

José Rodrigo Valim Pimentel

**Emprego de matriz polimérica biodegradável em
dispositivos vaginais para liberação sustentada de
progesterona em fêmeas bovinas: Testes *in vitro* e *in vivo***

São Paulo

2006

José Rodrigo Valim Pimentel

**Emprego de matriz polimérica biodegradável em
dispositivos vaginais para liberação sustentada de
progesterona em fêmeas bovinas: Testes *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1716
FMVZ

Pimentel, José Rodrigo Valim

Emprego de matriz polimérica biodegradável em dispositivos vaginais para liberação sustentada de progesterona em fêmeas bovinas: Testes in vitro e in vivo / José Rodrigo Valim Pimentel.- Pirassununga: J. R. V. Pimentel, 2006.

97 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira.

1. Fêmeas bovinas. 2. Dispositivo. 3. Progesterona. 4. Biopolímeros.
5. PHB/PCL. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Emprego de novos dispositivos intravaginais no controle farmacológico do ciclo estral em fêmeas bovinas", protocolo nº731/2005, utilizando 206 bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Utilization of new intravaginal devices to pharmacological control of the bovine estrous cycle", protocol number 731/2005, utilizing 206 bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 28 de julho de 2005


Prof.^a Dr.^a Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Pimentel, José Rodrigo Valim

Título: Emprego de matriz polimérica biodegradável em dispositivos vaginais para liberação sustentada de progesterona em fêmeas bovinas: Testes *in vitro* e *in vivo*

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Reprodução em Medicina Veterinária

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

A Deus...

Meu amigo, meu guia, minha luz, minha fé!

Combati o bom combate, completei a carreira, guardei a fé.

Já agora a coroa da justiça me está guardada, a qual o Senhor, reto juiz, me dará naquele Dia; e não somente a mim, mas também a todos quantos amam a sua vinda.

II Timóteo 4:7-8

A Ana Claudia...

Minha amiga
Minha companheira
Meu AMOR VERDADEIRO!!

Aos meus filhos queridos;

Matheus e Marina

Alegria na chegada e
Choros de todos nas despedidas.
Vocês meus filhos queridos, são a razão da minha vida.

AMO VOCÊS!!

A minha Mãe Ester

Minha fortaleza, que
Com a sua fé no nosso Deus todo poderoso
sempre me apoiou,
sempre me incentivou,
e principalmente, confiou em mim quando mais ninguém estava
do meu lado.

Te amo MÃE!!

A **Flavia**, por me dar e cuidar do meu maior tesouro. **Nossos filhos**.

As minhas irmãs, **Andréia e Hellen** eu agradeço.

Ao meu Pai, **José Pimentel** eu agradeço por me mostrar que nunca é tarde para aprender.

Ao meu orientador **Prof. Dr Ed Hoffman Madureira**, pela amizade, paciência, confiança e pelo bom humor que passou os ensinamentos que nem sempre foram somente na pesquisa.

Ao **Prof. Dr Rubens Paes de Arruda**, pela amizade e por muitos “cafés” tomados juntos e nossas conversas sobre o que o Brasil tem de melhor, MUSICA CAIPIRA.

Ao **Prof. Dr Mario Binelli**, meu amigo, orientador, incentivador na área de pesquisa. Você Mario, é pra mim um exemplo de como um pesquisador deve se portar: Com entusiasmo!

A minha grande amiga **Prof. Dra Anelise Sousa Traldi**. Pela amizade, cumplicidade, e principalmente, por ter sempre confiado no meu conhecimento como médico veterinário e colocando literalmente na minha mão oportunidades que eu sequer imaginei. Merci Kiky!!

Ao Prof. **Dr Flavio Vieira Meireles e sua esposa Kika**, por sua amizade, confiança e torcer por mim!! E é claro, pelas vezes que passamos juntos com os clones no curral em Tambaú com chuva, sol, calor, frio, neve...

Ao **Professor José Antonio Visintin**, por sempre ser um amigo dos pós-graduandos e ser um exemplo a ser seguido por todos nós!

Ao **Prof. Dr Pietro, Prof. Dra Maira, Prof. Dra Clair, Prof. Dr Cláudio, Prof. Dr Luciano Felício, Prof. Dr Eduardo Birgel Junior**, pela amizade, confiança, e ensinamentos.

Ao **Prof. Dr José Augusto Marcondes Agnelli** da UFSCAR São Carlos, pela confecção dos dispositivos.

Ao **Prof. Dr Lucio Cardozo**, que sempre me ajudou e principalmente pela amizade de longa data.

Ao **Prof. Paulo Mazza** por ter me mostrado que a estatística é uma ciência gostosa e elegante.

A **PHB INDUSTRIAL S/A**, na pessoa do **Dr. Luiz Roberto Kaysel Cruz** pelo suporte financeiro a este projeto.

A **INNOVARE BIOTECNOLOGIA E SAUDE ANIMAL LTDA**, pelo suporte financeiro a este projeto.

A **PREFEITURA DO CAMPUS ADMINISTRATIVO DE PIRASSUNUNGA (PCAPS)** pela disponibilização dos animais utilizados neste trabalho.

A **FZEA**, na pessoa do Professor Doutor **Marcelo Cerqueira César** (Laboratório de Bioquímica) pelas facilidades laboratoriais.

Aos Doutores; **Silvio Ortega Filho, Jefer Fernandes do Nascimento, Mario Donizete Miranda, Wagner** pela irrestrita colaboração.

Ao professor Doutor **Guilherme Nogueira** e minha grande amiga **Maria Paula Bertan**, pela amizade, dosagens hormonais.

Ao Meu irmão, **Saint Clair José Morais Poveda**, por ter me acompanhado e agüentado nesta jornada mostrando sempre tranqüilidade e paz interior que somente uma pessoa de fé em Deus pode ter.

Aos meus amigos de infância , **Wilson Bertoli, Beto Gali, Totonho, Betão, Duda, Fauze, Afonso, Zé Carlinho, Pedro Colosso, meu primo André Orrú**, e tantos outros que mesmo com o tempo passado a nossa amizade continua a mesma.

Ao meu amigo **Alemão!** Tipo assim...Que amizade sincera!

Aos amigos estagiários que sem sua ajuda este trabalho não se realizaria **Fernando Pardo** (hoje colega de pós), **Gisele, Luiza, Fernanda Pepita, Wagner, Paulinho, Fartura.**

Aos amigos do inicio da Pós-Graduação; **Percio, Fenando (do Rubão), Fernando (trovão),Gutão, Carlinha, Gutinho, Pauline, Patrícia, Claudia, Maria Fernanda, Vanessa Marques, Ieio, André Granito, Marcelo, Ale Garcia, João Gustavo, Rui Machado, Aline.** e tantos outros que eu somente neste momento não lembro.

Aos amigos de hoje da Pós; **Juliana, Karem, Felipe, Marcelo Ubatuba, André Freire, Fernando Culhão, Claudinha lindinha, Raquel (Beth)**

Aos meus amigos da clinica, **Eliza, Fabio, João Paulo, Mariana, Rachel, Fernanda,** pelo convívio em Tambaú e a sinceridade da amizade que só em alguns grupos convivi.

Ao meu amigo e futuro professor da USP, **André Simprão,** que sem sua ajuda na estatística, este trabalho seria realizado, mas não tão bem analisado.

Aos amigos do Campus, **Marcio, Bel, Zé Maria, Valdir, Michel, Armando, Creuza, Carlinho, João, Edna...** E todos os outros que por esquecimento mas não por descaso não cito neste momento.

A Secretária da Pós- Graduação da Reprodução , **Harumi** por sempre resolver os meus problemas sem complicá-los ainda mais. Você é um exemplo de eficiência.

As Secretárias da Pós, **Deise, Claudia** pela amizade, ajuda, e principalmente por me ter recebido tão bem nesta instituição.

A bibliotecária **Elza Mara R.B. Faquim** pela ajuda inestimável para que este trabalho possa fazer parte do acervo da FMVZ-USP.

A Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

A **CAPES** pela bolsa a mim destinada, espero não os ter decepcionado.

A todos que de uma maneira ou de outra auxiliaram nesta aventura que é a Pesquisa!!!

MUITO OBRIGADO!!!

RESUMO

PIMENTEL, J. R. V. **Emprego de matriz polimérica biodegradável, em dispositivos vaginais, para liberação sustentada de progesterona em fêmeas bovinas: testes *in vitro* e *in vivo*.** [Utilization of biodegradable polymeric matrix, in vaginal devices, to sustained progesterone release in cows: in vitro and in vivo tests] 2006. 97__ f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Com o aumento do número de animais inseminados por IATF (inseminação artificial em tempo fixo), a diminuição de custos e o incremento de índices reprodutivos têm sido os objetivos de vários grupos de pesquisa. Nos protocolos de IATF utilizados, empregam-se dispositivos de liberação sustentada de progesterona (P_4), que são, em sua maioria, constituídos de um esqueleto de nylon, recoberto com uma camada de silicone com P_4 . Visando a diminuição dos custos de produção e impacto ambiental, foi desenvolvido um dispositivo à base de biopolímeros. Neste estudo, foram comparados dispositivos confeccionados com uma blenda constituída de Poli-hidroxi-butarato (PHB) e Poli- ϵ -caprolactona (PCL), com o Dispositivo Interno Bovino (DIB[®]), utilizado como controle. No teste *in vitro*, utilizaram-se dois tipos de dispositivo à base de biopolímeros, com uma área superficial de 147 cm²: DISP8 (46% PHB, 46% PCL e 8% P_4 ; n=4), DISP10 (45% PHB, 45% PCL, 10% P_4 ; n=4) e o DIB[®] (1 g de P_4 , área de 120 cm²; n=3). Os testes *in vitro* foram conduzidos segundo especificações da USP 23, em um dissolutor de comprimidos, empregando-se uma mistura de álcool/água (60/40) como meio de difusão. Amostras do meio foram colhidas aos 2 min., 2, 4, 8, 12, 24, 48, 60, 72, 84 e 96 h. Os teores de P_4 foram dosados por espectrofotometria, em 244 nm de comprimento de onda. Realizaram-se as comparações 3 a 3 dos coeficientes angulares das retas obtidas pela regressão das concentrações acumuladas de P_4 , em função da raiz quadrada do tempo. As médias e respectivos erros-padrão dos coeficientes angulares foram de $677,39 \pm 16,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ para o DIB[®], $566,17 \pm 3,68 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ para o Disp8 e $774,63 \pm 45,26 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ para o Disp10. Houve diferença entre o DISP8 e o DISP10 ($p < 0,05$), mas ambos não diferiram do DIB. Para análise das quantidades liberadas por dia de teste *in vitro*, consideraram-se 4 períodos: 0-24, 24-48, 48-72 e 72-96 h. Houve interação entre tratamento e tempo ($p=0,0024$). Nas primeiras 24 horas, o DISP8 liberou significativamente menos P_4 do que o DISP10 e o DIB[®],

cujas liberações não diferiram entre si. No intervalo entre 24 e 48h, o DISP 10 liberou significativamente mais P₄ do que o DIB®. O DISP8 liberou uma quantidade de P₄ intermediária e não se diferenciou significativamente nem do DIB® e nem do DISP10. No intervalo entre 48 e 72h a quantidade de P₄ liberada pelo DISP10 foi significativamente maior do que a do DIB® e a do DISP8, que não diferiram entre si. No intervalo entre 72 e 96h, o DISP10 liberou significativamente mais P₄ do que o DIB® e o DISP8 liberou uma quantidade intermediária que não diferiu do DIB® nem do DISP10. No teste *in vivo*, seis vacas mestiças ovariectomizadas receberam DIB (n=4) ou DISP8 (n=8), em um delineamento alternado, com seqüência não balanceada (cross-over), adicionado de medidas repetidas no tempo, referentes aos 16 dias de colheita das amostras de sangue. As amostras foram analisadas por rádio-imuno-ensaio, em fase sólida, utilizando-se “kit” comercial da DPC (Diagnostics Products Corporation). As concentrações de pico foram atingidas 4 h após a colocação dos dispositivos e este foi o único momento em que as concentrações plasmáticas de P₄ diferiram segundo dispositivo (11,45±1,96 vs 9,23±1,15 ng/mL, respectivamente para DIB e DISP8; p= 0,027). No dia 8 do ensaio, as concentrações plasmáticas de P₄ proporcionadas pelo DIB e pelo DISP8 foram respectivamente 2,44±0,09 e 1,89±0,13 ng/mL (p=0.58). Ambos dispositivos mantiveram teores de P₄ superiores a 1 ng/mL, durante os 16 dias do teste *in vivo*. Concluiu-se que os dispositivos confeccionados com a blenda dos biopolímeros PHB/PCL, podem liberar P₄ de maneira sustentada, tanto quanto os que empregam silicone em sua fabricação.

Palavras-chave: Fêmeas bovinas. Dispositivo. Progesterona. Biopolímeros. PHB/PCL.

