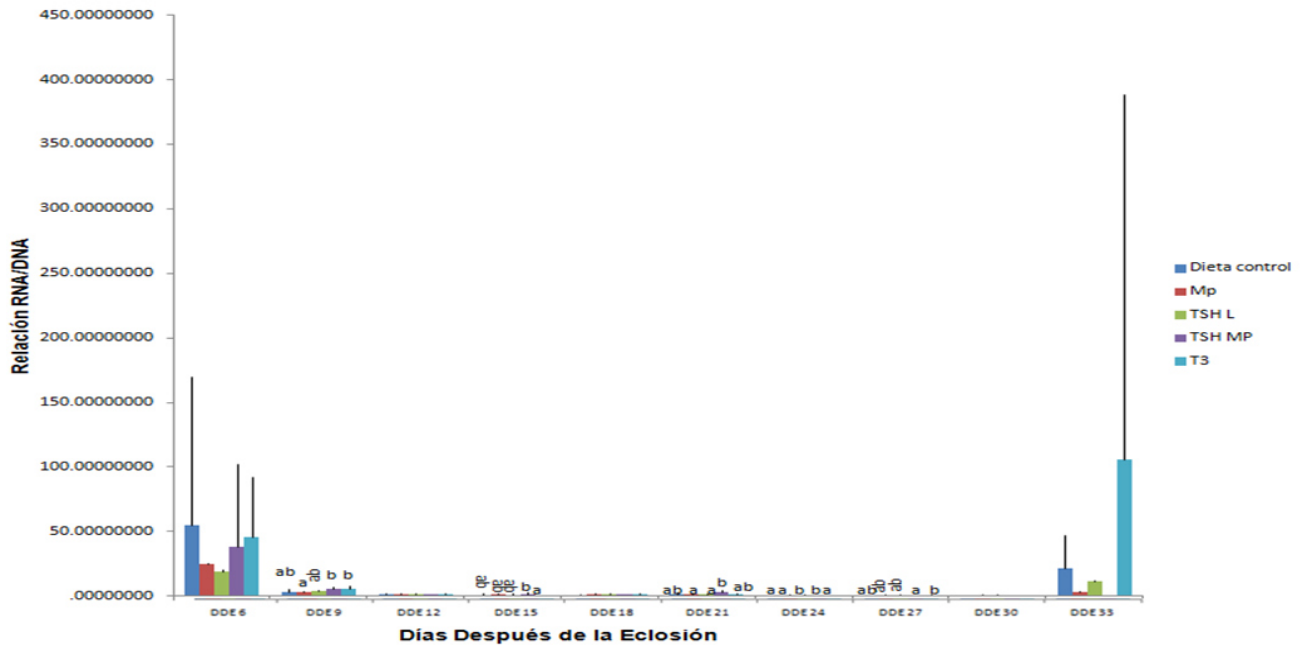
Se observaron diferencias significativas en la relación RNA/peso seco los días 9 ( $F=20.82$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=26$ ), 16 ( $F=9.70$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=26$ ) y 21 ( $F=5.95$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=26$ ) DDE, manteniendo los valores bajos durante los primeros días e incrementándose hasta el 21 DDE, observándose los mayores valores en el tratamiento de tirotrópina microencapsulada y T3.



**Figura 17.** Relación RNA/peso seco ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3) (Duncan  $< 0.05$ ).

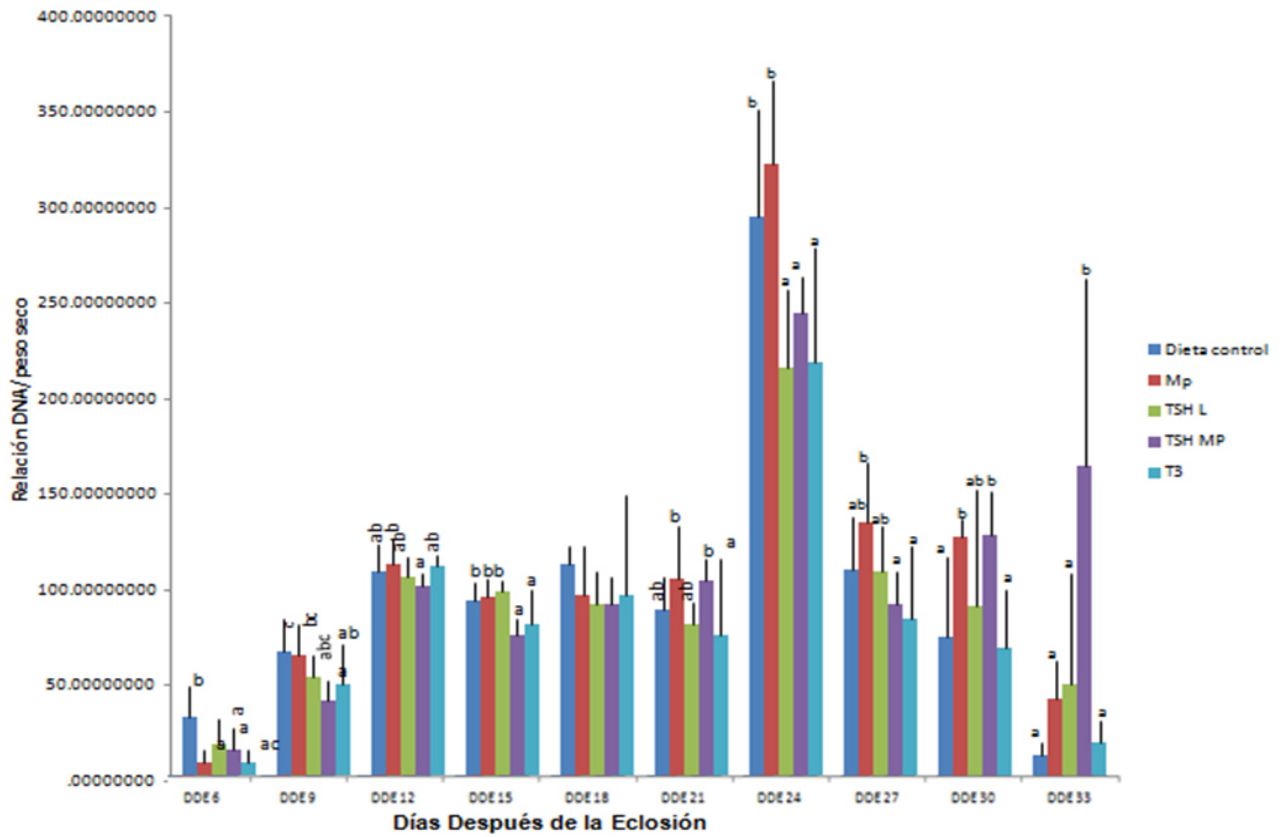
- **Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

La relación RNA:DNA se detectó en el 2 DDE (Figura 18), los siguientes días disminuyó notablemente, y volvió a incrementar ligeramente el 33 (F=1.06; p=0.38; gl=44) DDE destacando el tratamiento de T3 por exhibir los valores más altos.



**Figura 18.** Relación RNA:DNA ( $X \pm SD$ ) durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos: dieta control, micropartículas blanco, tirotrona libre, tirotrona microencapsulada y triiodotironina. (Duncan < 0.05).

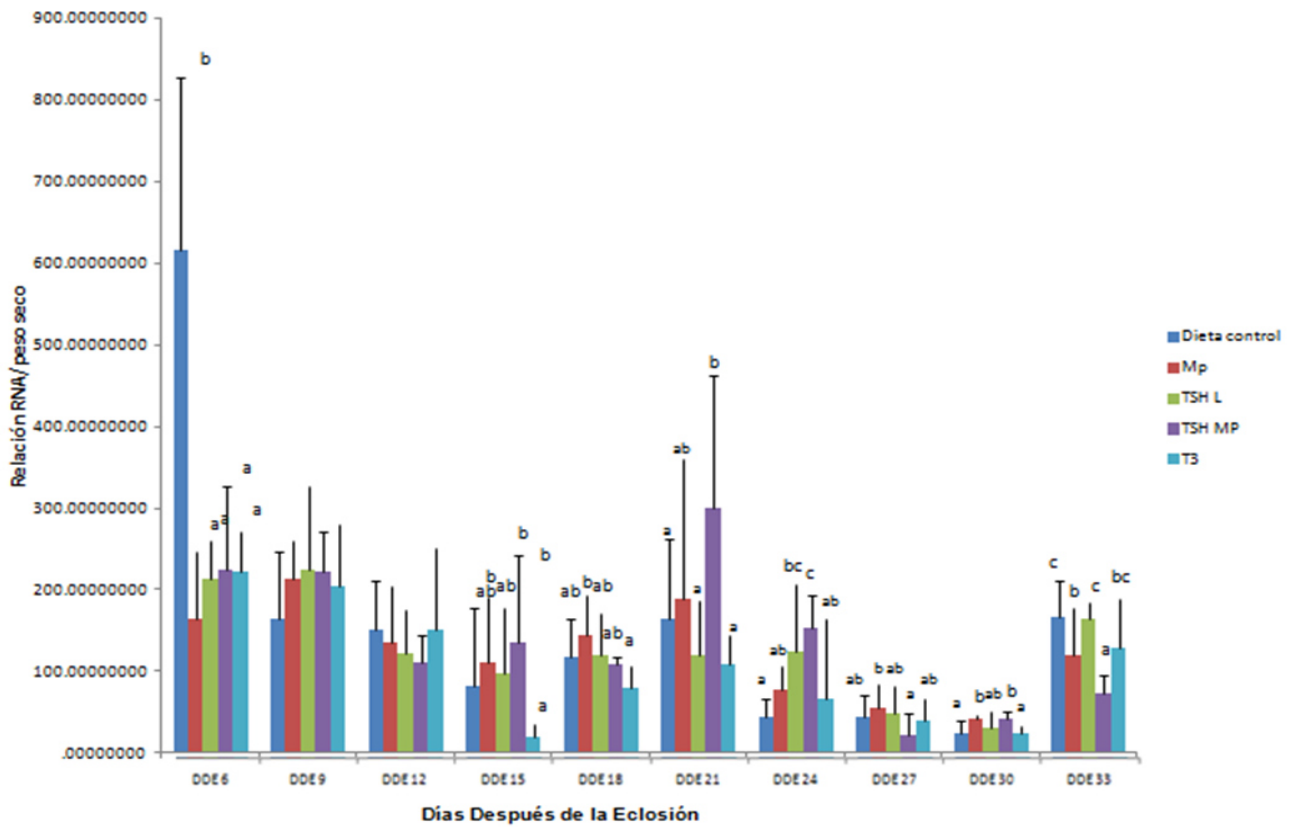
Se observaron diferencias significativas en cuanto a la relación DNA/Peso Seco todos los días excepto el 18 DDE (F=0.80; p=0.52; gl=44).



**Figura 19.** Relación DNA/peso seco durante el desarrollo de larvas de tilapia expuestas a los tratamientos: dieta control, micropartículas blanco, tirotrina libre, tirotrina microencapsulada y triiodotironina.



Se observaron diferencias significativas en cuanto a la relación RNA/peso seco todos los días, excepto el 9 (F=1.00; p=0.41; gl=44) y 12 DDE (F=0.63; p=0.64; gl=44).

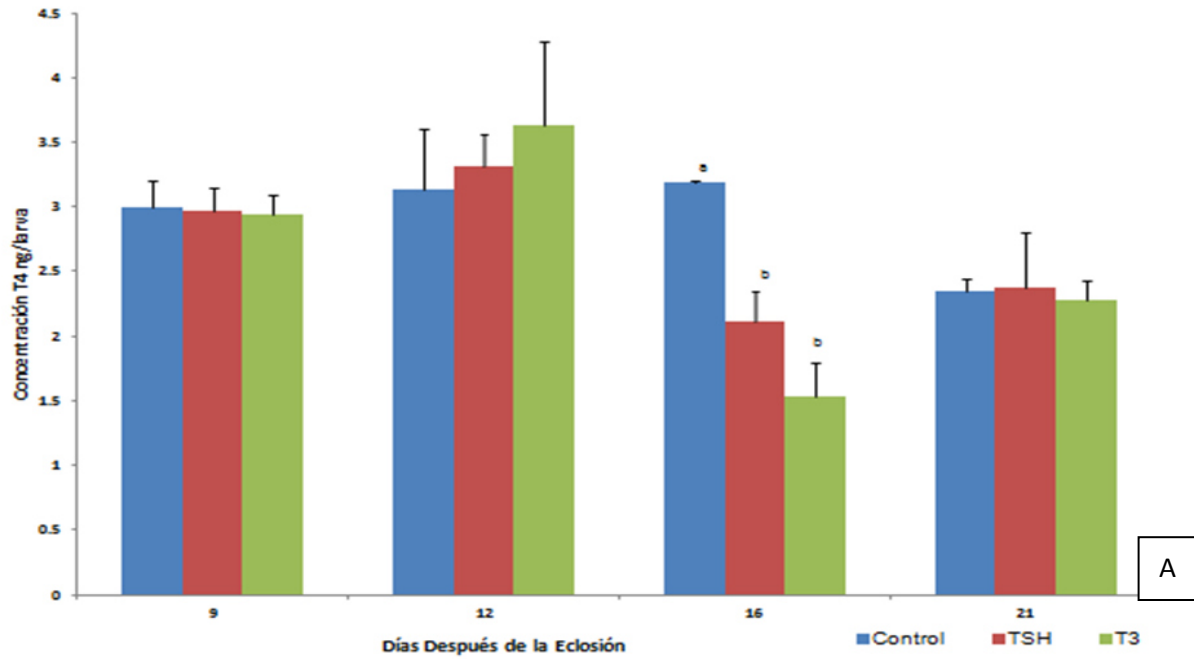


**Figura 20.** Relación RNA/peso seco durante el desarrollo de tilapia expuestas a los tratamientos de dieta control, micropartículas blanco, tirotrópina libre, tirotrópina microencapsulada y triiodotironina.

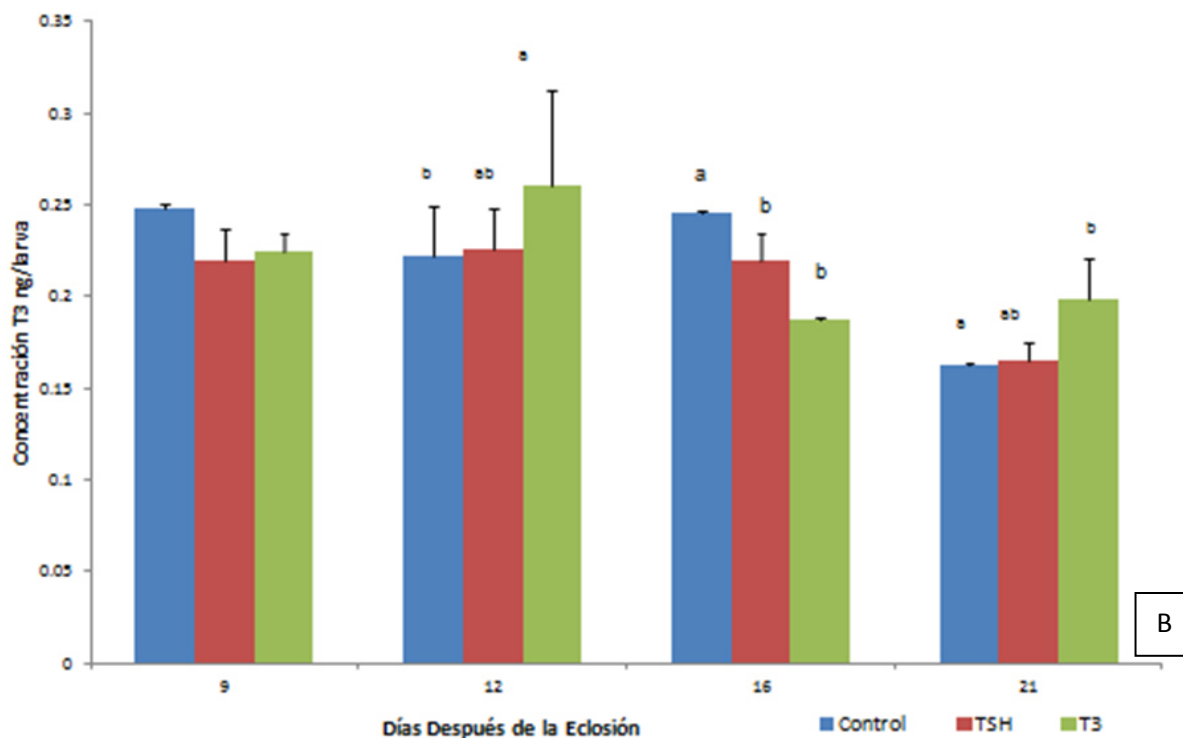
## 7.2.4 Cuantificación de hormonas tiroideas

- Pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*)

El nivel de T4 disminuyó conforme avanzó el desarrollo de las larvas, y solo se registraron diferencias significativas en el 16 DDE (F=33.65; p=0.00; gl=8).



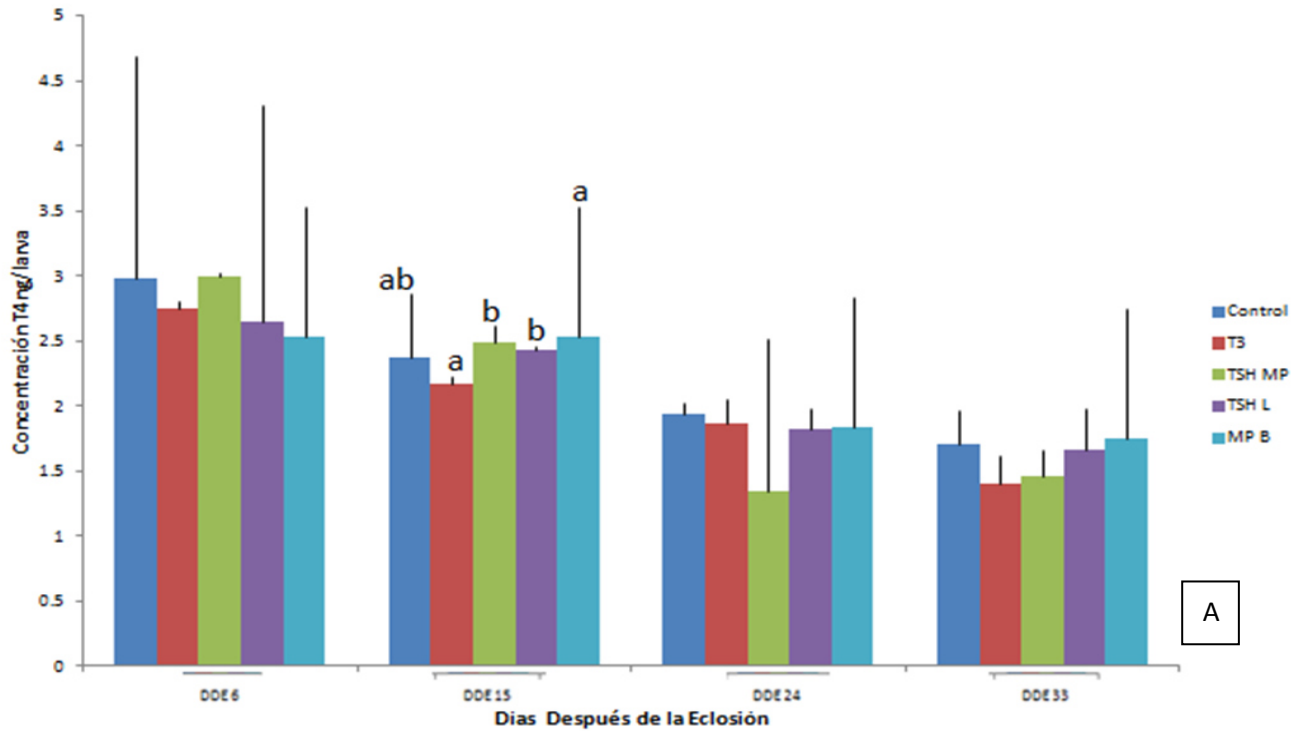
Por otra parte, los valores de T3 también fueron mayores al inicio del desarrollo larvario, observándose diferencias significativas solo los días 12 ( $F=33.65$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=8$ ), 16 ( $F=16.30$ ;  $p=0.00$ ;  $gl=8$ ) y 21 ( $F=5.50$ ;  $p=0.04$ ;  $gl=8$ ) DDE.

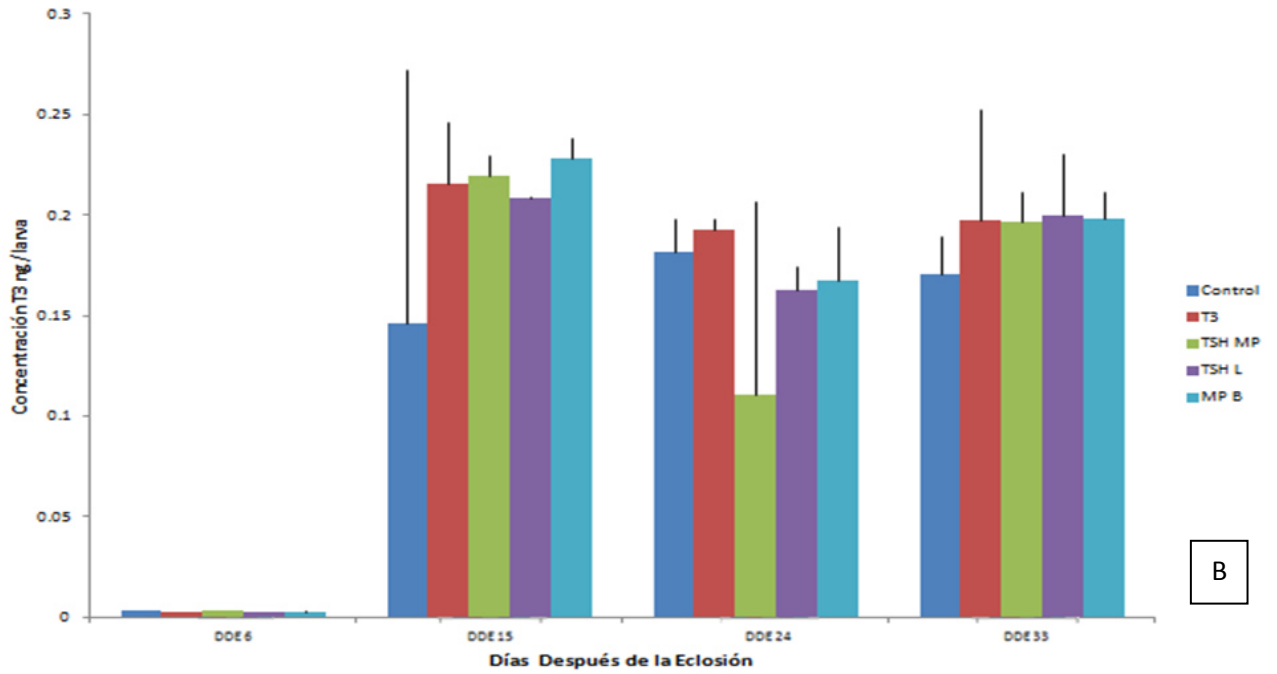


**Figura 21.** Concentración (ng/larva) de las hormonas T<sub>4</sub> (A) y T<sub>3</sub> (B) en larvas de pejelagarto pinto expuestas a la TSH microencapsulada, el tratamiento control y el control positivo (T3).

- **Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

Se observaron diferencias significativas en los niveles de T4, en el 15 DDE (F=3.36; p=0.05; gl=14), mientras que los valores de T3 fueron muy bajos al inicio del crecimiento larvario (Figura 22-B), presentando un notable incremento el 11 DDA, sin embargo no se observaron diferencias significativas.





**Figura 22.** Concentración (ng/larva) de la hormona T<sub>4</sub> (A) y T<sub>3</sub> (B) ( $X \pm SD$ ) en larvas de de tilapia expuestas a los tratamientos de dieta control, micropartículas blanco, tiotropina libre, tiotropina microencapsulada y triiodotironina. (Duncan < 0.05).

## 8. DISCUSION

### 8.1 Microencapsulación de la tirotropina

- **Emulsión múltiple**

La emulsión doble resultó ser una técnica satisfactoria para la protección de la TSH, ya que su utilización permitió observar una mejora significativa en el peso, longitud y supervivencia de las últimas etapas del desarrollo larvario del pejelagarto pinto. Lamentablemente, al contar con un número limitado de huevos para esta especie no se pudo establecer otro tratamiento que incluyera la TSH sola y la microcapsula sin hormona para ganar mayor claridad sobre la acción de la TSH. No obstante, la comparación con la dieta control y el testigo positivo (T3), permite aseverar que existió un efecto protector.

- **Emulsión doble con evaporación de solvente**

De igual manera la emulsión doble con evaporación de solvente resultó ser una técnica satisfactoria para la protección de la TSH ya que se pudo notar el mismo efecto en las últimas etapas de desarrollo de las larvas de tilapia, ya que el peso de los organismos alimentados con la hormona encapsulada resultó mayor, aunque no se observaron diferencias significativas en cuanto a la longitud y supervivencia.

Para la elaboración de las microcapsulas se realizaron distintas formulaciones, en las cuales se modificaron variables relativas a la agitación y el porcentaje de fase externa para obtener un mayor tamaño de partícula y garantizar la completa microencapsulación de la hormona. El polímero utilizado en la fase externa fue el poli-vinil-alcohol (PVA), el cual está considerado como un producto de bajo impacto ambiental, que presenta una alta resistencia química, gran solubilidad acuosa y además tiene la ventaja de ser biodegradable (Baker et al., 2012). Fue necesario realizar distintas concentraciones de PVA, ya que debido a su solubilidad en agua necesitaba ser reticulado para formar un hidrogel. Estos enlaces cruzados que se forman, ya sean físicos o químicos, son los que proporcionan la estabilidad estructural del compuesto. Es por esto, que el grado de reticulación del polímero dicta la difusión de sus propiedades físicas y biológicas (Baker et al., 2012). La concentración de PVA al 3%, resultó ser la adecuada para la emulsión, pues con ésta se logró un tamaño de partícula adecuado de 14.16 a 21.09  $\mu\text{m}$ . La velocidad de agitación apropiada fue de 1,900

rpm/min para la emulsión primaria (fase orgánica + fase interna) y de 1,000 rpm/20min para la emulsión doble. De igual manera, el polímero catiónico Eudragit E100 resultó ser un excelente material de protección para la hormona, ya que dio lugar a la formación de la fase orgánica estable de recubrimiento.