ABSTRACT

PIMENTEL, J. R. V. **Use of biodegradable polymeric matrix, in vaginal devices, to sustained progesterone release in cows: *in vitro* and *in vivo* tests.** [Emprego de matriz polimérica biodegradável, em dispositivos vaginais, para liberação sustentada de progesterona em fêmeas bovinas: testes *in vitro* e *in vivo*] 2006. 97 ____ f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

With the increase in the number of animals inseminated by TAI (timed artificial insemination) the decrease of costs and the improvement of reproductive performance are the goals of several research groups. Progesterone devices which are majority constituted of a nylon skeleton covered with a silicone layer with P₄, are used in TAI protocols. Aiming the decrease of the production costs and the environmental impact, was a new device developed with biopolymers matrix. In this study, were compared a blend of Poli-hidroxi-butirate (PHB) and poli-ε-caprolactone (PCL) device with the Bovine Internal Device (DIB[®]). In the *in vitro* test, two kinds of the new device with a superficial area of 147 cm²: DISP8 (46% PHB, 46% PCL and 8% P₄; n=4), DISP10 (45% PHB, 45% PCL, 10% P₄; n=4) and DIB[®] (1 g of P₄, area of 120 cm²; n=3). The *in vitro* tests were led following USP 23 specifications in a drug dissolutor in alcohol/water (60/40) solution as a diffusion medium. Samples were collected at 2 min., 2, 4, 8, 12, 24, 48, 60, 72, 84 and 96 hours. Progesterone concentrations were estimated by spectrophotometry at UV 244 nm wavelength. Comparisons 3 by 3 of the angular coefficients of the straight lines obtained by the regression of the accumulated P₄ concentrations in function of the square root of time were performed. The averages and respective standard-errors of the angular coefficients were 677,39 ± 16.13 μg/cm²/t^{1/2} to DIB[®], 566,17 ± 3.68 μg/cm²/t^{1/2} to Disp8 and 774,63 ± 45.26 μg/cm²/t^{1/2} to Disp10. Difference were observed between DISP8 and DISP10 (p< 0.05) but both did not differ to DIB[®]. Four periods were considered for analysis of the amounts released per day of *in vitro* test: 0-24, 24-48, 48-72 and 72-96 hours. Interaction between treatment and time was observed (p=0.0024). In the first 24 hours DISP8 released significantly less P₄ than DISP10 and DIB[®] but the lathers did not differ from each other. In the interval between 24 and 48 hours DISP10 released significantly more P₄ than DIB[®]. The device DISP8 released an intermediary concentration of P₄ and was similar to DIB[®] and to DISP10. In the interval between 48 and 72 hours the progesterone concentration released by

In the interval between 48 and 72 hours the progesterone concentration released by DISP10 was significantly higher than DIB[®] and DISP8 but lathers did not differ from each other. In the interval between 72 and 96 hours DISP10 released significantly more P₄ than DIB[®] while DISP8 released an intermediary amount which did not differ to DIB[®] or to DISP10. In the test *in vivo* test, six ovariectomized beef cows received the devices DIB[®] (n=4) or DISP8 (n=8) in an alternated delineation in a non balanced sequence (cross-over) added of repeated measures in time, related to the 16 days of blood samples collects. Progesterone concentration from these samples were measured by radioimmunoassay in solid phase using the commercial kit from DPC (Diagnostics Products Corporation). The peak of the progesterone concentrations were observed 4 hours after the devices insertion and this was the unique moment in which plasmatic progesterone concentrations differed depending on device ($11,45 \pm 1,96$ vs $9,23 \pm 1,15$ ng/mL, respectively for DIB and DISP8; $p=0,027$). After 8 days from the device insertion plasmatic progesterone concentrations provided by DIB and DISP8 were respectively $2,44 \pm 0,09$ and $1,89 \pm 0,13$ ng/mL ($p=0,58$). Both devices kept the progesterone concentration higher than 1 ng/mL during the 16 days of the *in vivo* test. In conclusion, the devices made with biopolymers blends of PHB/PCL can release sustained P₄ comparable with silicone matrix.

keywords: bovine females. Device. Progesterone. Biopolymers. PHB/ PCL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do (a) ácido 3-hidróxibutírico, (b) Poli (ácido 3-hidróxibutírico) – PHB.....	48
Figura 2 - Dispositivo Interno Bovino DIB [®]	53
Figura 3- Dispositivo 8% ou 10% de P ₄	53
Figura 4- Dissolutor de comprimidos (NOVA ETICA 2004), LFER, FMVZ - USP campus de Pirassununga	54
Figura 5 - Dispositivos dobrados e amarrados DISP 8 ou 10 (A), DIB [®] (B),.....	54
Figura 6- Curva Padrão de P ₄ do ensaio 1(Shimatzu [®] UV 1203).....	61
Figura 7 - Médias das quantidades acumuladas média de Progesterona liberadas por cm ² em função da raiz quadrada do tempo, segundo dispositivo. Pirassununga,2006.....	63
Figura 8- Quantidades de P ₄ liberadas em intervalos de 24, nos testes in vitro. Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey.....	65
Figura 9 - Concentração plasmática de progesterona (ng/mL)	67
Figura 10- Concentração plasmática de progesterona 0-24 horas (ng/mL)	68
Figura 11- Dispositivos DISP 8 e DIB [®] , após a retirada em ensaio com.....	69
Figura 12- Dispositivos DISP 8 após a retirada em ensaio de 384 horas; Pirassununga, 2006.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- comparação dos coeficientes angulares (slopes)($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$).....	63
Tabela 2- Média \pm EP da quantidade de P ₄ (mg) liberada em	64
Tabela 3- Concentração plasmática de progesterona (ng/mL) (X \pm EP).....	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 HIPÓTESE	26
3 OBJETIVO	28
4 REVISÃO DE LITERATURA	30
4.1 ESTRO E CICLO ESTRAL EM FÊMEAS BOVINAS	30
4.2 FOLICULOGÊNESE E DINÂMICA FOLICULAR	31
4.3 ONDAS DE CRESCIMENTO E DOMINÂNCIA FOLICULAR	32
4.4 PROSTAGLANDINA F2 α	34
4.5 LUTEÓLISE	37
4.6 PROGESTERONA E PROGESTÁGENO	38
4.7 DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE PROGESTERONA / PROESTÁGENO	39
4.8 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE P ₄ IN VITRO E IN VIVO	43
4.9 POLÍMEROS	45
4.10 POLI (ÁCIDO 3 – HIDRÓXIBUTÍRICO) – PHB: POLÍMERO AMBIENTALMENTE DEGRADÁVEL	46
4.11 POLÍMERO BIODEGRADÁVEL POLI- ϵ -CAPROLACTONA (PCL)	48
5 MATERIAL E MÉTODO	51
5.1 ENSAIO IN VITRO	51
5.1.1 Delineamento Experimental	51
5.1.2 Local	51
5.1.3 Dispositivos	52
5.1.4 Metodologia	53

5.1.5 Dosagem de Progesterona	55
5.1.6 Análise Estatística	56
5.2 ENSAIO IN VIVO	57
5.2.1 Delineamento Experimental	57
5.2.2 Animais, Tratamentos e Dosagem de P₄	58
5.2.3 Análise Estatística	59
6 RESULTADOS	61
6.1 EXPERIMENTO IN VITRO	61
6.1.1 Peso dos Dispositivos e Quantidade de P₄	62
6.1.2 Liberação de P₄ em Função da Área dos Dispositivos	62
6.1.3 Quantidade Diária de P₄ Liberada	64
6.2 EXPERIMENTO IN VIVO	65
6.2.1 Resultados	66
7 DISCUSSÃO	71
7.1 ENSAIOS IN VITRO	71
7.1.1 Quantidade de P₄ liberada a cada intervalo de 24h do teste in vitro	74
7.2 ENSAIO IN VIVO	76
7.2.1 Teores basais de P₄ em vacas ovariectomizadas	76
7.2.2 Aspectos gerais dos perfis de P₄	77
7.2.3 Teores de P₄ no momento de pico	80
7.2.4 Teores de P₄ no D8	81
7.2.5 Teor de P₄ após o D8	83
7.2.6 Formato dos dispositivos após o uso	85
8 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	89

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Com a estabilização da moeda em 1994 e a abertura de mercados externos, a pecuária nacional apresentou mudanças significativas. O rebanho saltou de 157 milhões de cabeças em 1995 para 192,5 milhões em 2004 (MARA). Em dez anos, o rebanho cresceu 22,61 % e o abate, 53,3%, demonstrando uma melhora na taxa de desfrute, com aumento nas taxas de natalidade e abate de animais mais jovens.

Frente à expectativa de exportação, os produtores investiram mais na administração “dentro da porteira”, adotando técnicas de reprodução assistida e melhoramento genético, com a intenção de obter um animal mais direcionado ao mercado europeu. Este animal, deve apresentar entre outras características, a qualidade sanitária e marmoreio da carcaça.

Nosso rebanho, é composto na sua maioria, de *Bos taurus indicus* com predominância da raça nelore. Estes animais têm como características a rusticidade e adaptação ao clima dos trópicos, com temperatura elevada e longos períodos de seca, porém com comprometimento da maciez da carcaça. Eles também apresentam atraso na puberdade, levando uma novilha a ciclar pela primeira vez de 22 a 36 meses com o primeiro parto em torno de 44 – 48 meses de idade (PEREIRA, 2000; SILVA; PEREIRA, 1986; SOUZA et al., 1995)

ao passo que os animais taurinos (*Bos taurus taurus*) chegam à puberdade em torno dos 13 a 14 meses. (NOGUEIRA, 2004)

Uma das maneiras de se melhorar a qualidade da carcaça dos zebuínos, é o cruzamento entre raças (taurinos e zebuínos). Esta técnica, tem a vantagem de imprimir nos animais nascidos maior precocidade sexual, maior rusticidade,

umentar a velocidade no ganho de peso e melhorar o marmoreio e acabamento de gordura da carcaça.

Via de regra, utilizam-se touros taurinos para monta natural em vacas azebuadas. Entretanto, é comum os touros de raças européias enfrentarem problemas como a degeneração testicular, queda do libido, pododermatite, entre outros problemas relacionados à adaptação dos mesmos em ambientes tropicais. Estes problemas podem ser contornados com a utilização da Inseminação Artificial (IA).

Esta técnica, possibilita a um baixo custo, o emprego de touros geneticamente superiores e progresso genético no rebanho.

Entretanto, IA é pouco utilizada no Brasil. Segundo dados da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2002), Apenas 5% das fêmeas do rebanho Brasileiro são inseminadas.

Dentre as dificuldades de implementação e sucesso, está a dificuldade na observação e reconhecimento do cio (BROADWAY et al., 1975; FOOTE, 1975) falha apontada em vários estudos e que varia entre 27 a 45% (CAVALIERI; FITZPATRICK, 1995; STEVENSON et al., 1996).

O alto índice de animais em anestro (STEVENSON, 2001; STEVENSON; PURSLEY, 1994) também prejudica a taxa de serviço, que é a relação entre o número de animais inseminados e o numero de animais disponíveis (MADUREIRA et al., 2000).

Há alguns anos, estudos da fisiologia do ciclo estral, possibilitaram a sincronização da ovulação pela da aplicação de fármacos o que possibilitou a inseminação artificial em um tempo fixo (IATF). Assim, à taxa de serviço eleva-se

para 100%, visto que todos os animais são inseminados no mesmo período, eliminando assim a necessidade de observação do cio.

Para a implementação de protocolos de IATF existem dispositivos comercialmente, entre eles os de liberação sustentada de progesterona introduzidos na cavidade vaginal, além daqueles que podem ser administrados pela via oral ou subcutânea. Todos esses dispositivos são importados.

Os intravaginais, na sua maioria, são compostos de uma estrutura (alma) de nylon, recobertos com uma membrana de elastômero de silicone inerte impregnado com progesterona (P_4). Estes dispositivos são biocompatíveis mas não são biodegradáveis.

Um fator limitante para o uso desses protocolos é o alto custo dos medicamentos.

Segundo Valentin (2004) o custo destes dispositivos está dividido em: 10% nylon; 64% silicone e 26% da progesterona.

É alto também o custo do processo de produção visto que, este emprega dois moldes, sendo um para a confecção do esqueleto de nylon e outro onde este será recoberto com silicone e P_4 , portanto com duas etapas de manufatura.

O objetivo deste estudo foi testar um dispositivo à base de polímeros biodegradáveis, constituídos de poli-hidroxi-butilato (PHB) e o poli- ϵ -caprolactona (PCL) unidos em uma blenda e misturados com progesterona na proporção de 46%,46%,8% ou 40%,40%,10% respectivamente.

Este novo dispositivo tem como vantagens: tratar-se de um produto nacional, confeccionado em material biodegradável e devido a suas propriedades mecânicas possibilitara sua inserção e manutenção na vagina do animal, além disto possui um

sistema de confecção mais simples, pois necessita de somente um molde e uma etapa de injeção.

Estas vantagens abrem perspectivas de redução dos custos para o produtor, com a diminuição do valor investido para obtenção de um animal proveniente da IATF com as vantagens que esta técnica proporciona.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Dispositivos à base de biopolímeros têm capacidade de liberar progesterona de maneira sustentada, tanto quanto dispositivos confeccionados com silicone.

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Testar a liberação de progesterona de dispositivos de liberação sustentada confeccionados com uma blenda de biopolímeros, comparados com um dispositivo confeccionado com silicone, disponível no mercado, em testes *in vitro* e *in vivo*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão foi escrita abordando inicialmente aspectos referentes ao ciclo estral e dinâmica folicular, posteriormente foi descrito a formação e ação da PGF₂ α , progesterona e progestágeno e dispositivos de liberação sustentada e determinação da liberação destes fármacos. Finalmente foi realizado uma revisão com foco nos polímeros com ênfase nos polímeros biodegradáveis, POLI(ÁCIDO-3-HIDRÓXIBUTÍRICO) (PHB) e POLI - ϵ - CAPROLACTONA (PCL).

4.1 ESTRO E CICLO ESTRAL EM FÊMEAS BOVINAS

Nas Fêmeas bovinas, o estro é descrito como um curto período de receptividade sexual, de aproximadamente 15 a 18 horas com uma variação entre grupos genéticos. Mizuta (2003) monitorou o estro por rádio telemetria e observou diferenças entre vacas angus, nelore e mestiças nelore com angus/angus nas quais o estro teve a duração de 15,6; 12,9 e 12,4 horas respectivamente. O estro é manifestado à cada 18 a 24 dias com a ovulação ocorrendo de 10 a 14 horas após se cessarem-se as manifestações comportamentais (MORROW, 1986). Estas manifestações incluem montar e ser montada por outros animais, nervosismo e inquietação, descarga de muco vaginal de aspecto claro, vulva edemaciada e inchada (RAE et al., 1999). Porém, ficar parada ao ser montada foi definido como o momento do cio.

Segundo Macmillan et al. (1996), o ciclo estral é dividido em quatro fases de acordo com alterações na morfologia ovariana: Estro (dia 0), Metaestro (dias 1 a 3,), Diestro (dias 4 a 18) e Proestro (do dia 19 até o estro). O ciclo estral

também pode ser dividido em uma fase folicular, onde o hormônio estradiol está mais atuante e uma fase luteínica, com predomínio da progesterona (P₄), secretada pelo Corpo lúteo (CL). Durante o ciclo estral ocorre duas ou três ondas de desenvolvimento foliculares. O final da fase de diestro é marcada pela luteólise, promovida pela PgF₂α secretada pelo útero. Após a luteólise, os teores de P₄ diminuem e possibilita um pico de estradiol que provoca o pico pré ovulatório de LH, levando à ovulação.

4.2 FOLICULOGÊNESE E DINÂMICA FOLICULAR

A Hipótese do crescimento folicular em ondas foi proposta inicialmente por Rajakosk em 1960, após analisar histologicamente ovários de novilhas abatidas em todos os dias do ciclo estral. Mais tarde, Pierson e Ginther (1984) através de ultra-sonografia comprovaram esta hipótese, acompanhando e monitorando o crescimento e diâmetro dos folículos de novilhas durante todo ciclo.

Do ponto de vista endócrino, o desenvolvimento dos folículos pode ser dividido nos seguintes estágios; independência das gonadotrofinas que é caracterizado por folículos de dimensões inferiores à 3 mm, dependência de FSH com folículos que vão de 3 a 10 mm, e de dependência de LH com folículos >10mm.

Segundo D'occhio et al. (1999), a dinâmica folicular é um processo contínuo, com uma hierarquia entre folículos, de acordo com seu estado de desenvolvimento. Os folículos são recrutados para crescer e podem ovular ou se tornar atrésicos, sendo a atresia funcional um processo irreversível que pode ocorrer em todos os estágios do ciclo.

4.3 ONDAS DE CRESCIMENTO E DOMINÂNCIA FOLICULAR

Após o aumento da concentração de FSH no sangue, ocorre o recrutamento de folículos primários (> 3,0 mm) que irão se desenvolver à folículos pré-antrais (secundários) (4,0 até 8,5 mm) (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1997). D'occhio et al. (1999) relataram que, a cada onda folicular recrutada, um grupo de aproximadamente 5 a 7 folículos, medindo 3 a 5 mm, são estimulados a iniciar o seu crescimento.

Durante o início do crescimento folicular, as células da granulosa apresentam receptores para FSH, e as células da teca, para LH (FORTUNE; QUIRK; 1988). A ligação do LH com seu receptor estimula a conversão da pregnenolona em androstenediona nas células da teca. A androstenediona, então é metabolizada a E₂ pela enzima P450 aromatase, nas células da granulosa, na presença do FSH ligado a seu receptor.

Crowe et al. (2001) demonstraram que desde o recrutamento até a seleção, o folículo ovariano é dependente de FSH e que a dependência do LH inicia-se na seleção e dura até a ovulação. Analisaram ainda a atividade da aromatase e a concentração de E₂ intrafolicular e verificaram que a ação conjunta do FSH e LH promove um aumento da atividade da aromatase e da concentração de E₂ intrafolicular durante a seleção até o desvio.

Na fase de seleção, um dos folículos destaca-se e continua seu crescimento (folículo dominante) inibindo o crescimento de outros folículos (folículos subordinados), passando da fase de seleção para dominância, que inclui o desvio (BERTSON et al., 1985; GINTHER et al., 1996).

O desvio indica a fase em que a taxa de crescimento do folículo dominante aumenta e a dos folículos subordinados diminui. O início do desvio é caracterizado pelo crescimento do maior folículo e diminuição do segundo maior folículo (GINTHER et al., 1997).

A dinâmica folicular de bovinos de raças européias *Bos taurus taurus* é caracterizada pela presença de duas (GINTHER et al., 1989; PIERSON; GINTER, 1988) ou três (IRELAND; ROCHE, 1987; SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988) ondas de crescimento folicular e esporadicamente uma ou quatro ondas (MURPHY et al., 1991; SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988).

Em fêmeas *Bos taurus indicus*, o predomínio de duas ondas de crescimento folicular foi observado em vacas Nelore; já em vacas Gir e novilhas Nelore ou Brahman a ocorrência de três ondas foi mais freqüente (BARROS et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997; GAMBINI et al., 1998; RHODES et al., 1995).

Desta maneira, a maioria das fêmeas bovinas desenvolve ciclos de 2 ou 3 ondas de crescimento folicular e as emergências das ondas foliculares acontecem, em animais de duas ondas, no dia da ovulação e no 10º dia do ciclo. Em fêmeas de três ondas, as emergências ocorrem no dia da ovulação, no 12º e no 16º dias do ciclo estral (GINTHER et al., 1989). Cada onda consiste na emergência simultânea de um grupo de folículos ao redor de 3-4 mm de diâmetro caracterizado como recrutamento folicular e é caracterizado pela elevação das concentrações plasmáticas de FSH (ADAMS et al., 1992; TURZILLO; FORTUNE, 1990).

4.4 PROSTAGLANDINA F₂α

Segundo Meyer et al. (1983), as prostaglandinas são um dos diversos compostos fisiologicamente ativos, de ocorrência ubiquitária, com estrutura típica, contendo 20 átomos de carbono com um anel ciclopentano em C8 – C12 (Hafez, 1988), formado por ácidos graxos essenciais, cujo seus efeitos incluem o sistema nervoso, a circulação, os órgãos reprodutivos femininos e o metabolismo. No esperma humano normal, encontra-se elevada concentração de prostaglandinas.

O ácido aracdônico, um ácido graxo essencial, é o precursor das prostaglandinas mais intimamente ligadas a reprodução a PgFh2 e PgF₂α (HAFEZ, 1988).

A disponibilização do ácido aracdônico, (AA) a partir dos fosfolipídios pela fosfolipase A₂ (PLA₂) é considerado um pré-requisito na síntese de PGF₂α .O AA é rapidamente convertido em PG sintetase, também conhecido como ciclooxigenase (COX) que vão formar COX 1 e induzir a formação de COX 2 através de ativação gênica (BINELLI et al., 2000).

Estabeleceu-se que o local de formação da PGF₂α era o endométrio uterino, desde que foram encontradas altas concentrações deste hormônio em endométrio de ovelhas e suínos (MCCRACKEN, 1999). Durante experimentos de circulação – contrária, Pharris e Wygarden (1969); definiram que o endométrio tem um importante papel na luteólise devido à grande quantidade de PGF₂α encontrada no útero

O estradiol E₂ foi utilizado para a estimular a síntese de PGF₂α do porco da índia (BLATCHLEY, 1971), rato (CASTRANE, 1975) e ovelha (DEY, 1982). Isto

sugeriu que o E₂ estimula a atividade enzimática que controla a síntese de PG pelo endométrio.

O estradiol foi utilizado para aumentar a atividade da PLA₂, que é uma enzima que libera o AA dos estoques de fosfolípidios e aumenta a atividade de síntese de PG sintetase (COX) (BONNEY, 1987; MCCRACKEN, 1999). Considera-se que o efeito de preparação pela P₄ na síntese de PGF₂α no endométrio, seja o acúmulo de lipídeos no endométrio. A progesterona também pode aumentar a síntese de PGF₂α pelo aumento da concentração e atividade da COX. Com isto, foi definido que o período de exposição à progesterona aumenta a produção de PGF₂α estimulada pelo estrógeno no endométrio uterino em várias espécies .

Subseqüentemente, tornou-se aparente que em ovelhas o E₂ e a P₄ controlam a síntese de PGF₂α, principalmente pela concentração de receptores de ocitocina (MCCRACKEN, 1999).

Inicialmente, a P₄ aumenta o número de receptores para ocitocina no útero responsivo. A ocitocina originada na lóbulo neurohipose se liga ao receptor na membrana da célula, que está atrelado a uma proteína G, responsável pela ativação da fosfolipase C (PLC).

A PLC rompe a membrana do fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), submetendo ao Inositol trifosfato (IP₃) e ao diacilglicerol (DAG). O IP₃ se liga a receptores específicos no retículo endoplasmático, resultando no lançamento de C_a⁺⁺ para o abastecimento do compartimento citoplasmático interno.

A ativação da DAG pela proteína kinase C (PKC) conduz a uma fosforilação da serina cálcio dependente, fosfolipase A₂ (PLA₂), provavelmente pelo caminho da map kinase (LIN et al., 1993).

O IP_3 estimula o aumento do C^{++}_a no citoplasma e estimula a atividade da PLA_2 , esta atravessa a membrana onde os substratos dos fosfolipídios estão localizados.

Ativada a membrana libera PLA_2 partindo o ácido aracnóico (AA) para fosfolipídios. O AA livre converte a prostaglandina H_2 pela enzima ciclooxygenase 2 (COX-2).

A $PGF_{2\alpha}$ pela conversão da $PGFH_2$ em $PGF_{2\alpha}$ que é liberada na circulação.

Este processo ocorre preferencialmente nas células epiteliais do endométrio uterino, comparado com as células do estroma.

A $PGF_{2\alpha}$ atinge o ovário pelo mecanismo de contra-corrente e se liga aos receptores do CL estimulando a liberação de ocitocina luteínica, que se liga aos receptores no endométrio, estimulando mais tarde o lançamento de $PGF_{2\alpha}$, o que caracteriza o mecanismo de *feed back* positivo.

Contudo, Kotwica et al. (1997) bloquearam os receptores de ocitocina com um antagonista específico (CAP 527), o que não impediu a ocorrência de secreção pulsátil de $PGF_{2\alpha}$ nem da luteólise, comparando-se com os animais controle. Além disso, a duração do ciclo estral dos animais tratados com CAP 527 e dos animais controle foi semelhante. Em outro estudo Kotwica et al. (2000) demonstrou que durante a luteólise espontânea em bovinos, somente 54% dos pulsos de $PGF_{2\alpha}$ estavam associadas a pulsos de 15-ceto-13,14 diidro PGF (PGFM, um metabólito da $PGF_{2\alpha}$ mais facilmente mensurável na circulação). Juntos, estes dados indicaram que, pelo menos nos bovinos, a ocitocina pode não ser determinante para a luteólise. Porém uma série de evidências indicam que o E_2 pode ter um papel central no mecanismo luteolítico (BINELLI et al., 2000)

4.5 LUTEÓLISE

O efeito mais esperado da $\text{PGF}_2\alpha$ é a luteólise. (BARNABÉ, 1975; LAUDERDALE, 1975). Os análogos de $\text{PGF}_2\alpha$, como o cloprostenol, são rapidamente absorvidos e sofrem inativação principalmente pela oxidação nos pulmões (KINDAHL, 1980). Após a administração de uma dose luteolítica, a $\text{PGF}_2\alpha$ alcança um (pico) em 10 minutos no plasma sangüíneo e declina em aproximadamente 90 minutos (STELLFLUG et al., 1975).

O momento da regressão do CL é determinado pelo momento de secreção de $\text{PGF}_2\alpha$ no útero não gravídico ou pelos placentomas na parição (WILTBANK et al., 2002). Em vacas, de corte que ainda não estão ciclando, a primeira ovulação geralmente resulta em uma curta fase lutéinica, devido à secreção prematura de $\text{PGF}_2\alpha$ no útero (GARVERICK, 1997; GARVERICK; SMITH, 1986; MADUREIRA et al., 2004; SHORT et al., 1990).

Durante a prenhez, a liberação de $\text{PGF}_2\alpha$ deve ser bloqueada para que o CL continue a secretar quantidades necessárias de P_4 para a manutenção da prenhez.

4.6 PROGESTERONA E PROGESTÁGENO

Na década de 60 vários pesquisadores apontaram a possibilidade da sincronização do estro em bovinos pelo controle e extensão da fase luteínica (HANSEL; CONVEY, 1983). Estes tratamentos de longa duração conseguiam sincronizar a ovulação, porém as taxas de prenhez após a inseminação artificial eram muito baixas (GORDON, 1976; WISHART, 1972), devido a falhas na sincronização da onda .

A concentração de progesterona plasmática encontra-se de 1ng/mL 24h antes do estro e no dia do estro, tanto em fêmeas zebuínas como em européias (DIELEMAN et al., 1986; JIMÉNEZ et al., 1988; LAMOTHE-ZAVALETA et al., 1991b). Durante o pico pré-ovulatório de LH, Jiménez et al. (1988) verificaram concentrações de progesterona abaixo 0,5 ng/mL (JIMÉNEZ et al., 1988). Pinheiro et al. (1998), observou que, mesmo na presença de um corpo lúteo funcional a concentração plasmática de progesterona esta ao redor de 6,0ng/mL.

Wiltbank et al. (1965) utilizaram pela primeira vez o estradiol como agente luteolítico, em combinação com um progestágeno. Foi possível inibir o crescimento do CL em fêmeas recém ovuladas ou prevenir a ovulação no final do ciclo (WISHART; YOUNG, 1974). Posteriormente, esta combinação foi registrada como um produto comercial denominado SincroMate B[®] (SMB), constituído de um implante hidrônico subcutâneo de norgestomet 6mg (17 α -acetoxy-11 β -methyl-19-nor-preg-4-ene-3,20-dione; G.D. Searle, Chicago, IL) utilizado por 9 dias, associado a uma injeção intramuscular de valerato de estradiol (5mg) e norgestomet (3mg), aplicada no dia da colocação do implante (WILTBANK; GONZALES-PADILHA, 1975).

4.7 DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE PROGESTERONA / PROESTÁGENO

Em meados dos anos 60, Dziuk e Cook (1966) demonstraram que esteróides poderiam ser liberados na corrente sanguínea através de implantes subcutâneos de silicone, porém, os implantes eram muito grandes e pouco práticos. Com o tempo, foi desenvolvido um método simples e prático para liberação de progesterona na cavidade vaginal permitindo a sincronização do ciclo estral em fêmeas bovinas.

No final dos anos 60 e início dos 70, foram desenvolvidas esponjas de poliuretano impregnado com progesterona, porém, a taxa de retenção foi pequena e este produto não se demonstrou comercialmente viável.

Seguidos sucessos no início dos anos 70 demonstraram que anéis vaginais de silicone, impregnados com progesterona sintética, conseguiram suprimir os picos de LH e a ovulação em mulheres (MISHELL JR.; LUMKIN, 1970; MISHELL JR. et al., 1988).

Valentim (2004) testou protótipos compostos de tubos de silicone com áreas que iam de 50 a 100 cm² e concentração de P₄ de 0,5 a 2,0 g e encontrou correlação entre a superfície de contato e a liberação plasmática de P₄ (p=0,081)

Mauer et al. (1975) desenvolveram um dispositivo intra vaginal (Progesterone Releasing Intravaginal Device, PRID[®]; Abbott Laboratories, North Chicago IL) que consistia de uma armação em forma de espiral de aço, coberto por uma membrana de silicone, impregnado com uma grande quantidade de progesterona. As taxas de retenção foram satisfatórias em novilhas e vacas. Estudos iniciais demonstraram que

o dispositivo liberava progesterona suficiente para suprimir o estro e a ovulação (ROCHE, 1976).

Posteriormente, outros dispositivos de liberação sustentada de P₄ entraram no mercado, com resultados semelhantes (CIDR-B, DIB, CRONIPRESS), permitindo a sua reutilização (BÓ, 2000).

Rathbone et al. (2002b) obtiveram sucesso em produzir e testar um dispositivo de liberação sustentada confeccionados com poli ε- caprolactona, um biopolímero biodegradável. Dentro deste sistema, a progesterona restante após o uso no dispositivo, pode ser reaproveitada quando estes retornam a indústria, fato que não ocorre com os dispositivos confeccionados com silicone.

Os progestágenos são compostos similares à P₄. Podem ser administrados por via oral como o Acetato de Melengestrol (MGA), por meio de implantes subcutâneos de norgestomet (Crestar e Sincromat-B) ou de dispositivos de liberação sustentada de P₄ (CIDR-B, DIB, CRONIPRESS) (BÓ, 2000).

Tais compostos têm como objetivo simular uma fase luteínica por períodos que permitam a regressão espontânea do CL, o que leva a uma sincronização do estro, em um período de 2 a 4 dias após a remoção do agente progestacional (RATHBONE et al., 2001).

De um modo geral, os progestágenos se ligam aos receptores de progesterona, mas não possuem respostas biológicas idênticas (STANCZYK, 2003).

A liberação de LH pela hipófise é primariamente controlada pela P₄ e pelo E2 (KINDER et al., 1996). Assim, a ovariectomia de fêmeas bovinas adultas resulta em aumento na freqüência dos pulsos de LH pela hipófise (HOBSON; HANSEL, 1972; SCHALLENBERGER; PETERSON, 1982), enquanto a administração de P₄ nas

fêmeas ovariectomizadas resulta na supressão da liberação de LH (BECK et al., 1976).

No início da fase luteínica (2 a 3 dias após a ovulação, quando o CL ainda não está formado), as concentrações de P_4 são menores e os pulsos de LH ocorrem numa frequência maior do que no meio dessa fase (CUPP et al., 1995; PETERS et al., 1994; WILTBANK, 2001). O mesmo ocorre após a luteólise, quando há maior concentração e frequência dos pulsos de LH, em consequência de uma concentração mais baixa de P_4 circulante (IMAKAWA et al., 1986).