## **8.2 Efecto de las hormonas tiroideas en pejelagarto pinto y tilapia**

### **8.2.1 Ontogénesis enzimática**

La digestión implica la liberación y actividad de muchas enzimas derivadas del estómago, páncreas e intestino, las cuales trabajan en conjunto para completar la hidrólisis de los nutrientes ingeridos (Fish, 1960). Las enzimas se encuentran entre las moléculas más importantes para la utilización de los alimentos en peces, siendo las características de las enzimas digestivas, que difieren entre especies, las que determinan su capacidad digestiva (Lemieux et al. 1999).

La digestión de los nutrientes ingeridos comienza con la acción de enzimas gástricas en el estómago continuando con una degradación ulterior en el intestino por las enzimas digestivas secretadas por el páncreas incluyendo tripsina, quimotripsina, amilasas, lipasas (Fish, 1960; Nagase, 1964; Cockson y Bourne, 1972; Moriarty, 1973; Fang y Chiou, 1989). Por otra parte, la absorción de las partículas de alimentos y moléculas, tiene lugar generalmente a lo largo del borde en cepillo de las células epiteliales columnares (Hirji y Courtney, 1982; Kuz'mina y Gelman, 1997), en donde todavía actúan las aminopeptidasas y existen transportadores específicos para distintas moléculas, de tal manea que les permita alcanzar la membrana basal de los enterocitos y de ahí la circulación.

Desde el punto de vista de la capacidad digestiva de los organismos, es sumamente importante entender la manera en que las enzimas actúan durante su desarrollo. Esto conlleva a estudiar a lo largo de la ontogenia temprana la aparición y función de las enzimas digestivas (Bolasina et al., 2006; Ben et al., 2006).

En el pejelagarto, la actividad proteolítica ácida y la actividad tipo leucina-aminopeptidasa total se detectaron a los 9 DDE para después incrementarse a los 12 DDE. La actividad tipo tripsina se detectó en el 9 DDE incrementándose hasta el 16 DDE. Por otro lado, en la tilapia la actividad proteolítica tipo tripsina y tipo leucina-aminopeptidasa se detectaron a los 6 DDE mostrando un incremento al 9 DDE.

- **Efecto de las hormonas tiroideas en la actividad enzimática digestiva**

El desarrollo temprano de los vertebrados está bajo el control de las hormonas, entre las cuales las hormonas tiroideas tienen una profunda influencia en el crecimiento y maduración de muchos tejidos eucariotas (Shambaugh, 1986). Ya se ha descrito anteriormente la influencia de las hormonas tiroideas en el desarrollo del tracto digestivo en los peces, así como su efecto positivo en el incrementando la metamorfosis, supervivencia y diferenciación de tejidos. Es por esto que la evaluación de la actividad enzimática digestiva es un buen indicador bioquímico del estado de condición de las larvas (Lazo *et al.*, 2011).

A este respecto diversos estudios han sugerido la capacidad de las hormonas tiroideas para acelerar el desarrollo de las larvas (Inui y Miwa 1985; Miwa y Inui 1987) y con este una diferenciación y maduración más rápida des estructuras digestivas. A título de ejemplo, Miwa *et al.*, (1992) mostraron que la T<sub>4</sub> aceleró la aparición de pepsinógeno en larvas de lenguado (*Paralichthys olivaceus*), indicando que se promovió la maduración del estómago de esta especie.

En este sentido se ha demostrado que la aplicación exógena de las hormonas tiroideas mejora el crecimiento, desarrollo, supervivencia de las larvas, acelerando además la absorción de vitelo en distintos teleósteos, tales como la tilapia (*Sarotherodon mossambicus*), la carpa (*Cyprinus carpio*), el sabalote (*Chanos chanos*), y varias especies marinas (Lam 1980; Nacario 1983; Lam *et al* 1985; Lam y Sharma 1985; Brown y Kim , 1995). Igualmente, Castillo (2012) reportó un aumento de la actividad de estas enzimas en las larvas de catán y pejelagarto pinto expuestas a tratamientos con hormonas tiroideas.



- **Actividad de proteasas ácidas totales**

La morfología y desarrollo funcional del sistema digestivo de larvas de peces fue primeramente revisado por Tanaka (1973) y Govoni et al., (1986), y en estudios recientes por Hoehne-Reitan y Kjørsvik (2004) y Zambonino - Infante et al. (2008). Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas, y están presentes en muchos organismos (Dixon Y Webb, 1979). Están implicadas en procesos como la digestión de proteínas, la activación de proenzimas y prehormonas, entre otros (Stroud, 1975). La digestión de proteínas en los teleosteos comienza con la hidrólisis de proteínas y polipéptidos por la acción de la pepsina, tripsina, quimotripsina y aminopeptidasas (Fish, 1960; Nagase, 1964; Cockson y Bourne, 1972; Moriarty, 1973; Fang y Chiou, 1989).

En las diferentes especies, dependiendo de sus hábitos alimenticios, estas enzimas se distribuyen de diversas maneras a lo largo de la longitud del intestino (Bundit et al., 2000).

Dentro de las enzimas gástricas, la proteasa ácida más importante es la pepsina, la cual es una enzima aspártica que hidroliza a su máxima capacidad cuando se encuentra a pH ácido y requiere que el residuo 2 de la cadena peptídica sea fenilalanil, tirosil o triptofanil (Cataldi et al., 2002). Es por esto que en el presente estudio se analizó la actividad proteolítica ácida total utilizando un estándar de pepsina comercial como control. En el pejelagarto pinto se detectó actividad proteolítica ácida a partir de los 9 DDE, incrementándose en el 12 DDE y disminuyendo del 16 DDE al 21 DDE, observándose diferencias significativas en el 16 DDE. Por otra parte, aunque no de manera significativa, se observó un notable incremento en la actividad de las proteasas ácidas de las larvas de los tratamientos con hormonas tiroideas en el día 21 DDE (TSH). En estudios previos, Castillo (2012), indica que la actividad proteolítica ácida en larvas de esta misma especie fue detectada al 6 DDE, lo cual pudo deberse a factores genéticos o a la temperatura a la que se criaron las larvas. Igualmente, menciona no haber observado incrementos significativos en la actividad proteolítica ácida de las larvas sometidas a tratamientos con hormonas tiroideas. Vale la pena destacar el hecho de que esta especie presenta un desarrollo más

lento, por lo que es de esperarse que la actividad ácida se manifieste más tardía que en el caso otras especies de lepisosteidos (Mendoza et al., 2008).

En la tilapia, se detectó actividad proteolítica ácida desde el 6 DDE, posteriormente en el periodo de los días 9 a 27 DDE los valores se mantuvieron bajos aunque se observaron algunas diferencias entre los tratamientos, destacando los mayores valores para la T3 (DDE 18) y TSH microencapsulada (DDE 21). Sin embargo, a partir del 23 DDE se observaron mayores valores para las micropartículas banco, un efecto no esperado que hace suponer que en esta especie no existe un efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad proteolítica ácida durante estas etapas de desarrollo. Al finalizar el bioensayo (33 DDE), se observó una disminución de la actividad en todos los tratamientos, y a pesar de que el tratamiento de TSH presentó valores más altos, no se observaron diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos. La ausencia de efecto de las hormonas tiroideas sobre este tipo de actividad enzimática pudiera deberse no solo a un desarrollo digestivo más lento con respecto a los lepisosteidos, sino también al hecho de que este tipo de enzimas son de poca importancia en las tilapias en las primeras etapas. En efecto, a diferencia de las proteasas alcalinas, las cuales juegan un papel importante en la digestión durante los primeros días de la alimentación, las proteasas ácidas se incrementan cada vez más hacia el final del período de desarrollo de las larvas, concomitante con la aparición de un estómago funcional, es por esto que la actividad proteolítica detectada en todos los tratamientos tuvo un incremento en el 30 DDE (Lauf y Hoffer 1984; Lazo et al. 2007). Este fenómeno ha sido observado en otras especies, así en un estudio realizado por Alliot et al. (1977), en el que determina la actividad de esterasas,  $\alpha$  glucosidasa, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, y fosfatasa ácida y alcalina; en larvas de *Dicentrarchus labrax*, menciona que la actividad al momento de la eclosión es muy baja y esta se va incrementando hasta estabilizarse.

- **Actividad tipo tripsina**

La tripsina y las proteasas alcalinas totales son enzimas digestivas secretadas en el páncreas, que actúan en el intestino en condiciones de pH básico y son responsables de la digestión luminal de macromoléculas proteicas en el intestino (Segner et al., 1993). Por lo

regular, la actividad de este tipo de enzimas inicia desde antes de la apertura de la boca y el inicio de la alimentación exógena. Esto se debe a que las larvas de peces, antes de la aparición del estómago, ya cuentan con un intestino funcional y estas enzimas se encargan de degradar las proteínas que se obtienen de la reabsorción del saco vitelino (Dabrowski y Culver, 1991; Moyano et al., 1996).

Como se mencionó anteriormente en el pejelagarto pinto, la actividad tipo tripsina se detectó a partir de los 9 DDE aumentando considerablemente hacia el 16 DDE y disminuyendo de este día al 21 DDE. El hecho de que se presente un incremento repentino en la actividad enzimática se debe sin duda a que al momento en que se terminan las reservas vitelinas e inicia la alimentación exógena, y esto es posible ya que el sistema digestivo de las larvas se encuentra muy desarrollado (Aguilera et al., 2010), por lo que ya cuentan con la capacidad de sintetizar y secretar una gran cantidad de enzimas. A este respecto, en un estudio realizado por Castillo (2012) se detectó que la actividad de la tripsina inició de manera muy incipiente a los 2 DDE para después incrementarse a los 4 DDE. Esta diferencia se puede deber a que los peces como grupo muestran una notable diversidad de estructura y función de su fisiología nutricional, a pesar de que los mecanismos básicos de los órganos y el desarrollo del sistema son similares en todos los teleósteos existen diferencias inespecíficas considerables en el tiempo relativo de su diferenciación, el desarrollo, y funcionalidad durante la ontogenia temprana (Lazo et al., 2011). Y como se mencionó anteriormente, no pueden descartarse diferencias genéticas y las condiciones de cultivo.

En cuanto a la tilapia, la actividad tipo tripsina fue detectada a partir de los 6 DDE, con un incremento en el 9 DDE donde no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Bundit et al., (2002) reportan esta actividad enzimática a partir del 6 DDE para *Oreochromis niloticus* coincidiendo con lo observado en la presente investigación. Por otro lado, Tengjaroenkul et al., (2002), en un estudio realizado con *O. niloticus* observaron la presencia de zimógenos granulares desde el inicio de la eclosión, estos zimógenos son precursores de la actividad tripsina y quimotripsina (O'Connell, 1976; Govoni, 1980), por lo que requieren de la maduración intestinal y los estímulos adecuados para adquirir la capacidad de digerir cualquier tipo de dieta. En otro estudio con cíclidos Álvarez (2003)

menciona que la expresión para la tripsina a lo largo de la ontogenia de *P. splendida* muestra niveles bajos durante los primeros 4 DDE (fase de alimentación endógena), y solo se incrementan a partir del día 5 DDE, algo similar a lo observado en el presente estudio. Las pequeñas discrepancias en cuanto a la ontogenia en comparación con otras especies de cíclidos se puede deber que el desarrollo de órganos y funciones fisiológicas se ve afectado por la historia de vida general de cada especie, así como por la gran variedad de factores bióticos y abióticos, incluyendo la calidad del agua, principalmente la temperatura, y la disponibilidad de alimentos y su composición (Lazo et al., 2011).

- **Actividad tipo leucina-aminopeptidasa**

Las células epiteliales del intestino en los peces poseen enzimas intra y extra celulares: las enzimas del citosol y las enzimas del borde en cepillo, respectivamente. Las enzimas del citosol se encuentran en el citoplasma celular y son principalmente hidrolasas ácidas. Por su parte, las enzimas del borde en cepillo están asociadas a la membrana celular y entre ellas se encuentra la leucina-aminopeptidasa (LAP) (Cahu y Zambonino, 1997). Estas enzimas cobran relevancia durante ontogénesis enzimática ya que el desarrollo morfométrico y la maduración del intestino se caracteriza por una disminución de la actividad de las enzimas del citosol, acompañado por un aumento en la actividad de las enzimas del borde en cepillo de los enterocitos. Este proceso de maduración se caracteriza por ser sensible a la cantidad de nutrientes ingeridos, en consecuencia, la disparidad entre la composición de la dieta y las características digestivas de las larvas puede retrasar o acelerar la programación genética del desarrollo intestinal (Zambonino - Infante y Cahu 2001).

Al igual que en las actividades enzimáticas anteriores, en el pejelagarto, la actividad leucina-aminopeptidasa se detectó a partir del 9 DDE, incrementándose significativamente para el tratamiento T3 en el día 12 DDE y alcanzando los mayores valores, aunque sin diferencias significativas para el 16 DDE. Esto contrasta con lo reportado por Castillo (2012) quien observó un incremento de la actividad en el 3 y 9 DDE. Es importante considerar que la temperatura es un factor importante en el desarrollo ontogénico, por lo

que la diferencia de temperatura a la que se realizó el bioensayo pudo haber influido en un desarrollo más lento.