A frequência dos pulsos de LH é controlada de acordo com as doses de P_4 . Quando a progesterona é administrada em altas doses, a frequência dos pulsos de LH é menor do que quando são administradas doses menores (ROBERSON et al., 1989).

Entretanto, esses autores observaram que a liberação de LH após a administração de altas doses de P_4 foi maior quando comparada àquela encontrada na presença de um CL funcional, apesar das concentrações plasmáticas deste esteróide terem sido similares nos dois grupos avaliados. Resultados semelhantes foram obtidos por Kojima et al. (1992), em que a P_4 exógena não suprimiu a liberação dos pulsos de LH da mesma maneira que a P_4 endógena secretada pelo CL.

Por outro lado, Bergfeld et al. (1995) trataram um grupo de fêmeas com diferentes doses de P_4 , o que resultou em variação das concentrações plasmáticas. Outro grupo de fêmeas foi tratado com diferentes doses de $PGF2\alpha$ com o objetivo de destruir parcialmente o CL e causar variações nas concentrações plasmáticas de P_4 . Os pulsos de LH tiveram menor frequência concomitantemente com as maiores concentrações de P_4 , independente de sua fonte ser exógena ou endógena. Esses

resultados são indicativos de que a P₄ exógena possui efeito semelhante no controle da liberação de LH, ao contrário do que foi proposto por Kojima et al. (1992) e Roberson et al. (1989).

Sanchez et al. (1995) observaram que vacas tratadas com 4 implantes de norgestomet apresentaram freqüências de pulsos de LH similares às de vacas em sua fase luteínica. Entretanto, estes autores verificaram que a freqüência dos pulsos de LH era maior no final do tratamento do que durante o seu período inicial, mesmo quando o norgestomet havia sido administrado em doses 8 vezes maiores que as usadas comercialmente.

Baseado na variação da freqüência dos pulsos de LH durante o tratamento com progestágeno, foi encontrada maior freqüência em vacas tratadas quando comparadas com aquelas em sua fase luteínica, mesmo na presença de concentrações plasmáticas de P₄ similares, como observado por Kojima et al. (1992) e Roberson et al. (1989), provavelmente devido ao fato da avaliação do padrão de LH, ter sido realizada um dia antes do final do tratamento com progestágeno, se o padrão de liberação de LH tivesse sido avaliado no início do tratamento, a freqüência dos pulsos de LH provavelmente teria sido menor do que a encontrada (KINDER et al., 1996).

A progesterona inibe o estro, a ovulação e altera a dinâmica folicular, atuando sobre o hipotálamo e regulando a liberação de GnRH (MIHM; AUSTIN, 2002; PETERS et al., 1994) e conseqüentemente, do LH (KINDER et al., 1996). Assim, a administração de progesterona/progestágeno por um período suficiente para permitir a regressão natural do CL (14 dias ou mais) pode induzir o estro sincronizado (RATHBONE et al., 2001), uma vez que a suspensão do tratamento progestacional

leva à ocorrência do pico de LH e a ovulação (KESNER; PADMANABHAN; CONVEY, 1982).

O tratamento com progestágenos por tempo prolongado, de 14 a 21 dias, é efetivo para a sincronização do estro, no entanto, a fertilidade deste estro sincronizado é reduzida (ODDE, 1990). A maior sincronia obtida pelo tratamento com progestágeno por tempo prolongado ocorre porque o padrão de desenvolvimento de ondas foliculares não é mantido, e o folículo dominante de tamanho acima do normal persiste até que o tratamento seja interrompido (LARSON; BALL, 1992; SIROIS; FORTUNE, 1990). Assim, a ovulação destes folículos persistentes pode ser a razão da baixa fertilidade decorrente da sincronização do estro com a utilização de progestágenos (ODDE, 1990; SAVIO et al., 1993).

4.8 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE P₄ *IN VITRO* E *IN VIVO*

Bunt et al. (1997) adaptaram a metodologia indicada na USP 23 (United States Pharmacopeia) para dosar progesterona em implantes vaginais de progesterona humano para dispositivos de liberação sustentada veterinário.

Utilizando um dissolutor de comprimidos com cubas de 1000 ml, eles testaram a mistura de álcool e água, o pH, a temperatura e a rotação do aparelho durante o ensaio. Conclui que o pH não interfere na liberação, a rotação ideal foi de 150 rpm a 38°C e a mistura álcool e água foi de 60/40 % respectivamente. Os dados foram analisados como quantidade de P₄ liberada por cm² em função da raiz quadrada do tempo e a taxa de liberação foi calculada através do slope que foi neste estudo de 1228 ±52 (n=3). Enquanto que Costa (2000) revisou vários modelos

matemáticos de liberação como, Zero Order, First Order, Hixson-Crowell, Weibull, Higuchi, especificando a sua utilização no estudo farmacocinético das drogas.

Em outro estudo, Burggraaf et al. (1997) compararam em ensaios in vitro e in vivo a liberação entre dispositivos CIDR[®] (Inter Ag. New Zealand) contendo P₄ micronizada e não micronizada. Eles não encontraram diferenças entre os tratamentos no ensaio in vivo de 12 dias realizado por radio imuno-ensaio de fase sólida, porém houve diferença no ensaio in vitro descrito por Bunt et al. (1997), demonstrando que esta metodologia é mais indicada para determinar pequenas diferenças entre os dispositivos.

Burggraaf et al. (1997) em um estudo comparando cidrs produzidos com diversos lotes de silicone contendo carbonato de cálcio em 10% do seu peso ou não e progesterona micronizada ou não, encontrou os seguintes resultados: O CIDR contendo P₄ não micronizada liberou mais lentamente que o CIDR de P₄ micronizada, com slopes de 1088 e 1078 respectivamente com diferença estatística de $p < 0,050$. Entretanto, a adição de um aditivo inerte (carbonato de cálcio) no silicone diminuiu a taxa de liberação de P₄ no CIDRB. Outros autores já haviam observado uma diminuição na taxa de liberação de esteroides misturados em uma matriz de silicone quando aditivos inertes são adicionados. Concluiu-se que esta adição aumenta a distancia que a molécula do esteróide tem que percorrer até a superfície do silicone diminuindo com isto a velocidade de liberação (PFISTER et al., 1987).

4.9 POLIMEROS

O uso de materiais poliméricos vem crescendo na sociedade. O aumento substancial do uso de polímeros de origem petroquímica em diversas aplicações nas últimas décadas é pauta de diversas discussões atuais, pois estes polímeros são descartados muito rapidamente, gerando um sério impacto ambiental (LUO et al., 2003). No entanto, os plásticos convencionais, tais como polipropileno (PP), poliestireno (PS), polietileno (PE) e poli (cloreto de vinila) (PVC) apresentam taxas extremamente baixas de degradação, o que pode levar a sérios problemas relativos ao desequilíbrio ambiental, como, por exemplo, às quantidades crescentes de resíduos plásticos que se acumulam dia após dia, pondo em risco as relações presentes nos ecossistemas terrestres e marítimos (CHIELLINI et al., 1996).

Somente na cidade de Joinville, são recolhidas diariamente 600 toneladas de lixo, sendo a quantidade de lixo plástico estimada em 25 a 30 % deste valor (FORMOLO et al., 2003).

Uma das soluções encontradas está na inserção de polímeros biodegradáveis no mercado dos plásticos, sendo que algumas pesquisas iniciais nesse campo já foram motivadas pelas suas aplicações na área biomédica (CHIELLINI et al., 1996).

A Alemanha, por exemplo, pretende substituir pelo menos 60% do plástico comum, consumido no país, por plásticos biodegradáveis. O compromisso alemão é de longo prazo. Por lei, a substituição deverá ser feita até o ano 2060 com objetivo de aliviar os aterros sanitários do enorme volume de plásticos de petróleo, consumidos à razão de 70kg por habitante por ano (o Brasil consome cerca de 15kg

por habitante por ano). O plástico biodegradável também reduziria o custo atual de disposição ou eliminação do lixo plástico, de 1.500 para 500 euros por tonelada.

Os polihidroxialcanoatos ou PHAs são termoplásticos biodegradáveis. Segundo estabelecido pela American Standard for testing and Methods (ASTMD-883), polímeros biodegradáveis são polímeros onde a degradação resulta primariamente da ação de microorganismos tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural. (RAGHAVAN, 1995). Em geral, derivam deste processo CO₂, CH₄; componentes celulares microbianos e outros produtos. Além disso, eles são biocompatíveis e têm sido reconhecidos como substitutos potenciais dos termoplásticos derivados do petróleo. Os PHAs são produzidos por um grande número de procaríotos como fonte de reserva de carbono e energia.

4.10 Poli (ácido 3 – hidróxibutírico) – PHB: Polímero ambientalmente degradável

De grande relevância para o usuário de artigos feitos de PHB ou seus copolímeros Poli (ácido 3 –hidróxibutírico-co-hidróxivalérico) – PHBV, são as taxas de degradação destes artigos sob várias condições ambientais. A biodegradação normalmente procede via ataque à superfície por bactérias, fungos e algas. O tempo real da degradação de polímeros biodegradáveis, e portanto do PHB e PHBV, dependerá do ambiente envolvido, espessura dos artigos e a concentração de valerato (SCOTT; GILEAD, 1995).

O motivo que os torna aceitos como potenciais substitutos biodegradáveis dos polímeros sintéticos se deve à sua completa biodegradabilidade em ambientes

aeróbios e anaeróbios para produzir CO₂/H₂O/biomassa e CO₂/H₂O/CH₄/biomassa, respectivamente, pela mineralização biológica natural.

Um dos membros desta classe, o Poli (ácido 3-hidróxibutírico) ou PHB, foi mencionado na literatura de microbiologia no começo do século. Estudos detalhados foram relatados por Maurice Lemoigne, do Instituto Pasteur, em 1925. Ele observou grãos insolúveis, inclusos no fluído citoplasmático de cultura de *Bacillus megaterium*, comuns para o caso de lipídeos, sendo que após várias caracterizações foi demonstrado se tratar de um poliéster, tendo uma fórmula empírica igual à C₄H₆O₂.

Dentro da célula, o polímero atua como uma fonte de energia e de carbono, permanecendo no estado amorfo ou não-cristalino. Entretanto, no processo de extração, a cristalização ocorre rapidamente levando a altos graus de cristalinidade, e portando de rigidez, o que tem dificultado bastante a utilização deste polímero devido a sua baixa resistência ao impacto.

Devido a sua origem natural, o PHB tem uma excepcional regularidade estereoquímica; suas cadeias são lineares com interações tipo van der Waals entre os oxigênios da carbonila e os grupos metila e interações por pontes de hidrogênio devido à presença de hidroxilas. Os centros quirais possuem apenas a configuração R, a qual implica que o polímero é completamente isotático e portanto altamente favorável à cristalização (LUO et al., 2003).

As fórmulas estruturais do monômero ácido-3-hidróxibutírico e do polímero PHB estão ilustradas na figura 1.

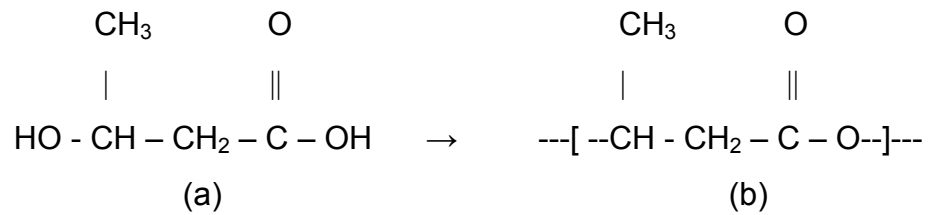


Figura 1 – Fórmula estrutural do (a) ácido 3-hidróxibutírico, (b) Poli (ácido 3-hidróxibutírico) – PHB

4.11 POLÍMERO BIODEGRADÁVEL POLI- ϵ -CAPROLACTONA (PCL)

Para que seja atingido um relacionamento específico processamento-estrutura-propriedades-custo, a composição polimérica, além do PHB e/ou de seus copolímeros, deve conter teores variáveis do polímero biodegradável Poli(caprolactona) – PCL.

PCL é geralmente preparado pela abertura do anel de polimerização do ϵ -caprolactona (DERVAL et al., 2002).

Para a redução da degradação, causada pela severidade dos agentes agressivos (cisalhamento, temperatura e oxigênio), no processamento dos compósitos poliméricos deve ser promovida a adição de sistemas completos de estabilização térmica, constituídos de: anti-oxidante primário do tipo fenol estericamente impedido (em teores de 0,02% a 0,5% - % em massa referente ao conteúdo total, que inclui o PHB e o PCL); antioxidante secundário do tipo fosfito orgânico (em teores de 0,02% a 0,5% - % em massa referente ao conteúdo total, que inclui o PHB e PCL) e estabilizantes térmicos do tipo lactona (em teores de

0,02% a 0,5% - % em massa referente ao conteúdo total que inclui o PHB e o PCL) (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

Como função cooperativa complementar, podem ser utilizados co-estabilizantes secundários, do tipo auxiliares de processamento (lubrificante interno, lubrificante externo e modificadores de fluxo).

Para os controles termodinâmico e cinético do processo de cristalização (nucleação e crescimento) do PHB e do PCL, nas composições poliméricas, podem ser utilizados os nucleantes sorbitol ou benzoato de sódio. De acordo com a morfologia cristalina e com o grau de cristalinidade desejados deve ser variado o teor de nucleante, de forma combinada com o gradiente de resfriamento imposto ao material polimérico durante o seu estágio final de processamento.

5 MATERIAL E MÉTODO

O material e método deste trabalho descrevem a metodologia, delineamento experimental e análise estatística de dois diferentes ensaios: *in vitro* e *in vivo*, bem como o local no qual foram realizados e equipamentos utilizados.

5.1 ENSAIO IN VITRO

5.1.1 Delineamento Experimental

O delineamento utilizado foi o de blocos generalizados, adicionados de medidas repetidas no tempo. Foram utilizados 2 ensaios (blocos), com três dispositivos em duplicata: DIB[®] (Syntex, Argentina), utilizado como controle, DISP 8 e DISP 10 (dispositivo vaginal de PHB:PCL:P₄ na proporção 46:46:8 e 45:45:10, respectivamente). Cada dispositivo correspondeu a uma unidade experimental.

5.1.2 Local

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Endocrinologia da Reprodução (LFER), nas dependências do Centro de Biotecnologia da Reprodução (CBRA), do departamento de Reprodução Animal (VRA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ USP), campus de Pirassununga. As dosagens por espectrofotometria

foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP). As dosagens de progesterona (P_4), foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP, Araçatuba).

5.1.3 Dispositivos

O dispositivo vaginal, DIB[®] (Figura 2), comercialmente disponível, foi utilizado como controle. Segundo o fabricante (Syntex[®], Argentina) o DIB[®] contém 1g de P_4 e 120 cm² de área.

Os dispositivos com 8 e 10 % de P_4 (Figura 3), com área de 147cm², foram confeccionados no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), pelo processo de extrusão/injeção .

O DISP 8 foi confeccionado com uma blenda polimérica de 46% de PHB-V (Polihidroxibutirato e Valerato), 46% de PCL (Poli ϵ -caprolactona) e 8 % de P_4 e o DISP 10, 45% de PHB-V, 45% de PCL e 10% de P_4 .

Foram realizados 2 ensaios e em cada ensaio foram utilizados 2 DIB[®], 2 DISP 8 e 2 DISP 10.



Figura 2 - Dispositivo Interno Bovino DIB[®]
(Sintex[®], Argentina)



Figura 3 - Dispositivo 8% ou 10% de P₄

5.1.4 Metodologia

Utilizou-se um dissolutor (Nova Ética mod. 299) (Figura 4), com 6 cubas e capacidade para 1000 mL por cuba. As cubas foram preenchidas com uma mistura de álcool e água na proporção de 60: 40.



Figura 4 - Dissolutor de comprimidos (NOVA ETICA 2004), LFER, FMVZ - USP campus de Pirassununga

Os dispositivos foram pesados, dobrados (Figura 5) e fixados às hastes giratórias do dissolutor.

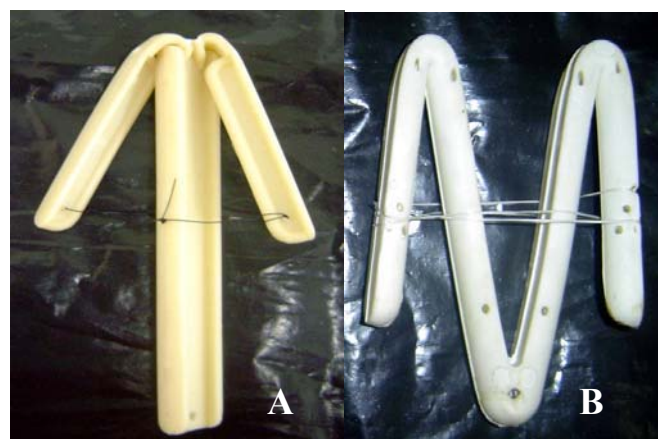


Figura 5 - Dispositivos dobrados e amarrados DISP 8 ou 10 (A), DIB[®] (B)

A temperatura do teste foi de 38°C e a velocidade de agitação de 150 RPM (BUNTT et al., 1997). Os dispositivos presos às hastes foram introduzidos nas cubas

e amostras de 1 mL foram colhidas nos seguintes momentos: 2min., 2, 4, 8, 12, 24, 48, 60, 72, 84 e 96 horas. As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro, vedadas com Parafilm® e mantidas em geladeira à 4°C, até o momento das dosagens, que não excedeu 3 dias após a colheita da última amostra.

5.1.5 Dosagem de Progesterona

Foi empregada dosagem por espectrofotometria, onde a absorbância das amostras foi relacionada à concentração de P₄, com base em uma curva padrão elaborada como se segue:

Pesaram-se 500 mg de P₄ (Sigma) e diluíram-se em 50 ml de uma solução álcool/água na proporção de 60:40 (solução A, 10 mg/mL); transferiam-se 500 µL da solução A para um balão volumétrico e completou-se o volume para 100 mL com a solução álcool/água (solução B, 50 µg/mL).

Submeteu-se a solução B a uma diluição seriada, sempre à metade da concentração anterior, e consideraram-se as soluções de concentração 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 e 0,78 µg/mL como os padrões para confecção da curva.

Realizaram-se as leituras da absorbância dos padrões em espectrofotômetro em comprimento de onda de 244 nm (Shimatzu® UV 1203).

Confeccionou-se um gráfico onde as concentrações dos padrões foram colocadas nas abcissas e as respectivas absorbâncias, nas ordenadas. Obteve-se assim, a equação do tipo $y = a + bx$, que foi utilizada para calcular a concentração de P₄ nas amostras, segundo a absorbância das mesmas.

As amostras sofreram diluições, em duplicata, em álcool/água, sempre que necessário para que a absorvância estivesse entre 20 e 80%.

A absorvância das amostras diluídas foi obtida em 244 nm. A absorvância média das duplicatas foi convertida à concentração de P₄, utilizando-se a equação da curva padrão. Na seqüência, multiplicou-se o valor pela diluição e pelo volume da cuba, obtendo-se assim, a quantidade acumulada de P₄ liberada pelo dispositivo. Este valor foi dividido pela área do dispositivo, para obter a quantidade de P₄ liberada, por cm² de área do dispositivo.

Obtidas as concentrações de P₄ das amostras, foi confeccionado um gráfico, no qual a raiz quadrada do tempo ocupou as abcissas e as concentrações de P₄ por cm² de área do dispositivo ocuparam as ordenadas. Calcularam-se as equações de regressão segundo dispositivo.

Com base na quantidade acumulada de P₄ liberada, calcularam-se as quantidades de P₄ liberadas a cada 24 horas do teste *in vitro*. Isto possibilitou a confecção de um histograma onde os intervalos de tempo (0 a 24, de 24 a 48, de 48 a 72, e de 72 a 96 h) foram colocados nas abcissas e a quantidade de P₄, nas ordenadas.

5.1.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 1985), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE).

As equações de regressão foram obtidas utilizando-se o PROC REG do SAS, num modelo linear $y = a + bx$, onde se obtiveram os coeficientes de determinação (R^2) e a probabilidade de efeito linear. As comparações (3 a 3) dos coeficientes angulares (slopes) foram realizadas pelo PROC GLM do SAS.

Os coeficientes foram indicativos da velocidade de liberação de P_4 dos dispositivos e foram expressos em μg de P_4 por cm^2 , em função da raiz quadrada do tempo.

A variável dependente “quantidade de P_4 liberada por dia (mg/dia)” foi submetida à Análise de Variância. À análise estatística desta variável foi ainda adicionado o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos 4 intervalos de 24h. As probabilidades de interações com tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). Quando houve interação entre tempo e tratamento, as médias dentro tempo foram analisadas pelo teste de Tukey. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi de 5%.

5.2 ENSAIO *IN VIVO*

5.2.1 Delineamento Experimental

Utilizou-se um delineamento alternado com seqüência não balanceada (cross-over), adicionado de medidas repetidas no tempo, referentes aos 16 dias de colheita das amostras de sangue.

5.2.2 Animais, Tratamentos e Dosagem de P₄

Seis animais de cruzamento, com predominância de sangue zebuino (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*), foram ovariectomizados, pelo flanco esquerdo, seguindo procedimentos adequados de assepsia e anestesia. Durante todo o experimento, os animais receberam sal mineral *ad libitum* no cocho e ficaram em piquetes de Braquiarião (*Brachiaria brizanta* cv *marandu*) e suplementados com cana de açúcar e concentrado segundo exigências encontradas no NRC (2001).

Antes do início do experimento, todos os animais vieram, durante 7 dias, ao curral, foram contidos e depois soltos, visando acostumá-los à rotina das colheitas.

Foram comparados os teores plasmáticos de P₄, por rádio- imuno-ensaio (RIA), quando o DIB[®] e o novo dispositivo foram introduzidos na vagina onde permaneceram por 16 dias seguidos.

Quatro animais receberam o DISP 8 e dois animais receberam o DIB[®] (Syntex, Argentina) .

Após a primeira etapa, aguardou-se um período de 40 dias e o experimento foi repetido. Sendo que os animais que receberam o dispositivo DIB[®] foram agora tratados com o DISP 8, mantendo a divisão dos grupos: 2 animais com o dispositivo DIB[®] e 4 com o DISP 8.

Foram colhidas amostras de sangue, em frascos tipo vacuntainer[®](Becton Dickinson Company, EUA) com anticoagulante EDTA nos seguintes momentos: 0,2,4,8,12,24,48,96,144,192,240,288,336 e 384 horas.

As amostras foram centrifugadas por 1500 g a 4°C por 15 minutos (Sorvall® RC3 Plus,EUA) e o plasma foi congelado até o momento das análises por RIA, utilizando o kit comercial da DPC (Diagnostics Products Corporation,EUA).

5.2.3 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 1985), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE).

As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). As médias das amostras foram analisados pelo teste de Tukey. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

Foi realizada dosagem por espectrofotometria em comprimento de onda de 244 nm (Shimatzu[®] UV 1203), e a absorbância das amostras foi convertida à concentração de progesterona com base em uma curva padrão. (Figura 6).

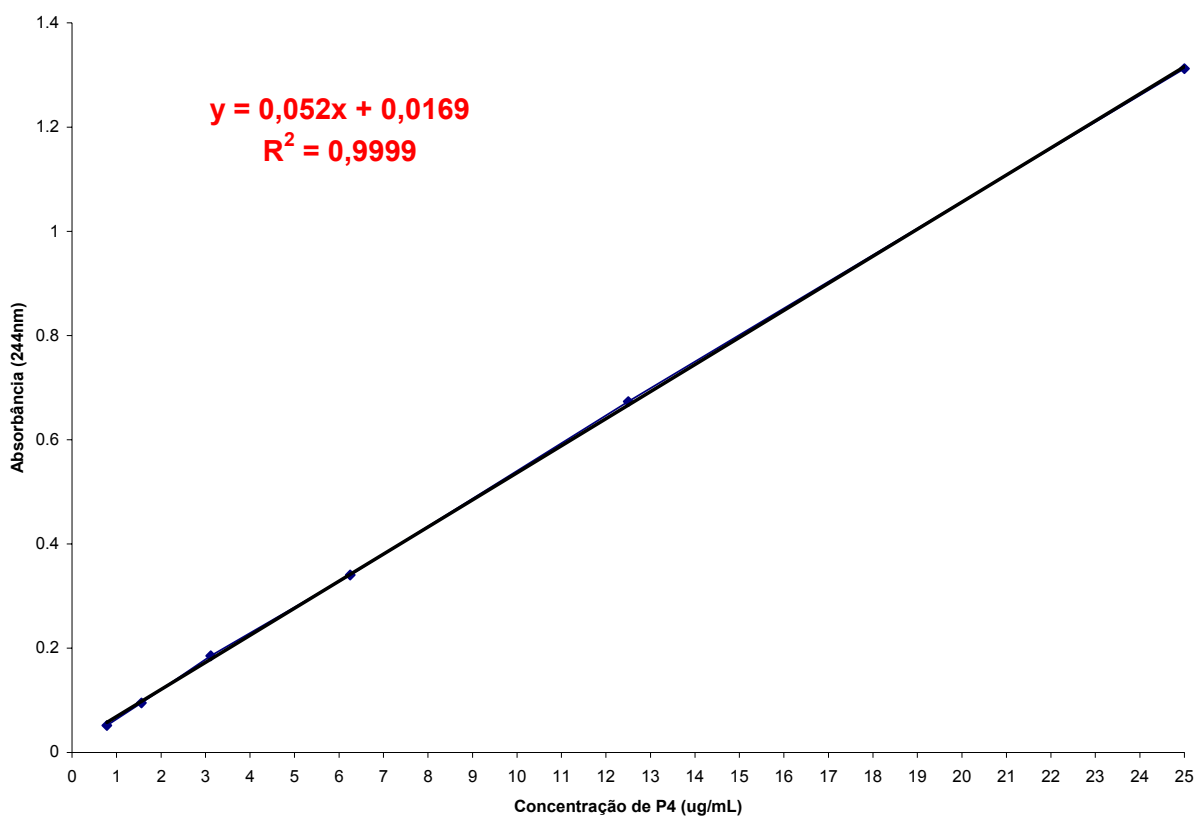


Figura 6- Curva Padrão de P₄ do ensaio 1(Shimatzu[®] UV 1203)

6.1.1 Peso dos Dispositivos e Quantidade de P₄

Os pesos dos dispositivos foram $16,4 \pm 0,6$ e $16,3 \pm 0,7$ g para DISP 8 e DISP 10 respectivamente. A quantidade de P₄ estimada foi de 1,31g para o DISP 8 e 1,63g para o DISP 10.

6.1.2 Liberação de P₄ em Função da Área dos Dispositivos

Como não houve interação entre bloco e dispositivo, nem efeito significativo de bloco, os resultados dos dois ensaios foram agrupados. Entretanto, no ensaio 1 houve a perda dos resultados referentes a um dispositivo DIB[®]. Portanto as médias \pm EP foram calculadas com base em 4 DISP 8, 4 DISP 10, mas apenas 3 DIB[®].

As médias das quantidades de P₄ liberada por cm² de área, de cada dispositivo, em função da raiz quadrada do tempo encontra-se na figura 7.

As comparações (3 a 3) dos coeficientes angulares (slopes) estão apresentados na tabela 1.

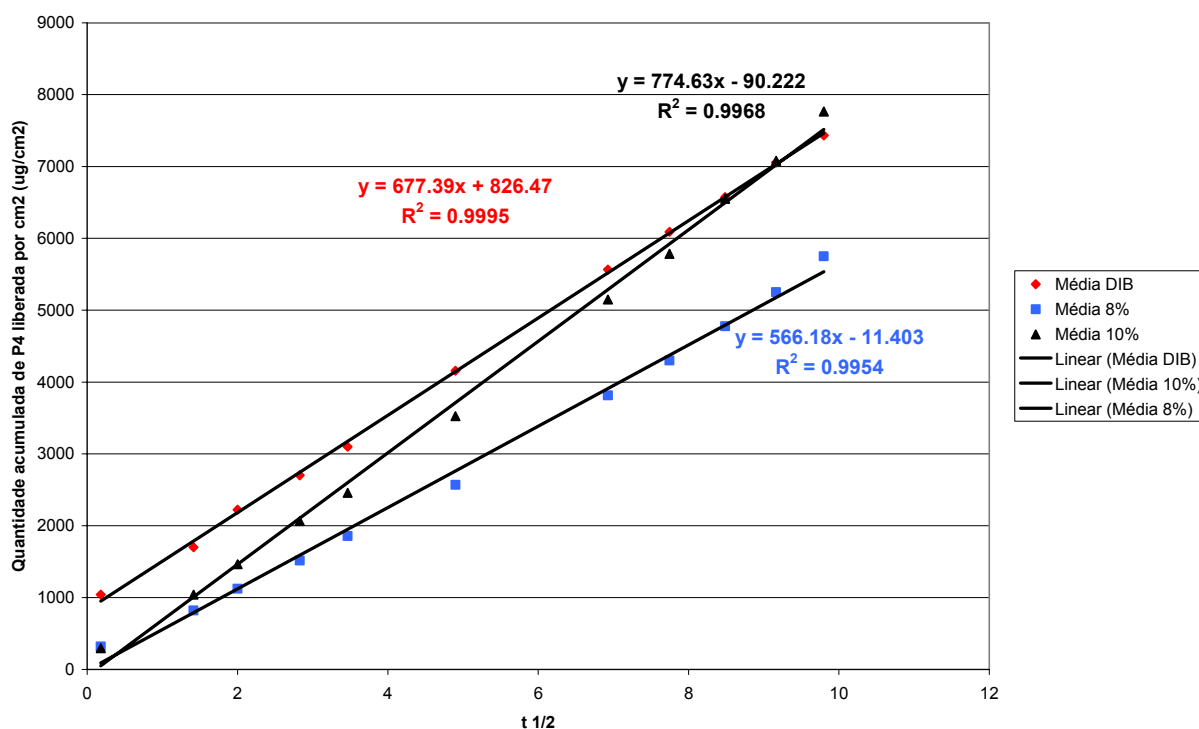


Figura 7 - Médias das quantidades acumuladas média de Progesterona liberadas por cm² em função da raiz quadrada do tempo, segundo dispositivo. Pirassununga,2006

As médias \pm EP dos slopes foram de $677,39 \pm 16.13 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ para o DIB[®], $566,17 \pm 3.68 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ para o DISP 8 e $774,63 \pm 45.26 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ para o DISP 10. Houve diferença estatística entre os dispositivos DISP 8 e DISP 10, mas não entre o DIB[®] e os outros dispositivos.