En la tilapia, la actividad se detectó en el 9 DDE y mostró una actividad sumamente importante para el 12 DDE en el caso del tratamiento de la TSH microencapsulada, para descender después y mantenerse constante durante el bioensayo, incrementándose finalmente en el 33 DDE. A este respecto, Tengjaroenkul (2000) observó, que la actividad enzimática se presentaba en el 3 DDE en *O. niloticus*. Estas diferencias se pudieron deber a la mayor sensibilidad de las técnicas de detección (histoquímica) empleadas por este autor.

### **8.2.2 Morfología y supervivencia**

El conocimiento sobre el desarrollo morfológico y patrones de crecimiento en larvas de peces es esencial para el manejo de estos y para la acuicultura (Chatain,1994; Koumoundouros et al., 1994, 1999; Bengtson, 1999), de aquí la importancia del presente estudio por conocer los cambios morfológicos que se pudieran potencialmente inducir mediante el uso de hormonas tiroideas. En relación con esto, se sabe que el uso de hormonas tiroideas aumenta la velocidad de las tasas de desarrollo y eficientiza la tasa de conversión alimenticia de las larvas (Tagawa y Hirano 1987; Ayson y Lam 1993; Brown 1997; Mendoza et al, 2002;. Kang y Chang, 2004), por lo que se acorta la duración de la etapa de canibalismo. Para conocer el desempeño de estas hormonas sobre las larvas el estudio de la variación morfológica es un tema central en la biología, ya que proporciona la inferencia en la evolución, ontogenia, la etología, la historia de vida y ecología de la especie (Jacquemin y Pyron, 2013).

En la presente investigación, las larvas de pejelagarto pinto del tratamiento de tirotrópina microencapsulada mostraron mayores valores de peso en los días 12 y 21 DDE, sin embargo solo se observaron diferencias significativas en el 21 DDE. Por otra parte, la longitud total se fue incrementando a lo largo del bioensayo, y a partir del 12 DDE el tratamiento de T3 mostró valores significativamente mayores, mismos que se mantuvieron hacia el final el bioensayo, no obstante en este momento las larvas del tratamiento de

tirotropina microencapsulada fueron las que mostraron mayores longitudes estadísticamente significativos, en concordancia con lo que se había observado con los valores de peso. En cuanto al índice de supervivencia, el mayor porcentaje se observó en el tratamiento de tirotropina microencapsulada, no obstante, no se encontraron diferencias significativas. En relación con esto, Castillo (2012), reporta no haber encontrado un efecto tan marcado de las hormonas tiroideas sobre el crecimiento larvario para catán y pejelagarto pinto, lo cual podría deberse en parte a los diferentes métodos de administración de las hormonas. Sin embargo, reporta que la tasa de supervivencia para el catán se incrementó con la administración de hormonas tiroideas, esto producto de una mayor homogeneidad de tallas. En otro estudio realizado por Aguilera (1999) se administró estas hormonas al catán durante un periodo más prolongado y tampoco encontró un efecto marcado sobre la longitud total de las larvas. Esto era de esperarse debido a la gran tasa de crecimiento del catán, en comparación con el pejelagarto pinto (Mendoza et al., 2010). Igualmente, Bollfrass (2007) menciona no haber encontrado cambios significativos en la tasa de crecimiento, tasa de eclosión y velocidad de desarrollo de las larvas de pejelagarto pinto. Es importante considerar que la temperatura es la variable que más influye en el crecimiento de los peces (Bakanov et al 1987), es probable que los estudios antes mencionados, este factor pudo haber limitado a las larvas para responder a las hormonas tiroideas, ya que las larvas en estos estudios se mantuvieron a una temperatura de  $23,6 \pm 0,36$  ° C, a diferencia de las condiciones en que se mantuvieron en el presente estudio, que fue a una temperatura de 21 ° C. De lo que se podría deducir que se requeriría que el pejelagarto pinto fuera criado a temperaturas más altas para así tener mayor potencial de crecimiento.

En el caso de la tilapia, el peso se fue incrementando a lo largo del bioensayo y no fue sino hasta el 33 DDE donde se pudieron observar diferencias marcadas en cuanto al incremento de peso para el tratamiento de tirotropina encapsulada, destacando significativamente por encima de los demás. En cuanto a la longitud, solo se observaron diferencias significativas en el 15 DDE sobresaliendo igualmente el tratamiento de tirotropina libre, posteriormente la longitud se fue incrementando por igual para todos los tratamientos, observándose al final del bioensayo una longitud mayor aunque no significativa para las larvas el tratamiento de TSH MP. Es importante señalar la gran variación entre los datos morfológicos para los distintos tratamientos, esto se podría

explicar en función del crecimiento alométrico de la especie, ya que la morfología está limitada principalmente por la filogenia, alometría, y la fisiología (Norton et al., 1995). De igual manera, se conoce que la ontogenia que está asociada con la maduración y el aumento del tamaño corporal (alometría) es una fuente primaria de variación morfológica (Hood y Heins, 2000). Otra fuente de variación morfológica son las diferencias fisiológicas entre machos y hembras. En este sentido dimorfismo sexual se observa en los peces como resultado de la selección de la fecundidad femenina, la competencia entre machos y competencia espermática (Parker, 1992).

### **8.2.3 Relación de ácidos nucleicos**

El estudio de la concentración de los ácidos nucleicos, en los tejidos de los individuos durante las diferentes etapas de su desarrollo, resulta de especial interés para una mejor comprensión de la fisiología de los organismos, ya que a través de su estudio se pueden inferir funciones relacionadas con la utilización de los nutrientes y la formación presente y futura de los tejidos (Chung et al., 1988 y 1991).

El principio teórico de la utilización de la relación RNA/DNA asume que el contenido de DNA es virtualmente constante en las células somáticas, de tal manera que las concentraciones tisulares reflejan el número de células y es independiente de la condición nutricional. Mientras que, la cantidad de RNA celular, y principalmente de RNA ribosomal (RNAr) disponible en los tejidos, es directamente proporcional al nivel de síntesis de proteínas, por lo cual puede verse afectada por la condición nutricional. Así, la relación RNA/DNA resultante refleja la intensidad metabólica celular y ha sido utilizada para medir la condición y el crecimiento potencial de las larvas de peces de diferentes especies (Clemmenssen, 1996).

En el pejelagarto pinto la relación RNA:DNA se mantuvo constante desde el inicio del desarrollo de las larvas, y no fue sino hasta el 21 DDE cuando se detectó un incremento significativo en el tratamiento de TSH encapsulada comparado con la dieta control y la triiodotironina. Esto resulta congruente al observar la relación de DNA y RNA con respecto

al peso seco. La relación DNA/Peso seco fue disminuyendo paulatinamente, como era de esperarse, debido al incremento de peso de las larvas durante el desarrollo. A pesar de haber detectado diferencias significativas en las variaciones de esta tasa durante el desarrollo, cabe destacar la del 21 DDE en la cual las larvas de la dieta control y T3 mostraron resultados similares, mientras que la tasa de a TSH encapsulada reveló el menor valor. En relación con esto, se ha encontrado que la relación RNA/DNA en larvas de peces cultivados se correlaciona positivamente con las densidades de alimento ofrecidas y las tasas de crecimiento alcanzadas. De aquí, que se haya propuesto como un índice para evaluar la condición nutricional de las larvas (Carreón, 2002). A este respecto, se ha sugerido que las variaciones registradas en las estimaciones de la relación RNA/DNA han sido debidas principalmente a la concentración de RNA. En este sentido se ha postulado igualmente, que el contenido de DNA es más estable. De aquí surgió un índice basado en el contenido relativo de DNA (DNA/Peso Seco). En relación con esto, varios estudios en los que se ha empleado la relación RNA/DNA han reportado un aumento en el contenido de DNA (expresado como porcentaje del peso seco de la larva) de manera concomitante con un descenso en la relación RNA/DNA asociada a la inanición de las larvas. Esto parece ocurrir debido a que los animales no alimentados pierden peso mientras que el DNA es conservado. De aquí, que una relación DNA/Peso Seco sea igualmente un indicador potencial de la condición nutricional de la larva. En el presente estudio a pesar de que las larvas sometidas al tratamiento con TSH microencapsulada mostraron un mayor peso, mostraron también una relación menor de DNA/Peso seco. Esto puede ser atribuible a una mayor ganancia en peso en las larvas de este tratamiento como ya se explicó anteriormente, de lo que se podría igualmente deducir que parte del peso ganado no correspondería a músculo, sino a otros tejidos (lípidos), o bien porque en esta etapa las larvas estuvieran experimentando un crecimiento hipertrófico en lugar de un crecimiento hiperplásico.

Esta aproximación tiene por otra parte la ventaja adicional de obtener de manera más fácil y confiable valores de DNA que determinar DNA y RNA de manera simultánea (Bergeron et al., 1991). Sin embargo, la relación DNA/Peso seco no permite la evaluación del potencial de crecimiento, y la habilidad de la larva para recuperarse de la inanición, contrariamente a la utilización de la relación RNA/DNA (Ferron y Leggett, 1994).



En cuanto a la relación RNA/peso seco se obtuvieron valores constantes durante el inicio del desarrollo larvario, salvo en el 21 DDE, cuando las larvas del tratamiento de TSH microencapsulada resultaron con una mayor relación de RNA/Peso seco. Esto reflejaría una mayor actividad de síntesis de proteínas. A este respecto la relación RNA/DNA ha sido considerada como un indicador más preciso del crecimiento que la simple concentración de RNA, ya que esta relación no se ve afectada por el número de células.

Los resultados del presente estudio contrastan con un previo estudio realizado con larvas de lepisosteidos en el que se indicó que la relación DNA/RNA aumentó en el 13 DDE, permaneciendo constante a partir de entonces lo que implica que el crecimiento tisular, principalmente como un producto de acreción proteíca, se estabiliza en esta etapa, mientras que las larvas continúan creciendo con la misma intensidad metabólica. Esto pudo deberse entre otros aspectos a los métodos diferentes de suministro de las hormonas. Estos datos apoyan las observaciones morfológicas que indica el final de la metamorfosis, el inicio del crecimiento exponencial y la estabilización de la cantidad de enterocitos (Mendoza, Aguilera, Carreon et al., 2002, Mendoza, Aguilera y Carreon, 2002; Mendoza, Aguilera, Carreon, Montemayor y Gonzalez, 2007).

En cuanto a la tilapia, la relación RNA:DNA se detectó en el 6 DDE manteniéndose estable durante todo el desarrollo hasta el final del bioensayo (33 DDE) cuando se observó un efecto marcado de la T3, aunque con una enorme variabilidad intra-tratamiento. En cuanto a la relación DNA/Peso seco se comenzó a observar un incremento desde el día 6 DDE elevándose y estabilizándose los siguientes días, y mostrando un incremento notable para el 24 DDE, destacando los tratamientos de las hormonas tiroideas como aquellos que mostraron los menores valores. Sin embargo al analizar la totalidad del desarrollo esto pudo deberse a las variaciones intra-tratamientos, ya que posteriormente se observó un descenso y al final (33 DDE) se observó una mayor tasa DNA/Peso seco con la TSH microencapsulada, lo que concordaría con los valores de peso registrados para este momento.

Por otra parte la relación RNA/Peso seco se detectó desde el 6 DDE, con enormes variaciones para la dieta control y posteriormente se observó una estabilización paulatina atribuible a la ganancia en peso durante el desarrollo. En breve la relación de RNA/peso

seco fue mayor al inicio del bioensayo, 6 DDE, la relación disminuyó los siguientes días, mostrando el 21 DDE un notable incremento en el tratamiento de tirotropina encapsulada, sin embargo no se observaron diferencias significativas. No fue sino hasta el final del experimento (33 DDE) que se notó un incremento para la mayor parte de los tratamientos. Sin embargo por mostrar un desarrollo más lento la tilapia, en relación al pejelagarto pinto, es probable que para observar diferencias conspicuas se requiriera de un periodo más extendido de observación.

#### **8.2.4 Cuantificación de hormonas tiroideas**

La manipulación experimental de los niveles de hormonas tiroideas, influye directamente sobre el crecimiento y desarrollo de numerosas especies de peces durante el desarrollo larvario (Kobuke et al 1987). En las larvas de pejelagarto pinto se detectó T4 desde el 9 DDE mostrando similitud en la concentración de los tres tratamientos. En el 12 DDE, se observó un incremento de la hormona en los tratamientos de TSH y T3, disminuyendo significativamente estos valores en el 16 DDE. Finalmente, en el 21 DDE se estabilizó la concentración de las T4 para los tres tratamientos. Mientras que la concentración de la T3 se mantuvo estable hasta el 16 DDE para después experimentar un incremento significativo en el caso del tratamiento con T3. Esto significaría la conversión de T4 a T3 controlada por la actividad de la 5' monodesiodinasa a partir del día 16 DDE, lo cual explicaría por que los cambios importantes en el pejelagarto pinto (incremento en peso, longitud, supervivencia y tasa RNA/DNA) se observan hasta después de este momento y hacia el final del bioensayo.