Tabela 1- COMPARAÇÃO DOS COEFICIENTES ANGULARES (SLOPES)($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$)

	Tratamentos		
	DIB [®]	8%	10%
Média	677,39 ^{a,b}	566,17 ^b	774,63 ^a
Erro Padrão	16.13	3.68	45.26
	Probabilidades		
Bloco	0,2171		
Tratamento	0,0031		

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p \leq 0,25$).

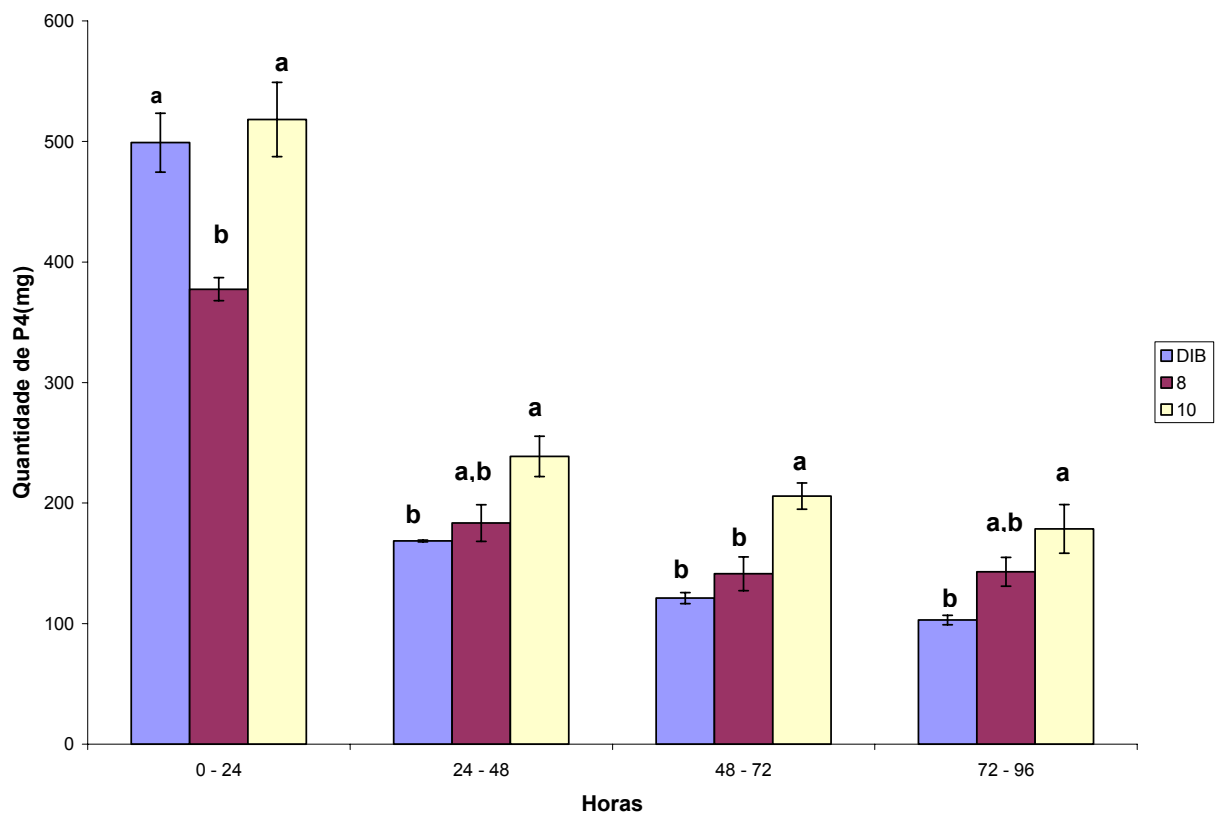


Figura 8 - Quantidades de P₄ liberadas em intervalos de 24, nos testes *in vitro*. Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey

6.2 EXPERIMENTO *IN VIVO*

Com base nos resultados dos ensaios *in vitro*, optou-se por utilizar o DISP 8, mantendo o DIB[®] como controle nos ensaios *in vivo*. Tal escolha foi baseada no fato que a velocidade de liberação do DISP 8 não diferiu da do DIB[®] e a quantidade diária de P₄ também se manteve muito próxima à liberada pelo DIB[®], no intervalo 72 a 96 hs do teste *in vitro*

6.2.1 Resultados

Como demonstrado na tabela 3 e ilustrado na figura 9, a média das concentrações plasmáticas de P₄ nas 384 horas do ensaio foi de 4,06 ± 0,27 ng/mL para o DISP 8 e 4,94 ± 0,5 ng/mL para o DIB[®], não havendo diferença estatística entre eles (p>0.05).

Tabela 3 - Concentração plasmática de progesterona (ng/mL) (X ± EP)

Horas	Tratamento		Probabilidades
	DIB [®]	DISP 8	
0	0,783 ± 0,40	0,91 ± 0,19	0.896
2	9,82 ± 1,21	8,27 ± 1,21	0.124
4	11,45 ± 1,96	9,23 ± 1,15	0.027
8	10,48 ± 1,85	9,18 ± 0,729	0.196
12	8,98 ± 0,72	7,42 ± 0,64	0.122
24	7,30 ± 0,93	5,65 ± 0,56	0.101
48	4,83 ± 0,42	3,86 ± 0,31	0.334
96	3,29 ± 0,39	2,58 ± 0,10	0.480
144	2,75 ± 0,24	1,93 ± 0,16	0.410
192	2,44 ± 0,09	1,89 ± 0,13	0.584
240	2,13 ± 0,18	1,72 ± 0,14	0.686
288	1,84 ± 0,18	1,56 ± 0,12	0.781
336	1,53 ± 0,09	1,38 ± 0,13	0.885
384	1,56 ± 0,09	1,21 ± 0,09	0.732
Média	4,94 ± 0,50	4,06 ± 0,27	0.138

Greenhouse-Geisser Epsilon = tempo x tratamento = p=0,5952

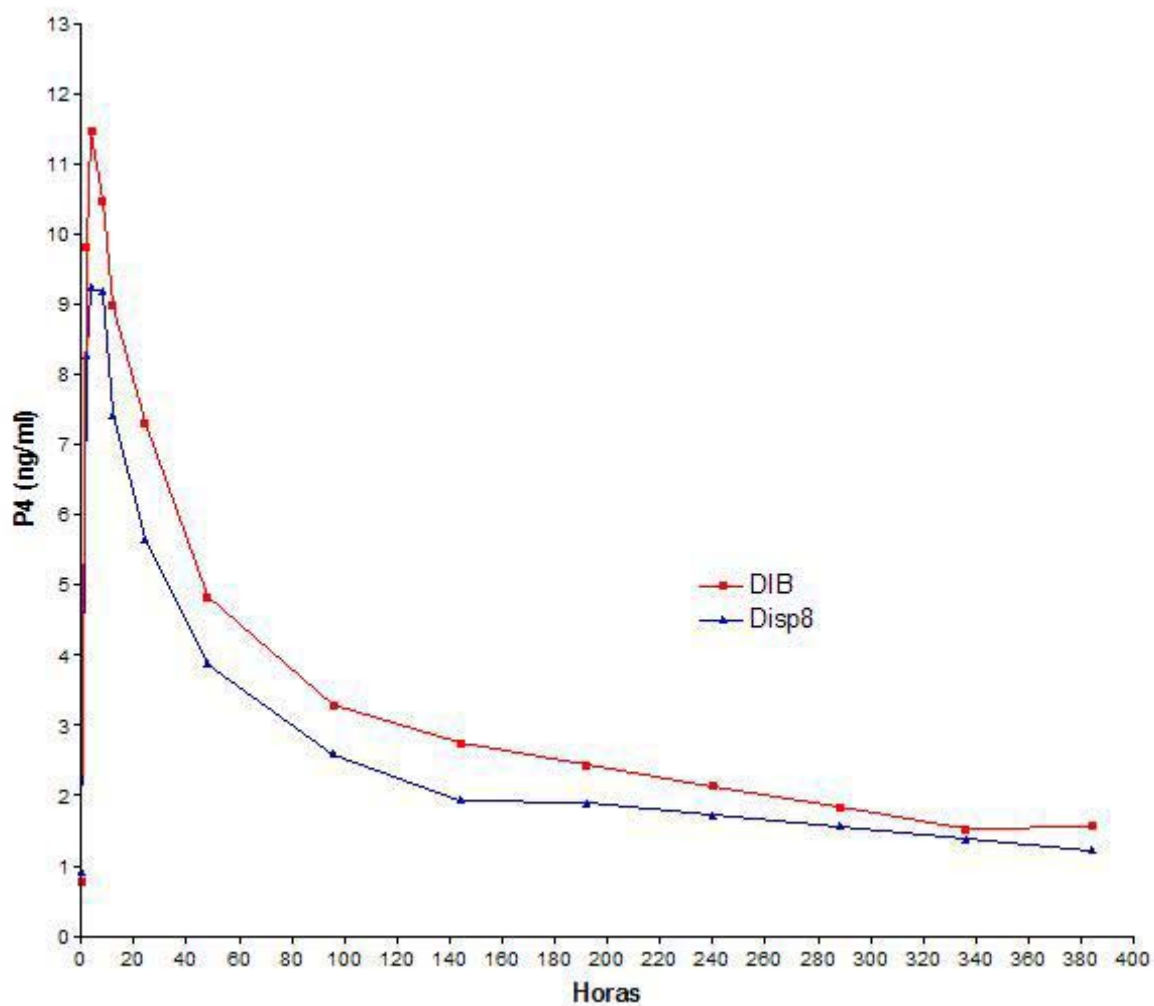


Figura 9 - Concentração plasmática de progesterona (ng/mL)

Na figura 10, encontram-se as médias das concentrações de P₄ nas primeiras 24 horas após a colocação dos dispositivos.

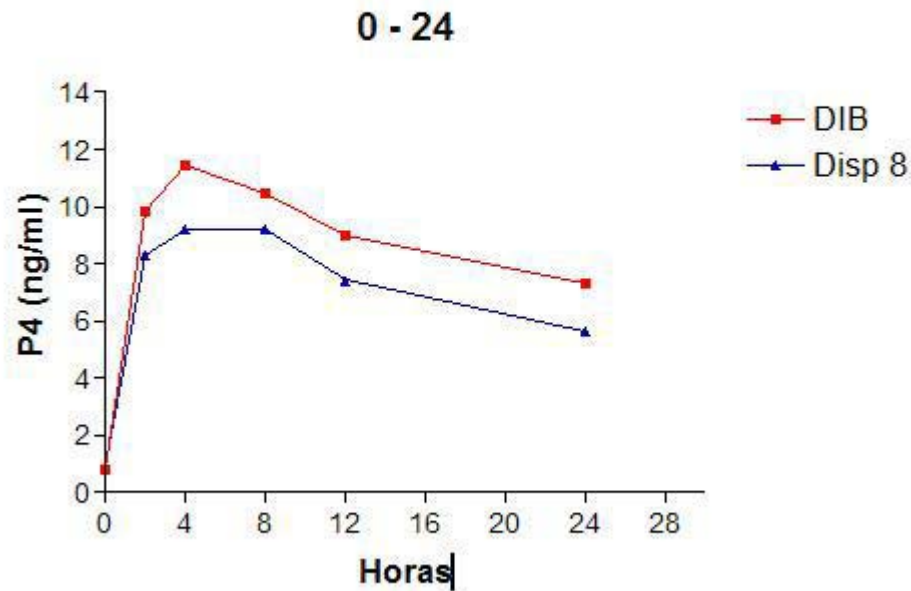


Figura 10- Concentração plasmática de progesterona 0-24 horas (ng/mL)

A concentração máxima de P₄ ocorreu 4 h após a colocação dos dispositivos, tanto para o DIB[®] quanto para o DISP 8. Entretanto, a concentração máxima foi de $11,45 \pm 1,96$ ng/mL para o DIB[®] e de $9,23 \pm 1,15$ ng/mL para o DISP 8 ($p < 0,05$) (gráfico 5)

Após 16 dias de ensaio *in vivo*, todos os dispositivos permaneceram nos animais. Porém, com exceção do DIB[®], todos sofreram deformações como ilustrado nas figuras 11 e 12.



Figura 11 - Dispositivos Disp 8 e DIB[®] , após a retirada em ensaio com 384 horas;
Pirassununga,2006

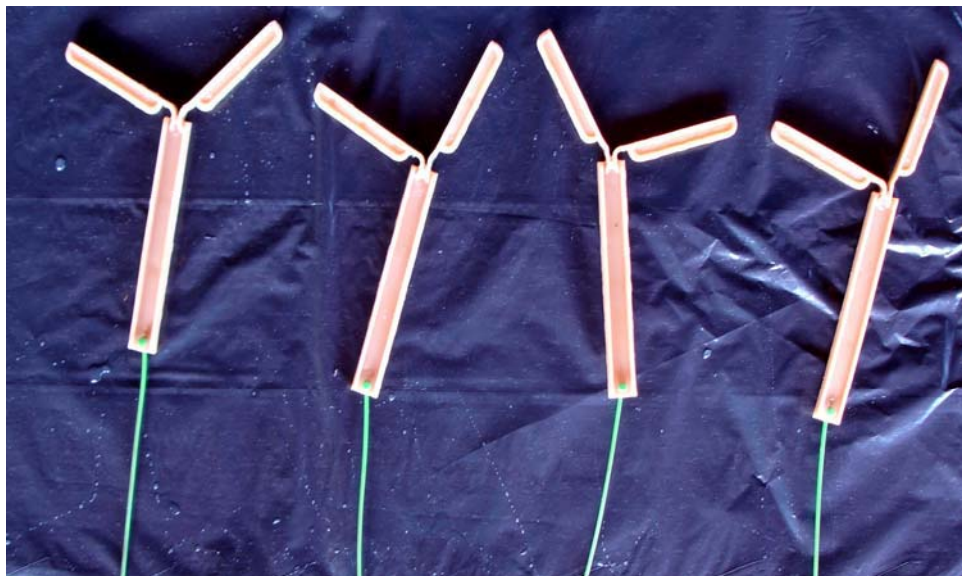


Figura 12- Dispositivos DISP 8 após a retirada em ensaio de 384 horas;
Pirassununga, 2006

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

7.1 ENSAIOS *IN VITRO*

No presente estudo, os dispositivos vaginais empregados seguiram o modelo matemático da equação de Higuchi ($Q_t = K_H \sqrt{t}$), onde a quantidade de P_4 liberada por cm^2 se deu em função da raiz quadrada do tempo. As diferenças entre os dispositivos foram analisadas pelos coeficientes angulares (slope). Os slopes do DISP8 ($566,17 \pm 3,68 \mu\text{g}/\text{cm}_2/\text{t}^{1/2}$) e do DISP10 ($774,63 \pm 45,26 \mu\text{g}/\text{cm}_2/\text{t}^{1/2}$) diferiram estatisticamente entre si, ou seja a maior quantidade de P_4 , contida no DISP10 foi suficiente para aumentar a velocidade de liberação. Entretanto, o DIB ($677,39 \pm 16,13 \mu\text{g}/\text{cm}_2/\text{t}^{1/2}$) apresentou uma velocidade de liberação intermediária e não diferente dos demais. Pela figura 4, pode-se notar que as curvas de regressão do DIB e do DISP8 foram praticamente paralelas e que para que as quantidades de P_4 liberadas diariamente fossem muito semelhantes, bastariam pequenos acertos no tamanho do dispositivo, ou seja em sua área superficial. O DISP 8 possui uma área de 147 cm^2 enquanto o DIB possui 120 cm^2 . Esta diferença na área foi suficiente para compensar a menor velocidade de liberação e possibilitar um ajuste nas quantidades de P_4 liberadas por dia, como pode ser visto na figura 7.