Por otra parte en la tilapia, la concentración de T4 y T3 se detectaron desde el día 6 DDE. Se observó una disminución de los valores de T4 a partir del 15 DDE siendo más notables estos hacia el final del experimento. Mientras que los valores de T3 fueron muy bajos al inicio del crecimiento larvario, y fue hasta el 15 DDE cuando se pudo observar la mayor concentración de la T3. De la misma manera que en el caso anterior esto reflejaría la actividad de la 5' monodesiodinasa en la conversión de T4 en T3, y explicaría el incremento en peso y longitud a partir de este momento.

## 9. CONCLUSIONES

- Se observó efecto claro de la TSH encapsulada en el pejelagarto pinto, con un incremento consecuente en el peso y longitud total de de las larvas
- El efecto de la TSH encapsulada sobre el desarrollo de las larvas del pejelagarto pinto también se vió reflejado en una mayor actividad metabólica (RNA/DNA, DNA Peso seco, RNA/Peso seco) que contribuye a explicar los resultados morfológicos observados
- Los resultados de la TSH fueron menos conspicuos en el caso de las larvas de tilapia, presumiblemente debido a su desarrollo más lento
- Ambos métodos de encapsulación de la hormona fueron eficientes

## 10. LITERATURA

- Aguilera, C. (1999) Bases fisiológicas del desarrollo de larvas de catán (*Atractosteus spatula*) perspectivas para su cultivo. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Monterrey, NL, 186 p.
- Aguilera, C., R. Mendoza, G. Rodríguez y G. Márquez (2002) Morphological Description of Alligator Gar and Tropical Gar Larvae, with an Emphasis on Growth Indicators. *Transactions of the American Fisheries Society*, 131: 899-909.
- Aguilera, C., R. Mendoza, J. Montemayor, A. Revol, L. Carreón y J. Holt (2010) En: Mendoza, R., C. Aguilera y Montemayor, J. (Eds.) *Biología, Ecología y Avances en el Cultivo del Catán Atractosteus spatula*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. 234 p.
- Al-Assaf, S., G.O. Phillips y P.A. Williams (2005) Studies on Acacia exudate gums: part II. Molecular weight comparison of the Vulgares and Gummiferae series of Acaciab gums. *Food Hydrocolloids*, 19(4): 661- 667.
- Al-assaf, S., T., Katayama, G. Phillips, Y. Sasaki y P. A. Williams (2003) Quality control of gum arabic. *FFI Journal*, 208: 771–780.
- Alemán, L. y W. Contreras (1987) Algunas consideraciones ecológicas sobre el pejelagarto (*Lepisosteus tropicus*) y sus hábitos alimenticios. Resúmenes IX Congreso Nacional de Zoología. Universidad. Juárez Autónoma de Tabasco. 1:127.
- Alliot, E., A. Pastoureaud y J. Trelleu (1977) Evolution des activités enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*). Variations des proteinogrammes et des zymogrammes. *Actes de Colloques du C.N.E.X.O.*,4: 85-91.
- Alvarez González, C.A. et al. (2008) Avances en la Fisiología Digestiva y Nutrición de la Mojarra Tenguayaca *Petenia splendida*. 135- 235 pp. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez.
- Amstrong D.J., P.N.C. Elliott, J.L. Ford (1995) Preparation and characterization of PLA-NSAID microspheres using variations of a solvent evaporation. *Technique 14 th Pharmaceutical Technology Conference*, 1:477-81.
- Appel, W. (1974) Leucine aminopeptidase determination with L-leucineamide as substrate. En: Bergmeyer, H. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press. Nueva York, EUA. pp: 954-958.
- AQUACOP y J. Calvas (1990) State of the art of IFREMER in tropical aquaculture. In: *Advances in tropical Aquaculture, Aquacop-IFREMER, Actes de Colloque*, 9: 625-642.
- Araneda, C. y F. Valenzuela (2009) Microencapsulación de extractantes: una metodología alternativa de extracción de metales. *Revista Ciencia Ahora*, 22(11): 9-19.
- Arce Moreno, B.L. (1989) Growth promoting effect of nicotinic acid and nicotinamide in hybrids of tilapia. *Veterinaria México*, 20(4): 415-418.

- Ayson F.G. y T.J. Lamb (1993) Thyroxine injection of female rabbitfish (*Siganus guttatus*) broodstock: changes in thyroid hormone levels in plasma, eggs, and yolk-sac larvae, and its effect on larval growth and survival. *Aquaculture*, 109(1): 83-93.
- Bais D, Lapasin R. 2003. Estudio de las matrices de polisacáridos para emulsiones: interacciones surfactantes poliméricos y propiedades reológicas. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 80, 129-139.
- Balon, E. K. (1975) Terminology of intervals in fish development. *J. Fish Res. Board Can*, 32: 1663–1670.
- Baragi, V. y R. Lovell (1986) Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larval development. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115: 478-484.
- Beccaria, C., Diaz, J. P., Connes, R., Chatain, B., 1991. Organogenesis of the exocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reared extensively and intensively. *Aquaculture* 99, 339-354.
- Bergensåhl, B., S. Fogler y P. Stenius (1986) The influence of gums on the stability of dispersions. In G. Phillips, D. J. Wedlock y P. A. Williams (Eds.), *Gums and stabilisers for the food industry*. Elsevier Applied Science, 3: 286 -293.
- Bergeron, J. P., Boulhic, M., y Galois, K. (1991) Effet de la privation de nourriture sur la teneur en ADN de la larve de sole (*Solea solea* L.). *ICES\_J. Mar. Sci.*, 43, 127- 134.
- Blanco, M., E. Fattal, F. Delie, V Daugé, BP Roques, P Couvreur. Encapsulation of a peptide derived from Cholecystikinin in PLGA microspheres designed for intracranial administration 14 th Pharmaceutical Technology Conference, Barcelona, Proceedings, 1995;vol 1:469-76.
- Bolasina S., A . Pèrez, Y. Yamashita (2005) Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) *Aquaculture* 191, 3332-342.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Brooks, W. (1851) A family poisoned by eating a gar. *The Northwestern Medical and Surgical Journal* 3(6):436-437.
- Brown C. L, S. I. Doroshov, J. Nunez, C. Hadley, J. Vaneennaam, R. Nishioka y H. Bern (1998) Maternal triiodothyronine injections cause increases in swimbladder inflation and survival rates in larval striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of Experimental Zoology*, 248(2): 168–176.
- Brown, C.L. y B.G. Kim (1995) Combined application of cortisol and triiodothyronine in the culture of larval marine finflsh.(In press).
- Buckley, L. (1984) RNA-DNA ratio: and index of larval fish growth in the sea. *Marine Biology*, 80: 291-298.
- Buckley, L. (1984) RNA-DNA ratio: and index of larval fish growth in the sea. *Marine Biology*, 80: 291-298.

- Buckley, L., E. Caldarone y T. Ong (1999) RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia*, 401: 265-277.
- Buddington, R.K. (1985) Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, during early development. *Journal of Fish Biology*, 26: 715-723.
- Burns, T.A., D. Stalling y W. Goodger (1981) Garichthyotoxin, its effect on crayfish, with notes on bluegill sunfish. *The Southwestern Naturalist*, 25(4): 513-515.
- Cahu, C.L. y J.L. Zambonino (1997) Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquaculture International*, 5: 151 – 160.
- Cahu, C. y J. Zambonino (1997) Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquaculture International*, 5: 151-160.
- Campanella, H. O., N. M Dorward y H. Singh (1995) A study of the rheological properties of concentrated food emulsions. *Journal of Food Engineering*, 25, 427–440.
- canal of tilapia and perch. *Hydrobiologia* 15, 161-178.
- Carreón, L. (2002) Evaluación de la condición nutricional de larvas de catán (*Atractosteus spatula*) durante el acondicionamiento al consumo de dietas artificiales. Tesis de Licenciatura. FCB, UANL. 103 pp.
- Castillo S., Bollfrass K., Mendoza R., Fontenont Q., Lazo J., Aguilera C. y Ferrara A. (2013) Stimulatory effect of thyroid hormones improves larval development and reproductive performance in alligator gar (*Atractosteus spatula*) and spotted gar (*Lepisosteus oculatus*) *Aquaculture Research*, 1–13.
- Castillo, S. 2012. Efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo temprano de los lepisosteidos *Atractosteus spatula* y *Lepisosteus oculatus*. Tesis Maestría en Ciencias, CICESE, Baja California, México
- Cataldi, E., C. Alba y A. Boglion et al. (2002) *Acipenser naccarii*: Fine structure of the alimentary canal with references to its ontogenesis. *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 329-337.
- Cetin M., A. Atila y Y. Kadioglu (2010) Formulation and In vitro Characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA Nanoparticles Containing Diclofenac Sodium. *AAPS PharmSciTech*. 11:3.
- Chakraborti P. y S. Bhattacharya (1977) Bovine TSH-stimulation of fish thyroid peroxidase activity and role of thyroxine thereon. *Department of Zoology, Visva-Bharati University*, 15,1.
- Champagne, C. y P. Fustier (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2): 184-190.
- Chan H. H. , y , J.G. Eales (1976) Influence of bovine TSH on plasma thyroxine levels and thyroid function in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (mitchill), 28(4): 461–472.
- Chung, K.S., G.J. Holt y C.R. Arnold Influencia de la privación de la dieta y realimentación sobre el crecimiento y la relación ARN-ADN en los juveniles del pez rojo *Sciaenops ocellatus*. *Bol. Inst. Oceanogr.*, 1991, 29:336-344. Clemmenssen, C. Importance and limits of RNA/ DNA ratios as a measure of nutritional condition in fish larvae.

- Chung, K.S., M. Nirchio, G.J. Holt y C.R. Arnold. Ácidos nucleicos en la musculatura blanca y roja del pez rojo *Sciaenops ocellatus*. Bol. Inst. Oceanogr., 1988, 27 (1,2):123-127.
- Churms, S. C., E. H. Merrifield, & A. M. Stephen, (1983). Some new aspects of the molecular structure of Acacia senegal gum (gum arabic). Carbohydrate Research, 123(2), 267e279.
- Clemmesen, C. 1996. Importance and limits of RNA/ DNA ratios as a measure of nutritional condition in fish larvae. In: Survival strategies in early life stages of marine resources (ed. by Watanabe, Y., Yamashita, Y. and Oozeki, Y.) Proceedings of an International Workshop, Yokohama, Japan, 11-14 October 1994. AA. Balkema, Rotterdam, the Netherlands, pp. 67-82.
- Cockson, A. y D. Bourne (1972) Enzymes in the digestive tract of two species of euryhaline fish. Comp. Biochem. Physiol. A 41, 715–718.
- Cockson, A. y D. Bourne (1972) Enzymes in the digestive tract of two species of euryhaline fish. Comp. Biochem. Physiol. A 41, 715–718.
- Colunga T. J. (1996) Inducción al desove del catán (*Lepisosteus spatula*) mediante la aplicación de Gonadotropin Coriónica Humana (HCG). Instituto Tecnológico del Mar, SEP; Boca del Río, Ver.
- Conceicao, L., C. Aragao, N. Richard, S. Engrola, P. Gavaia, S. Mira y J. Dias (2009) Novel methodologies in marine fish larval nutrition. Fish Physiology and Biochemistry, 36: 1-16.
- Conti B, I. Genta, T. Modena, F. Pavanetto. Investigation on process parameters involved in poly lactide-coglycolide microspheres preparation. Drug Dev Ind Pharm 1995;(21):615-22.
- Contreras, S. 1987. Aspectos reproductivos y desarrollo embrionario del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill), en el estado de Tabasco. Resúmenes IX Cong. Nal. Zoología, Villahermosa Tabasco, México.
- Contreras, S. y G. Ruiz (2010) Sistemática y Distribución de Catanes, Pejelagartos y Agujas (Familia Lepisosteidae) en México. En: Mendoza, R., C. Aguilera y Montemayor, J. (Eds.) Biología, Ecología y Avances en el Cultivo del Catán (*Atractosteus spatula*). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. 234 p.
- Dabrowski, K. y D. Culver. 1991. The physiology of larval fish, digestive tract and formulation of starter diets. Aquaculture Magazine, March/April: 49-61.
- De Roth, G. (1973) Effects of temperature and light on aerial breathing behavior of the spotted gar, *Lepisosteus oculatus*. The Ohio Journal of Science 73: 34-41.
- Dean, B. 1895. The early development of gar-pike and sturgeon. Journal of Morphology, 11(1): 1-53.
- Denis R.M., T.S. Mireya, G. M. Nieto, D.A. Villarreal, J.P. Lazo y M.T. Viana. Avances en Nutrición Acuícola IX. Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Dickinson E., D.J. McClements (1996) Advances in Food Colloids.
- Dickinson, E., & S. R. Euston. (1991). Stability of Food Emulsions containing both protein and polysaccharide. In: E. Dickinson (Ed.), Food polymers gels and colloids (pp. 132–146). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

- Dickinson, E., D. J. Elverson & B. S. Murray. (1989). On the filmforming and emulsion-stabilizing properties of gum arabic: dilution and flocculation aspects. *Food Hydrocolloids*, 3, 101–114.
- Dickinson, E., V. B. Galazka & D. M. W Anderson (1991a). Emulsifying behavior of gum arabic. 1. Effect of the nature of the oil phase on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydrate Polymers*, 14(4), 373e383.
- Dickinson, E., V. B. Galazka & D. M. W Anderson (1991a). Emulsifying behavior of gum arabic. 1. Effect of the nature of the oil phase on the emulsion droplet-size distribution. *Carbohydrate Polymers*, 14(4), 373e383.
- Dixon, M. y E. Webb (1979) *Enzymes*. 3a edición, Academic Press. New York.
- Dutta, P., S. Tripathi, G. Mazutti and J. Dutta. 2009. Review: Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Journal Food Chemistry* 114(4): 1173–1182.
- Dziezak JD. (1988) Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol.* 42(4):136-51.
- Eales, J. y S. Brown (1993) Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 3: 299-347.
- Eddy, S. 1957. In: *The freshwater fishes*. WM. C. Brown Company, Dubuque, Iowa. 10-24.
- Ehrlich, K.F. Chemical changes during growth and -starvation of herring larvae. In: Blaxter, J.H. Eds. *The early life history of fish*. Springer-Verlag, Berlin, 1974, pp.301-323.
- Fagerlund U,H,M,, I. McCallum, D,A. R,J. Higgs, M,D. McBride, Plotnikoff & B,S Dosanjh (1984) Diet composition as a factor in the anabolic efficacy of 3,5,3'-triiodo-Lthyronine administered orally to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 36, 49-59.
- Fang, L.S. y S.F. Chiou (1989) Effect of salinity on the activities of digestive proteases from the tilapia fish, *Oreochromis niloticus* in different culture environments. *Comp. Biochem. Physiol. A* 93, 439–443.
- Fang, L.S. y S.F. Chiou (1989). Effect of salinity on the activities of digestive proteases from the tilapia fish, *Oreochromis niloticus* in different culture environments. *Comp. Biochem. Physiol. A* 93, 439–443.
- FAO (2004). *Estado de la Pesca Mundial y la Acuicultura 2004* (ROMA: FAO).
- FAO/PNUMA, 1984. *Conservación de los recursos genéticos de los peces: Problemas y recomendaciones*. Informe de la consulta de expertos sobre los recursos genéticos de los peces. FAO. Doc. Tec. Pesca,(217): 42p.
- Farbridge K,R, & J,F Leatherland, (1988) Interaction between ovine growth hormone and triiodo-L-thyronine on metabolic reserve of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiology and Biochemistry* 5, 141-151.
- Ferrara, A. (2001) *Life-history strategy of Lepisosteidae: Implications for the conservation and management of alligator gar*. Ph.D. dissertation, Auburn University, United States – Alabama. 126 p.
- Ferrara, A. M. 2001. *Life-history strategy of Lepisosteidae: Implications for the conservation and management of alligator gar*. Doctoral dissertation. Auburn University, Auburn, Alabama.



- Ferron, A. y W. Leggett (1994) An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Advances in Marine Biology*, 30: 217-303.
- Fish, G.R. (1960) The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of tilapia and perch. *Hydrobiology* 15, 161–178.
- Fish, G.R. (1960) The comparative activity of some digestive enzyme in the alimentary
- Fuchs, M., C. Turchiuli, M. Bohin, M. Cuvelier, C. Ordonnaud, M. Peyrat and E. Dumoulin. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* 75(1): 27-35.
- Fukuda, M., H. Sako, T. Shigeta y R. Shibata. 2001. Relationship between grow and biochemical indices in laboratory-reared juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), and its application to wild fish. *Marine Biology*, 138: 47-55.
- Galindo S., Alle´mann E., Fessi H. y Eric Doelker (2004) Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharmaceutical Research*, Vol. 21, No. 8.
- García J., J. A. Arias y P. E. Cruz (2004) Efectos de la administración preovulatoria de triiodotironina (T3) sobre el desempeño reproductivo y desarrollo larvario en yamú *brycon siebenthalae*. *Orinoquia*, vol. 8, núm. 1, 2004, pp. 57 – 63.
- Garti N. (1997) Double emulsions scope, limitations and new achievements. Elsevier. Volumes 123–124 Pages 233–246.
- Garti, N. (1999). Hydrocolloids as emulsifying agents for oil-in-water emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 20, 327– 355.
- Gilbert, C. R., and J. D. Williams. 2002. In: National Audubon Society field guide to fishes. Chanticleer Press, New York, New York.
- Goodger, W. P. y T. A. Burns (1980) The cardiotoxic effects of alligator gar (*Lepisosteus spatula*) roe on the isolated turtle heart. *Toxicol* 18:489-494.
- Goodyear, C. P. (1966) Distribution of gars on the Mississippi coast. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences* 12:188-192.
- Goodyear, C. P. 1967. Feeding habits of three species of gars, *Lepisosteus*, along the Mississippi Gulf coast. *Transactions of the American Fisheries Society* 96:297-300.
- Gorbman et al. *Comp. Endocrinology*. John Wiley & Sons, NY (1983); Norris. *Vertebrate endocrinology*. Academic Press, San Diego (1997).
- Gouin S. (2004) Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*. 15,330–347.
- Govoni, J.J. (1980) Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev.Can. Biol.*39, 69-80.
- Grant, G.C. 1996. RNA-DNA ratios in white muscle tissue biopsies reflect recent growth rates of adult brown trout. *Journal of Fish Biology*, 48: 1223-1230.
- Gross J, R. Pitt-rivers (1954). Triiodothyronine in relation to thyroid physiology. *Rec Prog Horm Res* 10:109–128.
- Gudernatsch, J.F. 1911. The thyroid gland of the teleosts. *J. Morph.* 21: 709-782.
- Handley. *Endocrinología*, 4ª edición. Prentice Hall, ed. Simon and Schuster Int. Group (1997).

- Higgs D,A, Dosanjh B,S, L,M. Uin, B,A. Himick & J,G. Eales (1992). Effect of dietary lipid and carbohydrate levels and chronic 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine treatment on growth, appetite, food and protein utilization and body composition of immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. at low temperature, *Aquaculture* 105, 175-190.
- Higgs D,A, U,H,M. Fagerlund, J,G. Eales & J,R. McBride (1982).Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73B, 143-176.
- Higgs D,A,, U,H,M. Fagerlund, J,G. Eales & J,R. McBride, (1982). Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73B, 143-176.
- Higgs D. A., U. H. M. Fagerlund, J. R. McBride y J. G. Eales (1979) Influence of orally administered L-thyroxine or 3,5,3'- triiodo-L-thyronine on growth, food consumption, and food conversion of underyearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Zoology*. 57(10): 1974-1979.
- Hill, L. G., J. L. Renfro, and R. Reynolds. 1972. Effects of dissolved oxygen tensions upon the rate of aerial respiration of young spotted gar, *Lepisosteus oculatus* (Lepisosteidae). *Southwestern Naturalist* 17:273-278.
- Hirji, K.N. y W.A.M. Courtney (1982) Leucine aminopeptidase activity in the digestive tract of perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Biol.* 21, 615-622.
- Holloway, A. (1954) Notes on the life history and management of the shortnose and longnose gars in Florida waters. *Journal of Wildlife Management*, 18(4): 440-449.
- Houlihan, D., E. Mathers y A. Foster. 1993. Biochemical correlates of growth rate in fish. In: *Fish Ecophysiology* (ed. by J. Cliff and B. Jensen) pp. 45-71. Chapman and Hall, London. pp.421.
- Hsu, J.-H. and G.A. Brent. 1998. Thyroid hormone receptor gene knockouts. *Trends Endocrinol. Metabol.* 9: 103-112.
- <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab491s/ab491s02.htm>.
- Huyghebaert N, Vermeire A, Rottiers P, Remaut E, Remon JP. Development of an enteric-coated, layered multi-particulate formulation for ideal delivery of viable recombinant *Lactococcus lactis*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 61: 134-141.
- Ibarra M., Baéz J., Alanis M., Amaya C., García C. y Rodríguez H. (2012) Protección de la degradación de polifenoles hidrosolubles del frijol negro Jamapa (*Phaseolus vulgaris*) con emulsiones múltiples W1/O/W2. Departamento de Alimentos, FCB, UANL, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.
- Inui, Y. y S. Miwa (1985) Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60: 450- 454.
- Inui, Y., M. Tagawa, S. Miwa y T. Hirano (1989) Effects of bovine TSH on the tissue thyroxine level and metamorphosis in prometamorphic flounder larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 74: 406-410.

- Islam, A. M., Phillips, G. O., Sljivo, A., Snowden, M. J., & P. A. Williams. (1997). A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 11, 493–505.
- John Wiley & Sons, NY (1983); Norris. *Vertebrate endocrinology*. Academic Press, San Diego.
- Kang Y. y Y.J. Chang (2005). Development of Thyroid Follicles and Changes in Thyroid Hormones During the Early Development of Korean Rockfish *Sebastes schlegelii*. *Journal of the World Aquaculture Society*. Volume 36, No. 2.
- Kaplan, L., J. Leamon y J. Crivello (2001) The Development of a Rapid and Sensitive, High-Through-Put Protocol for RNA:DNA Ratio Analysis. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13: 276-279.
- Katagiri, T., C. Kidd, E. Tomasino. et al. 2005. A BAC-based physical map of the Nile tilapia genome. *BMC Genom.* 6, 89.
- Kawashina Y, H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino, T. Niwa. Properties of a peptide containing DL lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur J Pharm Biopharm* 1998;45(1):41-8.
- Kendall EC (1915) The isolation in crystalline form of the compound containing iodine which occurs in the thyroid: its chemical nature and physiological activity. *Trans Assoc Am Physicians* 30:420–449.
- Khalil N. A., M. M. Hassan, A. Khalaf y M. A. Mousa (2011).
- Kocher, T. D., W.-J.Lee, H. Sobolewska, D. Penman, & B. McAndrew,. 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics* 148, 1225–1232.
- Kucera SA, Stimpel D, Navnit H, Shah NH, Malick AW, Infeld MH, McGinity JW. Influence of Fumed Silicon Dioxide on the Stabilization of Eudragit RS/RL 30 D Film-Coated Theophylline Pellets. *Pharm. Dev. Tech.* 2008; 13: 245-253.
- Kühl P y J. Mielck. Tableting of pellet-matrix systems: ability of parameters from dynamic and kinetic models to elucidate the densification of matrix formers and of pellets. *Int. J. Pharm.* 2002; 248(1-2): 101-114.
- Kumar A, N. Swarup & D. Singh (1991).Effect of thyroxine administration on growth and morphological parameters of larvae of *Cyprinus carpio* (Linn.), *Journal of Agricultural and Scientific Research* 33, 86-92.
- Kunz, Y. W. 2004. *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Springer, Dordrecht.
- Kunz, Y. W. 2004. *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Springer, Dordrecht.
- Kuz'mina, V.V., A.G. Gelman (1997) Enzyme linked-digestion in fish. *Rev. Fish. Sci.* 5, 99–129.
- Lam T,J, (1980) Thyroxine enhances larval development and survival in *Sarotherodon* (*Tilapia*) *mossambicus* Ruppell, *Aquaculture* 2 1 , 287-291.
- Lam T.J. & R. Sharma. (1985) Effects of salinity and thyroxine on larval survival growth and development in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 44, 201-212.

- Lam T.J. (1994) Hormones and egg/larval quality in fish. *Journal of World Aquaculture Society* 25, 2—12.
- Lam T.J., J.V. Juario y J. Banno (1985) Effect of thyroxine on growth and development in post-yolk-sac larvae of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture*, 46 (3):179–184.
- Lam, T.J. 1980. Thyroxine enhances larval development and survival in *Sarotherodon (Tilapia) mossambicus*. *Ruppel. Aquaculture* 21: 287-291.
- Lam, T.J. y R. Sharma (1985) Effects of salinity and thyroxine on larval survival, growth, and development in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 44: 201-212.
- Lam, T.J., Juario, J.V. y J. Banno (1985) Effect of thyroxine on growth and development in post-yolk-sac larvae of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture* 46: 179-184.
- Landines A, A. I. Sanabria, J. A. Senhorini y E. C. Urbinati. (2010) The influence of triiodothyronine (T3) on the early development of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) *Fish Physiol Biochem* 36:1291–1296.
- Lauf M. and R. Hoffer (1984) . Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes . *Aquaculture* 37 : 335 – 346.
- Lauf, M. y R. Hoffer. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37: 335-346.
- Lazo , J. , G. Holt y C. Arnold , (2000a) Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum ( *Sciaenops ocellatus* ) . *Aquaculture Nutrition* 6: 183 – 192.
- Lazo , J.P., R. Mendoza y G.J. Holt et al. 2007 . Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum ( *Sciaenops ocellatus* ) . *Aquaculture* 265 : 194 – 205.
- Lazo J., M. Darias y E. Gisbert (2011) Ontogeny of the digestive tract. *Larval Fish Nutrition*, First Edition. Edited by G. Joan Holt.
- Lee S, M. Kim, S. Jun, J-S.Park, S-J. Huang, Preparation of controlled release spheronization process. *Arch. Pharm. Res.* 2005; 28(5): 619-625.
- Lee, B. Y., D. J. Penman, & T. D. Kocher. 2003. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. *Anim. Genet.* 34: 379– 383.
- Lemieux H., P. Blier y J.D. Dutil (1999) Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiol Biochem* 20:293–303.
- Li Jun-sheng Æ Li Jian-lin Æ Wu Ting-ting, 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid Juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* · *Oreochromis aureus*) Springer Science+Business Media B.V. 2006.
- Li, B., L. Wang, D. Li, B. Bhandari, S. Jun, Y. Lan, X. Chen and Z. Mao. 2009. Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. *Journal of Food Engineering* 92(3): 250–254.
- Lira C. (2009) Utilidad de algunos copolímeros acrílicos para el control de liberación de fármacos en pelets matriciales elaborados por extrusión-esferonización. Universidad de Santiago de Compostela.