Bunt et al. (1997) estudaram a liberação *in vitro* de dispositivos CIDR, em condições muito semelhantes às do presente estudo e obtiveram slope médio de $1.228 \pm 52 \mu\text{g}/\text{cm}_2/\text{t}^{1/2}$, velocidade esta, maior do que as observadas neste estudo. Estes autores também observaram que a velocidade de liberação aumentou em função da raiz quadrada do dobro da quantidade inicial de P_4 , contida no dispositivo. De fato, ao se considerar o DIB, a liberação do CIDR é maior, embora ambos sejam

feitos do mesmo material, o silicone e possuam a mesma área, 120 cm². Neste caso, a quantidade de P₄ do CIDR (1,9 g) é praticamente o dobro da do DIB (1,0 g) e isto parece explicar as diferenças de liberação.

Rathbone et al. (2002b) compararam os slopes dos dispositivos confeccionados em PCL, e 10% de P₄, com o do CIDR e verificaram que eles foram semelhantes e se mantiveram ao redor de 1.300 µg/cm₂t^{1/2}.

Burggraaf et al. (1997) compararam CIDRs com formulações diferentes em testes *in vitro* e *in vivo* e concluíram que o teste *in vitro* é mais eficiente para identificar pequenas diferenças entre os dispositivos testados, visto que no ensaio *in vivo*, realizado por estes pesquisadores, não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

No presente estudo, foram utilizados biopolímeros como plataforma de liberação sustentada de P₄ e o mecanismo pelo qual a P₄ se move no polímero ou silicone parece ser devido às diferenças no gradiente de concentração. Entretanto, a liberação de esteróide em biopolímero não pode ser considerada de maneira simplista. Trata-se de moléculas com estruturas químicas complexas.

Além da difusão entre os sólidos, que talvez possa ser desconsiderada, existe a difusão dos mesmos no meio usado no ensaio *in vitro* (álcool/água 60/40% por exemplo) ou na corrente sanguínea do animal, no qual o dispositivo foi inserido. Assumindo a hipótese mais simples, em que o único sólido que se difunde no meio é a progesterona, pode-se considerar que a primeira lei da difusão de Fick (BIRD et al., 2004) seja válida. Essa lei é válida para qualquer mistura binária sólida, líquida, ou gasosa, desde que o soluto (progesterona) mova-se bem devagar e a sua concentração seja muito pequena, de modo que, durante o processo de difusão

possa ser considerado não-nulo. A primeira lei de difusão de Fick na forma unidimensional é dada pela seguinte equação matemática:

$$j_{Ay} = -\rho D_{AB} \frac{\partial \omega}{\partial y}$$

em que j_{AY} representa o fluxo molar de massa de progesterona, ρ é a densidade do sistema progesterona-sangue, sendo D_{AB} o fator de proporcionalidade, conhecido como difusividade do sistema progesterona-meio e ω_A é fração mássica de progesterona.

Rathbone et al. (2002a) utilizaram cortes seqüenciais, com 100 μm de espessura, do dispositivo CIDR submetidos ao teste de liberação *in vitro* por diferentes períodos de tempo. Dosaram a concentração de P_4 nestes cortes e verificaram uma zona de depleção da droga que aumentou à medida que a liberação ocorreu. A formação desta zona de depleção é sugestiva da liberação em função da raiz quadrada do tempo, como pode ser confirmada pela equação de regressão obtida.

A velocidade de liberação parece ser inerente ao material empregado na confecção das matrizes, mas a manipulação de uma série de fatores pode auxiliar no controle da liberação, ajustando-a às várias necessidades. Burggraaf et al. (1997) compararam CIDRs produzidos com diversos lotes de silicone, contendo ou não 10% de carbonato de cálcio e progesterona micronizada ou não e encontraram os seguintes resultados: o CIDR contendo P_4 não micronizada liberou mais lentamente que o CIDR com P_4 micronizada, com slopes de $1078 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ e $1088 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$, respectivamente. Entretanto, a adição de um aditivo inerte (carbonato de cálcio) no silicone diminuiu a taxa de liberação de P_4 no CIDR. Outros autores já haviam observado uma diminuição na taxa de liberação de esteróides, misturados

em uma matriz de silicone, quando aditivos inertes foram adicionados. Concluiu-se que esta adição aumenta a distância que a molécula do esteróide tem que percorrer até a superfície do silicone, diminuindo com isto a velocidade de liberação (PFISTER et al., 1987).

No presente estudo não foram utilizados aditivos para auxiliar no controle da liberação de P₄, porém a P₄ utilizada era micronizada.

A espessura das matrizes é uma variável muito importante a ser considerada. Com base em ensaios piloto, Madureira et al. (2006) (dados não publicados) verificaram que corpos de prova com mais do que 2 mm de espessura não liberavam mais P₄ do que os que possuíam espessura máxima de 2 mm. Considerou-se que a P₄ teria dificuldade de se mover por uma distância maior do que 1 mm, em dispositivos confeccionados com PHB/PCL e por isso, tomou-se o cuidado de se manter uma espessura de 2 mm em quase toda a peça. Entretanto, estas observações necessitam de confirmação em estudos posteriores.

7.1.1 Quantidade de P₄ liberada a cada intervalo de 24h do teste in vitro

Nas primeiras 24 horas do teste *in vitro* o DISP 8 liberou significativamente menos P₄ do que o DISP 10 e o DIB (Tabela 2). Uma maior liberação nas primeiras 24 horas do teste não representa nenhuma vantagem do ponto de vista fisiológico. Pelo contrário, representa um desperdício de P₄. De fato, tanto o DIB quanto o DISP8, testados neste estudo, proporcionaram teores plasmáticos de P₄ muito superiores aos realmente necessários, nas primeiras 24 h após serem introduzidos

na vagina. Portanto, a menor quantidade de P_4 liberada pelo DISP8, neste período, se traduz numa vantagem, pois há economia de P_4 e evita que o animal receba, desnecessariamente, doses excessivas, no início do tratamento.

O DISP 10 liberou significativamente mais P_4 do que o DIB nos outros três períodos de 24 h considerados. Quando comparado com o DISP8, o DISP10 liberou significativamente mais P_4 somente entre 48 e 72h; nos demais períodos, as diferenças não foram significativas, mas numericamente, se mantiveram liberando mais P_4 que o DISP8, como pode ser visto na figura 8. As diferenças entre DISP8 e DISP10 dizem respeito à quantidade inicial de P_4 , uma vez que ambos foram feitos com a mesma composição polimérica e possuíam a mesma área.

No atual estudo, o DIB liberou, no total das 96 horas do ensaio, 890 mg de P_4 , representando 89,1% do total inicial. O DISP 8 liberou 845 mg de P_4 , o que representou 64,5% da quantidade inicial estimada pelo peso. O DISP 10, que foi o dispositivo com a maior quantidade inicial de P_4 (1,63g), liberou 1.140 mg de P_4 , representando 69,9% do total, que é uma quantidade intermediária, em comparação aos outros e manteve a liberação acima deles. Isto pode ser explicado pelo modelo proposto por Rathbone et al. (2002a), onde a P_4 se organiza em camadas na matriz polimérica e o aumento da concentração leva a uma maior liberação inicial, propiciada pela P_4 mais superficial e a manutenção da taxa de liberação, no momento em que as partículas mais profundas forem sendo liberadas.

Entende-se que a maior velocidade de liberação e as maiores quantidades de P_4 liberadas nos intervalos estudados não deve representar vantagens a favor do DISP 10.

Por fim, o paralelismo entre as curvas de regressão do DISP 8 e do DIB e ainda pelo fato das quantidades de P_4 liberadas em cada intervalo de 24 horas do

teste *in vitro* serem parecidas com a liberação pelo DIB, optou-se por utilizar o DISP 8 no teste *in vivo*.

7.2 ENSAIO *IN VIVO*

Durante os procedimentos deste experimento, foram tomados alguns cuidados para que não houvesse contaminação dos frascos de colheita das amostras tais como: a pessoa que introduziu o dispositivo, em momento algum segurou as amostras; durante todo o ensaio, houve a preocupação de que a pessoa que fosse manejar os animais (tocar, fechar, soltar) não coletaria as amostras; para evitar que houvesse contaminação de progesterona (P_4) na colheita, as punções foram realizadas na veia jugular e não na coccígea.

7.2.1 Teores basais de P_4 em vacas ovariectomizadas

Imediatamente antes da colocação dos dispositivos nas vacas ovariectomizadas, o teor médio de P_4 encontrado foi de $0,87 \pm 0,62$ ng/mL.

Em estudo conduzido por Hollenstein et al. (2005) em vacas holandesas, foram encontrados teores de $0,3 \pm 0,04$ ng/mL de P_4 . Pode-se observar que os teores plasmáticos de P_4 no tempo zero foram maiores do que os encontrados por Hollenstein et al. (2005). Além disto, o desvio padrão também foi muito grande, o que expressa a grande variação que houve nos teores de P_4 no tempo zero, em vacas ovariectomizadas. De fato, estes teores variaram de 0,11 a 1,96 ng/mL de P_4 .

Segundo Hollenstein et al. (2005), animais ovariectomizados podem apresentar baixos teores circulantes de P_4 e atribuíram a síntese desta P_4 à supra renal. Estes mesmos autores encontraram teores de P_4 da ordem de $1,2 \pm 0,15$ ng/mL, nas vacas ovariectomizadas, submetidas ao estresse. No presente estudo, foram utilizadas vacas mestiças zebuínas, que possuem temperamento mais agressivo e, portanto, mais sujeitas ao estresse. Isto pode, ao menos em parte, explicar o porquê da ocorrência de teores relativamente elevados de P_4 em vacas ovariectomizadas.

7.2.2 Aspectos gerais dos perfis de P_4

De um modo geral, analisando-se os perfis, durante todo o período experimental, observou-se que ocorreu rápida elevação dos teores plasmáticos de P_4 , que atingiram um pico, cerca de 4 horas após a colocação. Este período foi seguido por uma queda constante, porém lenta dos teores de P_4 (Figuras 9 e 10). O perfil do DISP 8 não diferiu do proporcionado pelo DIB, sendo que os teores de P_4 só foram estatisticamente diferentes, no tempo 4 horas após o início do experimento (Tabela 3).

Rathbone et al. (2002) realizaram experimento bastante semelhante e compararam o perfil plasmático de P_4 , em vacas ovariectomizadas, tratadas por CIDR, ou por um novo dispositivo, cuja matriz foi composta por PCL. Também observaram o mesmo padrão de perfil plasmático, com significativa elevação inicial e um gradual declínio das concentrações até o final do período experimental.

Este também foi o perfil observado por Valentin (2004), em vacas ovariectomizadas, tratadas com CIDR, DIB, ou com outros dois tipos de dispositivos vaginais, confeccionados com silicone (50 cm² de área com 1,5 ou 1,0 g de P₄).

De certa maneira, este padrão de perfil plasmático pode ser explicado pelo que ocorreu *in vitro*, uma vez que os mesmos obedeceram à equação de Higuchi ($Q_t = K_H \sqrt{t}$), segundo a qual a liberação se dá em função da raiz quadrada do tempo. Assim, é de se esperar que os teores de P₄ sejam maiores no início e diminuam à medida que se aproxima o final do período de tratamento.

De fato, Rathbone et al. (2002a) plotaram a quantidade de P₄ liberada *in vitro* contra a raiz quadrada do tempo e obtiveram uma curva de aparência linear e alto valor de R² (R²=0,992). Também obtiveram fatias seqüenciais, com 100 µm de espessura, de dispositivos CIDR, previamente deixados na cavidade vaginal por vários dias. Observaram um gradiente de concentração de P₄, desde as partes mais profundas até as mais superficiais. Isto é sugestivo que a liberação de P₄ se daria por um mecanismo de ordem zero. Estes dados foram matematicamente descritos por uma equação linear e o alto valor de R² obtido (R²=0,989) sugere que um mecanismo de ordem zero poderia ser utilizado para demonstrar a liberação *in vivo* de P₄ do CIDR. No presente estudo apenas o modelo de liberação *in vitro* do DISP 8 foi obtido. Se a liberação *in vivo* segue o mesmo modelo de liberação *in vitro*, ou à semelhança do CIDR, segue um modelo de liberação de ordem zero, permanece como importante objeto de estudo em experimentos futuros.

Portanto, os perfis de P₄ plasmática obtidos pelo emprego de vários dispositivos vaginais são semelhantes e seguem um padrão bastante dependente da velocidade de liberação, que em última análise é uma propriedade inerente às matrizes utilizadas.

Entretanto, as concentrações de P₄ no plasma sanguíneo dependem de vários fatores além da velocidade de liberação, entre os quais se destacam: a área e a espessura da matriz polimérica, a concentração de P₄ nesta matriz, grupo genético dos animais empregados nos testes, distribuição da P₄ nos demais compartimentos corpóreos e a capacidade de bio-transformação de P₄.

Rathbone et al. (2002a) concluíram que as diferenças nos teores de P₄ verificadas poderiam ser explicadas pelas diferenças de área e concentração de P₄ dos dois dispositivos testados. Valentim (2004) encontrou uma forte relação entre os teores plasmáticos de P₄ e a área e a concentração de P₄ na matriz de silicone. Apresentou uma equação de regressão na qual para cada cm² de aumento na área, houve um acréscimo de 0,0343 ng/mL às 24 horas e de 0,00056 ng/mL após sete dias de inserção. Entretanto, no momento da retirada dos implantes, as concentrações parecem ser mais influenciadas pela concentração de P₄ na matriz do que pela superfície de contato.