- Llewellyn, L., M.A. Nowell, V.P. Ramsurn, T. Wigham, G.E. Sweeney, B. Kristjánsson and Ó. Halldórsson. 1999. Molecular cloning and developmental expression of the halibut thyroid hormone receptor-. *J Fish Biol (Suppl A)* 55: 148-155.
- Love, J. (2004) Age, growth and reproduction of spotted gar, *Lepisosteus oculatus* (Lepisosteidae), from the lake Ponchartraine estuary, Louisiana. *Southwestern Naturalist*, 49(1): 18-23.
- Love, J. W. 2002. Sexual dimorphism in spotted gar *Lepisosteus oculatus* from southeastern Louisiana. *American Midland Naturalist* 147:393-399.
- Luo, H. and C. Pozrikidis. 2009. Numerical simulation of particle encapsulation due to liquid thread breakup. *Computers and Fluids* 38(3): 564–571.
- M D Ansal K Kaur (1998) Relative efficacy of dietary administration of 3,5,3'-triiodothyronine (T3) to different stages of an Indian major carp, *Cirrhina mrigala* (Hamilton): growth and economics. *Aquaculture Research*, 1998, 29, 835-841.
- M. en C. Carlos Alfonso Alvarez González (2003) actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *paralabrax maculatofasciatus* (percoidei: serranidae). la paz, baja california sur. instituto politécnico nacional Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Madene, A., J. Scher, and S. Desobry. 2006. Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 4(1):1-21, 2006.
- Majumdar, K. C. & B. J. McAndrew. 1986. Relative DNA content of somatic nuclei and chromosomal studies in three genera, *Tilapia*, *Sarotherodon*, and *Oreochromis* of the tribe Tilapiini (Pisces, Cichlidae). *Genetica* 68, 175–188.
- McClements D. J. (2005) *Food Emulsion: Principles, Practice and Techniques*.
- McConnell, S. K., C. Beynon, L. Leamon, & D. O. Skibinski, 2000. Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. *Anim. Genet.* 31, 214–218.
- McCormack, B. (1967) Aerial respiration in the Florida spotted gar. *Quarterly Journal of the Florida metabolism of gars (Lepisosteus)*. *The Southwestern Naturalist* 15:45-54.
- Melamed, P., H. Rosenfeld, A. Elizur, & Z. Yaron, 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119, 325–338.
- Mendoza R., C. Aguilera y L. Carreon (2002) Ácidos nucleicos para evaluar la condición de larvas de peces. *Ciencia- UANL* 5, 211-217.
- Mendoza R., C. Aguilera y L. Carreón (2002). Ácidos nucleicos para evaluar la condición de larvas de peces. *Ciencia UANL Vol.V, No. 2*.
- Mendoza R., C. Aguilera, L. Carreon, J. Montemayor & M. Gonzalez (2007) Weaning of alligator gar (*Atractosteus spatula*) larvae to artificial diets. *Aquaculture Nutrition* 13,1-9.
- Mendoza R., C. Aguilera, L. Carreon, J. Montemayor y M. Gonzalez (2007) Weaning of alligator gar (*Atractosteus spatula*) larvae to artificial diets. *Aquaculture Nutrition* 13,1-9.
- Mendoza, R. y C. Aguilera (2001) Bases Fisiológicas del Desarrollo de Larvas de *Atractosteus spatula* y Perspectivas para su Cultivo. *Ciencia UANL*, 4(2): 161-168.

- Mendoza, R. y C. Aguilera (2008) Estrategias de Alimentación para el Cultivo de Larvas de Catán (*Atractosteus spatula*). *Ciencia UANL*, 11(4): 366-376.
- Mendoza, R. y C. Aguilera (2008) Estrategias de Alimentación para el Cultivo de Larvas de Catán (*Atractosteus spatula*). *Ciencia UANL*, 11(4): 366-376.
- Mendoza, R., C. Aguilera, G. Rodríguez, G. Márquez, 2000c. Estrategias para la domesticación de especies en acuicultura: El catán (*Atractosteus spatula*). In: *Redes Nacionales de Investigación en Acuicultura, Memorias de la V Reunion* (ed. by Alvarez Torres, Ramírez-Flores, Torres-Rodríguez y Mora-Cervantes), pp. 95-102. Instituto Nacional de Pesca-SEMARNAP. Distrito Federal, México.
- Mendoza, R., C. Aguilera, J. Montemayor, G. Rodríguez, y G. Márquez. 2000a. Biología de los lepisosteidos y estudios orientados hacia la recuperación de las poblaciones naturales del catán (*Atractosteus spatula*) (Lacepède, 1803). In: *Redes nacionales de investigación en acuicultura, Memorias de la IV Reunión P.* (ed. by Álvarez, Guzmán, M., Contreras, S. y Silva, A.), pp. 103-120. SEMARNAP, Instituto Nacional de la Pesca. Distrito Federal, México.
- Mendoza, R., C. Aguilera, V. Ruiz, F. García-Carreño, H. Nolasco, J. Montemayor y G. Rodríguez. 2000d. Enzyme ontogenetic larval development of the alligator gar *Atractosteus spatula* in México: Perspectives for its culture. *World Aquaculture Society*. New Orleans, USA. Feb, 2000. pp.219.
- Mendoza, R., C. Aguilera, y J. Montemayor (2010) *Biología, Ecología y Avances en el Cultivo de Catán (Atractosteus spatula)*. UANL: Monterrey, México.
- Miller T.C., D.Mckenzie, J.T. Jaques y M.L. Delovio (2010) Biological activity of mammalian thyrotropins in goldfish. *Society for Integrative and Comparative Biology*. Dept. of Biology, Texas AM University.
- Milne R. S. y J. Leatherland (1978) Effect of Ovine TSH, Thiourea, Ovine Prolactin and Bovine Growth Hormone on Plasma Thyroxine and Tri Iodothyronine Levels in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *comp. Physiol.* 124, 105-110.
- Miwa, S. y Y.Inui, 1987. Effects of various doses of thyroxine and triiodothyronine on the metamorphosis of flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 67: 356-363.
- Miwa, S., K. Yamano y Y. Inui (1992). Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis. *J. Exp. Zool.* 261: 424-430.
- Morales, G. (1987) Reproducción y desarrollo embriológico del catán (*Lepisosteus spatula* Lacepede): Primeros resultados. SEPES. Dirección General de Acuicultura. pp. 41-70.
- Morales, G. (1987) Reproducción y desarrollo embriológico del catán (*Lepisosteus spatula* Lacepede): Primeros resultados. SEPES. Dirección General de Acuicultura.
- Moriarty, D.J.W. (1973) The physiology of digestion of blue-green algae in the cichlid fish, *Tilapia nilotica*. *J. Zool. \_London.* 171, 25–39.
- Moriarty, D.J.W. (1973) The physiology of digestion of blue-green algae in the cichlid fish, *Tilapia nilotica*. *J.Zool. \_London.* 171, 25–39.

- Morrison, C. M., T. Miyake, & J. R. Wright, 2001. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *J. Morphol.* 247, 172–195.
- Morrison, C., T. Miyake y J. Wright (2001) Histological study of the development of the embryo and early larva of (*Oreochromis niloticus*) (Pisces: Cichlidae). *J. Morphol.* 247, 172–195.
- Moss, S.M. Use of nucleic acids as indicators of growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Marine Biology* 1994, 120:359-367.
- Moustafine R.I., M. Zaharov, V. Kemenova. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit E PO/Eudragit L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2006; 63(1): 26-36.
- Moustafine RI, Zaharov IM, Kemenova VA. Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit E PO/Eudragit L 100-55 interpolyelectrolyte complexes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2006; 63(1): 26-36.
- Moyano, F., M. Diaz, F. Alarcon y M. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(2): 121- 130.
- Moyano, F., M. Diaz, F. Alarcon y M. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(2): 121- 130.
- Mura P, F. Maestrelli, M. Cirri, M. Gonzalez, A. Rabasco. Development of Enteric-coated Pectin-based Matrix Tablets for Colonic Delivery of Theophylline. *J. Drug Target.* 2003; 11(6): 365-371.
- Nacario J.F. (1983) The effect of thyroxine on the iarvae and fry of *Sarotherodon niloticus* L. (*Tilapia nilotica*). *Aquaculture* 34, 73-83.
- Nacario, J.F. (1983) The effect of thyroxine on the larvae and fry of *Sarotherodon niloticus* L. (*Tilapia nilotica*). *Aquaculture* 34: 78-83.
- Nagase, G. (1964) Contribution to physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters: digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Z. Vergl. Physiol.* 49, 270–284.
- Nagase, G. (1964) Contribution to physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters: digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Z. Vergl. Physiol.* 49, 270–284.
- Netch, M. 1964 Food and feeding habits of longnose gar in Central Missouri. In: The 18th Annual Conference of the Southeastern Association of Game and Fish Commisioners, Florida, pp: 506-511.
- Nishioka R. S., E. Gordon, V. Khiet y H. Bern (1987)Effect of thyroid-stimulating hormone on the physiology and morphology of the thyroid gland in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* *Fish Physiology and Biochemistry* vol. 3 no. 2 pp 63-71.
- Norris: *Vertebrate Endocrinology*, (2nd ed.), Lea & Febiger, 1997 Academic Press, San Diego.
- Northcott, M.M.; C.M. Beveridge & L.G. Ross 1992. A laboratory investigation of the filtration and ingestion rates of the tilapia, *Oreochromis niloticus*, feeding on two species of blue green algae. *Environmental Biology of Fishes* 31: 75-85.

- O'Connell, C.P. (1976) Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. *Exp. Mar. Biol. Ecol.* 25, 285-312.
- Oliveira, C. & J. Wright, 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Res.* 6, 205– 211.
- Ostrand, K. G., B. J. Braeutigam, and D. H. Wahl. 2004. Consequences of vegetation density and prey species on spotted gar foraging. *Transactions of the American Fisheries Society* 133:794-800.
- Ostrand, K. G., B. J. Braeutigam, and D. H. Wahl. 2004. Consequences of vegetation density and prey species on spotted gar foraging. *Transactions of the American Fisheries Society* 133:794-800.
- Palzer, S. 2009. Review: Food structures for nutrition, health and wellness. *Trends in Food Science and Technology* 20(5): 194-200.
- Pedroza, R. (2002). Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuícolas. *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. México.
- Person-Le Rouyet, J. 1990. Early weaning of fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. In: *Advances in tropical Aquaculture, Aquacop- IFREMER, Actes de Colloque 9*, pp 625-642.
- Pfeiffer, C. A (1933) The anatomy and blood supply of the urogenital system of *Lepisosteus platystomus* Rafinesque. *Journal of Morphology* 54(3):459-475.
- Pimentel-González, *et al.*, 2008 XVIII International Conference on Bioencapsulation.
- Poelvoorde N, Huyghebaert N, Vervaet C, Remon J-P. Optimisation of an enteric coated, layered multi-particulate formulation for ideal delivery of viable recombinant *Lactococcus lactis*. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 69(3): 969-76.
- Polímeros Acrílicos para Formas Farmacéuticas Sólidas Orales. Evonik Industries AG Pharma Polymers. [www.evonik.com](http://www.evonik.com).
- Potter, G. E. 1925. The swim-bladder of a 65 mm gar-pike (*Lepidosteus platystomus*).
- Power, D., L. Llewellyn, M. Faustino, M. Nowell, B. Björnsson, I. Einarsdottir, A. Canario y G. Sweeney (2001) Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130: 447-459.
- Raine, J., A. Takemura y J. Leatherland ( ) The development of the thyroid gland in teleostean embryos: historical perspectives Department of Biomedical Sciences, Ontario Veterinary College.
- Raine, J.C. and J.F. Leatherland. 1999. Ontogeny of thyroid tissue and tissue thyroid hormone clearance in rainbow trout embryos reared at two temperatures. *Fish Physiol. Biochem.* 20: 209-217.
- Raine, J.C. and J.F. Leatherland. 2000. Morphological and functional development of the thyroid tissue in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Cell Tiss. Res.* (In press).



- Ramos D., M. Gómez, D. Fernández y L. Núñez (2000) Microesferas Biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Rev Cubana Farm* 34(1):70-7.
- Randall, R. C., G. Phillips, & P. Williams, (1988). The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 2, 131–140.
- Randall, R. C., Phillips, G. O., & Williams, P. A. (1988). The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 2, 131–144.
- Reddy P.K. & T. Lam, (1992b) Effect of thyroid hormones on morphogenesis and growth of larvae and fry of telescopic-eye black gold fish. *Carassius auratus*. *Aquaculture* 107, 383-394.
- Reddy P.K., C. Brown, J. Leatherland & T. Lam (1992) Role of thyroid hormones in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*): 11. Changes in the hormone and 5'- monodeiodinase activity during development. *Fish Physiology and Biochemistry* 9, 487-496.
- Reddy P.K., C. Brown, J. Leatherland & T. Lam, (1992) Role of thyroid hormones in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*): 11. Changes in the hormone and 5'- monodeiodinase activity during development. *Fish Physiology and Biochemistry* 9, 487-496.
- Reddy, P. K., C. Brown, J. Leatherland, & T. Lam, 1992. Role of thyroid hormones in tilapia larvae (*Oreochromis*).
- Reddy, P., C. Brown, J. Leatherland y T. Lam (1992) Role of thyroid hormones in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). II. Changes in the hormones and 5'- monodeiodinase activity during development. *Fish Physiol. Biochem.* 9, 487–496.
- Redmond, L.C. 1964. Ecology of the spotted gar (*Lepisosteus oculatus winchell*) in southeastern Missouri. Master's Thesis. University of Missouri, Columbia, Missouri.
- Redmond, L.C. 1964. Ecology of the spotted gar (*Lepisosteus oculatus winchell*) in southeastern Missouri. Master's Thesis. University of Missouri, Columbia, Missouri.
- Refstie T. (1982) The effect of feeding thyroid hormones on saltwater tolerance and growth rate of Atlantic salmon. *Canadian Journal of Zoology* 60, 2706-2712.
- Renfro, J. L., and L. G. Hill. 1970. Factors influencing the aerial breathing and.
- Rodney G. J. y M. Sage (1973) A comparison of the effects of mammalian TSH on the thyroid glands of the teleost *Galeichthys felis* and the elasmobranch *Dasyatis Sabina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. Volume 44, Issue 3. Pages 867–870.
- Rodriguez, M., M. Palacios y R. Cruz (1994) Atlas pesquero de México. SEPES. INP.
- Rojas, P., R. Mendoza, 2000. El cultivo de especies natives en México. In: Estado de salud de la acuicultura (ed. by .. Alvarez-Torres, P.). pp. 431-476. Instituto Nacional de la Pesca, Secretaria de Recursos Naturales y Pesca. Distrito Federal, Mexico.
- Rooker, J. 1997. Early life history of Red drum (*Sciaenops ocellatus*) in subtropical seagrass meadows: patterns of condition, growth, and mortality. Ph.D. Dissertation. Faculty of the Graduate School of the University of Texas at Austin. Pp. 191.
- Rosas, M. (1976) Peces dulceacuícolas que se explotan en México y datos sobre su biología. INP/Subsecretaría de Pesca.
- Ross, S. T. (2001) *Inland fishes of Mississippi*. University Press of Mississippi, Jackson, Mississippi.

- Rotllant G., F.J. Moyano, M. Andrés, M. Díaz, A. Estévez y E. Gisbert (2008) Evaluation of fluorogenic substrates in the assessment of digestive enzymes in a decapod crustacean *Maja brachydactyla* larvae. *Aquaculture*, 282: 90–96.
- Rowe RC, PJ Sheskey, SC Owen. Handbook of Pharmaceutical Excipients. eds. American Pharmaceutical Association. 5 ed.: Pharmaceutical Press, Washington, 2006.
- Ruiz, V. 2000. Caracterización bioquímica de las principales enzimas digestivas del catán (*Atractosteus spatula*). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N. L., 76 pp.
- Sadleir, R. M. F. S. (1973) The reproduction of vertebrates. Academic Press, New York.
- Sáez V., E. Hernández, L. Sanz Angulo, I. Katime. (2004) Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Volumen 5(2).
- SAGARPA (2011). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2011. [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_anuario\\_estadistico\\_de\\_pesca](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca)
- Sanderson, S. L. & S. Kupferberg, 1999. Development and evolution of aquatic larval feeding mechanisms. In: *The Origin and Evolution of Larval Forms* (eds B. K. Hall & M. H. Wake), pp. 301–377. Academic Press, San Diego, California.
- Santini, S. & G. Bernardi, 2005. Organization and base composition of tilapia Hox genes: implications for the evolution of Hox clusters in fish. *Gene* 346, 51–61.
- Sarath, G., R. de la Motte y F. Wagner (1989) Protease assay methods. En: Beynon, R. y J. Bond (Ed.) *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University Press. Nueva York, EUA. 259 p.
- Savary, G., N. Hucher, E. Bernadi, M. Grisel, & C. Malhiac, (2010). Relationship between the emulsifying properties of Acacia gums and the retention and diffusion of aroma compounds. *Food Hydrocolloids*, 24(2e3), 178e183.
- Scarneccia, D. L. 1992. A reappraisal of gars and bowfin in fishery management. *Fisheries* 17(5):6-12.
- Seale, A. P., L. Riley, T. Leedom, et al. 2002. Effects of environmental osmolality on release of prolactin, growth hormone and ACTH from the tilapia pituitary. *General Comp. Endocrinol.* 128, 91–101.
- Seifriz, W. (1925). Studies in emulsions IV. Multiple systems. *Journal of Physical Chemistry*, 29, 744-746.
- SEMARNAT (2004) Carta Nacional Pesquera. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, México. 128 p.
- Shambaugh, G.E. III. 1986. Thyroid hormone action: biologic and cellular effects. In *The Thyroid*. pp. 201-218. Edited by S.H. Ingbar and L.E. Braverman. Lippincott, Philadelphia.
- Siepmann F, Siepmann J, Walther M, MacRae RJ, Bodmeier R. Blends of aqueous polymer dispersions used for pellet coating: Importance of the particle size. *J. Control. Rel.* 2005; 105(3): 226-239.

- Simon, T.P. y E.J. Tyberghein. 1991. Contributions to the early life history of the spotted gar, *Lepisosteus oculatus* Winchell, from Hatchet Creek, Alabama. *Transactions of the Kentucky Academy of Science*, 52(3-4): 124-131.
- Snedden, G. A., W. E. Kelso, and D. A. Rutherford (1999) Diel and seasonal patterns of spotted gar movement and habitat use in the lower Atchafalaya River Basin, Louisiana. *Transactions of the American Fisheries Society* 128:144-154.
- Snedden, G. A., W. E. Kelso, and D. A. Rutherford. 1999. Diel and seasonal patterns of spotted gar movement and habitat use in the lower Atchafalaya River Basin, Louisiana. *Transactions of the American Fisheries Society* 128:144-154.
- Soriano I, A. R. Delgado, C. Díaz, Evora. Use of surfactans in polylactic acid protein microspheres. *Drug Dev Ind Pharm* 1995;(21):549-58.
- Steinhart, M. and Eckmann R. Evaluating the nutrition of individual whitefish (*Coregonus* spp.) larvae by the RNA/DNA ratio. *J. Fish Biol.*, 1992, 40-791-799.
- Street, C. A., & D. M. W. Anderson, (1983). Refinement of structures previously proposed for gum arabic and other Acacia gum exudates. *Talanta*, 30(11), 887e893.
- Stroud, R. 1975. A family of proteins-cutting proteins. *Sci. Am.* 231, 74-89.
- Subburaju, S., L. S. C. Wanand y T. J. Lam (1998), Effect of administering sustained-release thyroxine microparticles on reproductive performance and egg quality in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) broodstock. *Journal of Applied Ichthyology*, 14: 233–237.
- Suttkus, R. D. (1963). Fishes of the western North Atlantic: Soft-rayed fishes. Order Lepisosteii. *Memoirs of the Sears Foundation for Marine Research* I. H. B. Editors Bigelow, and W. C. Schroeder. Pages 61-88.
- Swapna I. y B. Senthilkumaran 2007. Thyroid hormones modulate the hypothalamo–hypophyseal–gonadal axis in teleosts: Molecular insights *Fish Physiol Biochem* (2007) 33:335–345.
- Tachichara K. (1997) Improved Seed Production of Goldstriped Amberjack *Seriola lalandi* under Hatchery Conditions by Injection of Triiodothyronine (T3) to Broodstock Fish. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 28, No.1.
- Tagawa M., S. Miwa, Y. Inui de E. Jesus & T. Hiran. (1990a) Changes in thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis of the flounder. *Paralichthys olivaceus*. *Zoological Science* 7, 93- 96.
- Tengjaroenkul (2000) Ontogenic Morphology and enzyme activities of the intestinal ontogenic morphology and enzyme activities of the intestinal tract of the Nile tilapia. *Oreochromis niloticus*. PhD Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia, 161 pp.
- Tengjaroenkul B., J.S. Bonnie y T. Caceci (2000) Stephen A. Smith .Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 182 \_ 317–327.
- Tengjaroenkul B., J.S. Bonnie, A. Stephen, B. Smith, U. Chatreewongsin. Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 211 (2002) 241–251.

- Tengjaroenkul, B., B.J. Smith, S.A. Smith y U. Chatreewongsin (2002) Ontogenic development of intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 211, 241-251.
- The effect of maternal thyroxine injection on growth, survival and development of the digestive system of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, larvae *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2011, 2, 320-329.
- Tian L., Y. Zhang, X. Tang .Sustained-release pellets prepared by combinant of wax matrices and doublé-layer coating of extremely wátersoluble drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2008; 34: 569-576.
- Trewavas, E. 1983. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. *British Mus. Nat. Hist.*, London, UK. 583 pp.
- Tyler, J. D., and M. N. Granger. 1984. Notes on food habits, size, and spawning behavior of spotted gar in Lake Lawtonka, Oklahoma. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Sciences* 64:8-10.
- Ueberschär, B.F. 1985. Experiments on the development of proteolytic enzyme activity in turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) *International Council for the Exploration of the Sea*. pp. 1-10.
- Valero J., M. Egea, M. Alsina, M. García. *Sistemas poliméricos de administración de fármacos*. 1985; (sept-oct):93-100.
- Verbeken, D., S. Dierckx, & K. Dewettinck, (2003). Exudate gums: occurrence, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(1), 10e21.
- Verreth, J.A. y T. Van Tongeren. 1989. Weaning time in *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. *Aquaculture*, 83: 81-88.
- Verreth, J.A., E. Torrele, E. Spazier, A. Van Der Sluiszen, J. Rombout, R. Booms y H. Segner. 1992. The development of a functional digestive system in the african catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of the World Aquaculture Society*, 23 (4): 286-298.
- Villamizar, L; Martinez, F. “Determinación de las conficiones de microencapsulación de un baculovirus entomopatógeno mediante coacervación con eudragit s100” *Vitae* (2008) 15: 123-131 N1.
- Walford, J. y T.J. Lam. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 109: 187-205.
- Walpitaa C. N., S.V. Geytena, E. Rurangwab y V. Darras. 2007. The effect of 3,5,3'-triiodothyronine supplementation on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development and expression of iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors. *General and Comparative Endocrinology*. Volume 152, Issues 2–3, Pages 206–214.
- Watanabe Y., Y. Yamashita. and Y.Oozeki. Survival strategies in early life stages of marine resources., *Proceedings of International Workshop, Yokohama, Japan*, A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, 1996, pp. 67-82.
- Weatherley A.H. & H.S Gill. (1987) Influence of hormones. In: *The Biology of Fish Growth* (ed. by A. H. Weatherley & H. S. Gill), pp. 177-206. Academic Press. New York. NY.

- Weatherley A.H. & H.S. Gill (1987) Influence of hormones. In: *The Biology of Fish Growth* (ed. by A. H. Weatherley & H. S. Gill), pp. 177-206. Academic Press. New York. NY.
- Westerman, M.E. and G.J. Holt .The RNA-DNA ratios: measurement of nucleic acids in larval *Sciaenops ocellatus*. *Contributions to Marine Sciences Suppl.*, 1988, 30:117-124.
- Westerman, M.E. y G.J. Holt. 1988. The RNA-DNA ratios: measurement of nucleic acids in larval *Sciaenops ocellatus*. *Contributions to Marine Sciences*, 30: 117-124.
- Westerman, M.E. y G.J. Holt. 1988. The RNA-DNA ratios: measurement of nucleic acids in larval *Sciaenops ocellatus*. *Contributions to Marine Sciences*, 30: 117-124.
- Wright, P. A. & M. D. Land, 1998. Urea production and transport in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 119, 47–54.
- Yamano, K. (2005) The Role of Thyroid Hormone in Fish Development with Reference to Aquaculture. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 39(3): 161-168.
- Yamano, K. and S. Miwa 1998. Differential gene expression of thyroid hormone receptor and in fish development. *Gen Comp Endocrinol* 109: 75-85.
- Yañez, J., J. Salazar, L. Chaires, J. Jimenez, M. Marquez y E. Ramos. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista Avance y Perspectiva* 21: 313-319.
- Yilmazer, G., A. Carrillo & J. Kokini, (1991). Effect of propylene glycol alginate and xanthan gum on stability of o/w emulsions. *Journal of Food Science*, 56, 513–517.
- Young C., M. Crowley, C. Dietzsch, J. McGinity .Physicochemical properties of films-coated melt-extruded pellets. *J Microencapsulation*. 2007; 24(1): 57-71.
- Youson, J. H. 1988. First metamorphosis. In: *Fish Physiology*, Vol. 11, Part B (eds W. S. Hoar & J. R. Randall), pp. 135– 196. Academic Press, San Diego, California.
- Zambonino - J.L. Infante and C.L. Cahu (2001).Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae . *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130 (4 ): 477 – 487.
- Zong, M., Y. Deng, B. Cristopher, N. Hua, X. Zai and Z. Li. 2009. Microencapsulation of tamoxifen: Application to cotton fabric. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces* 69(1): 85–90.