Os níveis de P₄ encontrados na circulação também estão sujeitos à metabolização deste hormônio nos animais. A meia vida da P₄ nos bovinos é de apenas 22 a 36 minutos nas vacas (MCDONALD, 1983). Sabe-se que os esteróides são metabolizados no fígado (SANGSRITAVONG, 2002) e com isto, sempre que houver um aumento de fluxo sanguíneo a este órgão, poderá haver um aumento na metabolização da P₄. Em vacas de leite mantidas em pastagens e tratadas com fonte de progesterona exógena (CIDR), as concentrações de P₄ são mais baixas nas vacas com alimentação *ad libitum*, do que nas que estiverem sofrendo restrição alimentar (RABIEE et al., 2001). Porém, nas vacas tratadas com CIDR, com diferentes níveis de produção de leite, não houve diferença na concentração de progesterona circulante. Similarmente, o aumento do plano alimentar em marrãs

ovariectomizadas, aumentou proporcionalmente a taxa de metabolização da P₄ e o fluxo sanguíneo no sistema porta hepático (PRIME e SYMONDS, 1993).

7.2.3 Teores de P₄ no momento de pico

No presente estudo, os teores máximos atingidos pelos dispositivos diferiram significativamente (11,45±1,96 vs 9,23± 1,15 ng/mL, respectivamente para DIB e DISP 8; p=0,027 – Tabela 3). Para ambos os dispositivos, a concentração máxima de P₄ foi atingida 4 horas após terem sido colocados na cavidade vaginal.

Rathbone et al. (2002), ao compararem os teores plasmáticos de P₄ de vacas que receberam um dispositivo confeccionado com PCL (2,2g de P₄ e área de 142 cm²) ou CIDR (1,9 g de P₄ e 120 cm² de área), verificaram que as concentrações máximas foram menores e o tempo para atingí-las foi maior do que os encontrados neste estudo. O CIDR atingiu concentração máxima de 5,1 ng/mL, 14,4 h após ter sido colocado, enquanto que o dispositivo à base de PCL atingiu a concentração máxima de 5,3 ng/mL após 9,6 horas.

Santos et al. (2004) realizaram um estudo para determinar os perfis plasmáticos de P₄, proporcionados por vários dispositivos comercialmente disponíveis. Compararam o CIDR com 1,38 g de P₄, CIDR com 1,9 g de P₄, Cronipres, DIB e PRID, em animais cíclicos, previamente sincronizados para o D7 do ciclo estral, quando todas as vacas receberam uma aplicação de PGF_{2α}. Os dispositivos foram colocados no D8 e as amostras de sangue colhidas 0,1,4,8,12 horas e de 2 em 2 dias até 25 dias após a inserção dos dispositivos. Na primeira

hora após a inserção já foram obtidas as concentrações máximas, com exceção do PRID ($6,3 \pm 0,63$ ng/mL) que só atingiu a concentração máxima decorridas 8 horas da colocação. As concentrações máximas encontradas em ng/mL foram de $10,2 \pm 1,01$ para o CIDR 1,38; $6,8 \pm 0,86$ para o CIDR 1,9; $6,4 \pm 0,86$ para o CRONIPRES e $6,4 \pm 0,80$ para o DIB.

No estudo realizado por Valentin (2004) o DIB atingiu $4,5$ ng/mL após 24 horas de inserção, menor do que o observado neste estudo para o DIB ($7,30 \pm 0,93$ ng/mL) que foi utilizado como controle. Entretanto, Valentin (2004) iniciou as colheitas, 24 h após a colocação dos dispositivos e, portanto, não há informação sobre os teores de P_4 que ocorreram antes de 24 h.

Apesar das diferenças encontradas entre dispositivos e entre os diferentes experimentos, pode-se afirmar que todos eles, inclusive o DISP 8, proporcionaram elevados teores de P_4 rapidamente após o início dos tratamentos. Portanto, as diferenças dos teores observados no momento de pico, ou mesmo as referentes ao tempo necessário para atingí-las, não parecem ser limitantes.

7.2.4 Teores de P_4 no D8

Nos programas de IATF, geralmente se empregam tratamentos com duração de 7 ou 8 dias, portanto uma preocupação bastante pertinente diz respeito à capacidade dos dispositivos proporcionarem teores de P_4 de pelo menos 1ng/mL no D8.

No presente estudo, as concentrações de P_4 no D8 não foram estatisticamente diferentes e foram de $1,89 \pm 0,13$ e $2,44 \pm 0,09$ ng/mL para o DISP 8 e DIB, respectivamente. Dados semelhantes foram encontrados por Valentin(2004) que produziu dispositivos com concentrações diferentes (1,5 e 1,0 g de P_4 , P50-1,5 e P50-1,0 respectivamente) e comparou com o CIDR 1,9 g e DIB e obteve teores plasmáticos de P_4 no dia 8 de $3,3 \pm 0,7$ ng/mL para o CIDR; $2,6 \pm 2,0$ ng/mL para o DIB; $3,0 \pm 2,4$ ng/mL para o P50-1,5 e $1,1 \pm 0,27$ ng/mL para o P50-1,0. Os teores plasmáticos de P_4 no D8, encontrados por este pesquisador, para o DIB, foram muito semelhantes aos encontrados, neste estudo, para o DIB. Rathbone et al. (2002b) encontraram teores em torno de 2,0 ng/mL para o CIDR com 1,9g de P_4 , e no mesmo ano, em outro experimento detectaram 2,5 ng/mL, também utilizando o CIDR com 1,9g de P_4 . Burggraff et al. (1997), trabalhando com dois diferentes tipos de silicone na manufatura do CIDR com 1,9g de P_4 , encontraram teores em torno de 2,0 ng/mL. Macmilam et al. (1991) detectaram teores em torno de 3,2 ng/mL de P_4 , no dia 8, utilizando CIDR com 1,9g de P_4 , porém neste caso, a técnica de RIA utilizada para dosar a P_4 foi diferente, o que pode impedir comparações diretas, com os resultados do presente estudo.

Segundo Rathbone et al. (2002b), seria recomendável que um dispositivo proporcionasse pelo menos um teor de P_4 de 2,0 ng/mL no momento de sua retirada. Neste sentido, tanto o DISP 8 quanto o DIB, utilizados neste estudo, ou ainda o CIDR (1,25 ou 1,99 g de P_4), ou o P50 (1,0 ou 1,5 g de P_4), utilizados nos experimentos descritos acima, atenderiam aos requisitos sugeridos. Entretanto, com base nos resultados de Carvalho (2004), novilhas tratadas com CIDR, tiveram taxa geral de ovulação relativamente baixa (65,7%). Isto é sugestivo de que teores de P_4 proporcionados pelo CIDR parecem ser superiores ao realmente necessário, para

maximizar o desenvolvimento do folículo, sem prejudicar a taxa de concepção. Neste mesmo experimento, a aplicação de PGF2 α , no momento da colocação do CIDR, diminuiu os teores de P₄ no D8, de 4,9 \pm 3,1 para 2,7 \pm 1,6 ng/mL e elevou as taxas de ovulação de 52,7% para 79,4%. Além disso, novilhas zebuínas apresentaram teores de P₄ significativamente maiores do que os das novilhas taurinas e cruzadas no D8. É interessante ressaltar que as taxas de ovulação também foram significativamente inferiores entre as novilhas zebuínas (39,1%) do que entre as taurinas (72,7%) ou cruzadas (84,0%). Carvalho (2004) atribuiu esta diferença entre grupo genético a uma menor capacidade de bio-transformação da P₄, ou a uma maior velocidade de absorção por parte de animais zebuínos. Ambas hipóteses carecem de análise mais aprofundada.

7.2.5 Teor de P₄ após o D8

As dosagens de P₄ se estenderam até o 16º dia após a colocação, com o objetivo de se saber se os teores de P₄ se manteriam suficientes para impedir a ovulação, possibilitando, assim, um segundo uso. Os teores de P₄, no 16º dia, do teste *in vivo*, foi de 1,56 \pm 0,09 ng/mL para o DIB e de 1,21 \pm 0,09 ng/mL para o DISP 8, sugerindo que a utilização de ambos os dispositivos em 2 protocolos de IATF, de 8 dias, pode ser viável.

No experimento conduzido por Santos et al. (2004), realizado em novilhas cíclicas, mantendo vários tipos de dispositivos inseridos no canal vaginal por 25 dias, foram encontradas concentrações de P₄, acima de 1 ng/mL, pelos 25 dias para o

CIDR 1,38; 25 dias para o CIDR 1,9; 15 dias para o CRONIPRESS; 13 dias para o DIB e 22 dias para o PRID.

Vários pesquisadores evidenciaram que os níveis de P_4 durante a fase luteínica interferem na freqüência dos pulsos de LH e conseqüentemente no crescimento e diâmetro do folículo dominante (BERGFELT et al., 1991; FORTUNE, 1993; SIROIS; FORTUNE, 1990). Burke et al. (1994) demonstraram que níveis elevados de P_4 exercem um efeito inibitório no crescimento folicular. Isto ficou evidente em um estudo realizado por Adams et al. (1992), ao observarem que, em ciclos estrais de 3 ondas de crescimento folicular, o diâmetro máximo do folículo da primeira onda é maior do que o da segunda onda. O folículo da primeira onda de crescimento encontra-se sob os efeitos de baixos teores de P_4 e, conseqüentemente, sujeitos a uma maior freqüência dos pulsos de LH, enquanto que o da segunda onda, está sob o efeito de elevados teores de P_4 , o que resulta em menor freqüência dos pulsos de LH.

Mantovani (2003) manteve o CIDR por 14 dias, associado à aplicação de $PGF2\alpha$, no início do tratamento, para induzir a formação de folículos persistentes. Isto levou à formação de folículos dominantes maiores do que os observados no grupo controle (CIDR por 8 dias) e atribuiu o fato, ao crescimento dos folículos em um ambiente com concentrações sub-luteínicas de P_4 , que segundo Fortune e Rivera(1999) estão entre 1 e 2 ng/mL e portanto em um ambiente de elevada freqüência de LH.

Embora o DISP 8 tenha proporcionado teores de P_4 superior a 1 ng/mL entre os dias 8 e 16 do período que permaneceram na cavidade vaginal, deve-se lembrar que na ocasião da segunda utilização, os teores de P_4 serão inferiores aos observados quando do primeiro uso. Isto certamente influenciara a freqüência de LH

e o desenvolvimento folicular, com reflexos na fertilidade que necessitaram ser estudados posteriormente.

7.2.6 Formato dos dispositivos após o uso

Os dispositivos permaneceram na cavidade vaginal por 384 horas (Figuras 11 e 12) e sofreram significativa alteração de seu formato, embora nenhum deles tenha sido perdido durante o experimento. Entretanto, a possibilidade de reutilização permanece na expectativa de uma alteração em seu formato, com manutenção da área de superfície e da espessura. Quando Rathbone et al. (2002b) desenvolveram e testaram um dispositivo com PCL, mediram a força necessária para sua deformação e posterior retorno ao formato original. Estes pesquisadores encontraram uma tensão de 4.02 kg que foi similar à encontrada para o dispositivo CIDR (3.08 Kg). Concluíram que não haveria dificuldades na manutenção dos dispositivos na cavidade vaginal dos animais. Posteriormente, realizaram um experimento com 700 animais, em três etapas, e obtiveram uma taxa de retenção de 97,2% para o CIDR e 99,7% para o dispositivo de PCL. Como não foram reutilizados os dispositivos não se sabe se houve deformações nas asas, com conseqüente prejuízo na taxa de retenção. No presente estudo, tanto o DIB quanto o DISP 8, mantiveram-se na vagina pelos 16 dias do período experimental, mas as deformações sofridas por este último foram evidentes.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados dos experimentos *in vitro* e *in vivo* podemos concluir que:

1. Dispositivos vaginais confeccionados com uma blenda dos polímeros PHB e PCL, em proporções iguais, podem liberar P₄ de maneira sustentada tanto quanto dispositivos confeccionados com silicone.
2. A porcentagem de P₄ na matriz polimérica (8 ou 10%) interferiu com a velocidade de liberação no teste *in vitro*.
3. A equação de Higuchi, segundo a qual a liberação de uma droga, de uma matriz polimérica, se dá em função da raiz quadrada do tempo, foi adequada para representar matematicamente a liberação de P₄, dos dispositivos à base de PHB/PCL, independente da porcentagem de P₄ ter sido de 8 ou 10 %.
4. O perfil plasmático das vacas ovariectomizadas, tratadas com o DISP 8, se assemelhou ao das tratadas com DIB.
5. O DISP 8 manteve teores de P₄ acima de 1 ng/mL pelos 16 dias de duração do tratamento, portanto libera P₄ suficiente para 2 períodos de utilização de 8 dias.
6. O molde para produção dos dispositivos precisa sofrer modificações para evitar deformação que possa facilitar a perda dos mesmos durante o período de tratamento.

REFERENCIAS

REFERÊNCIAS

ABE, H.; DOI, Y. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 185-192, 1999.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 2, p. 627-640, 1992.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.

ALBERTS, B. Molecular biology of the cell. 3. ed . New York: Garland Publishing, 1994. 1294 p.

AVELLA, M.; MARTUSCELLI, E. Poly--(-)(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene oxide) blends: phase diagram, thermal and crystallization behaviour. **Polymer**, v. 29, p. 1731-1737, 1988.

BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; PINHEIRO, O. L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, n. 1-2, p. 9-22, 1995.

BINELLI, M, THACHER, W. W. Conseptus-stimulated Signal Transduction Pathway in the Endometrium to Maintain Pregnancy. **Ann. Review Biomedical Science**, v.1 p.59-85,1999.

BINELLI, M.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; ARNOLD, D.R.; SIROIS, S.; HANSEN, T. R.; THACHER, W. W. Interferon- τ Modulates Phorbol Ester-Induced Production of Prostaglandin and Expression of Cyclooxygenase-2 and Phospholipase-A2 from Bovine Endometrial Cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 417-424, 2000.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. "Fenômenos de transporte". 2. ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004. ____p.

BLAKISTON'S ; **Dicionário médico**, 2. ed. São Paulo: Andrei, 1988. 1169 p.

BLATCHLEY, F. R.; DONOVAN, R. T.; POYSER, N. L.; HORTON, E W.; THOOMPSON, C. J.; LOS, M. Identification of prostaglandin F 2α in the utero-ovarian blood of guinea pig after treatment with oestrogen . **Nature**, v. 230, p. 243-244, 1971.

BONNEY, R. C.; QIZILBASH, S. T.; FRANK, S. Endometrial phospholipase A₂ enzymes and their regulation by steroid hormones . **Journal Steroid Biochemical**, v. 27, p. 1057-1064, 1987.

BURGGRAAF S., RATHBONE M.J., BUNT C.R., PICKERING K.L.,
Effect of silicone shore hardness, inert fillers and progesterone available
one particle size upon the release of progesterone from a
controlled release intravaginal drug delivery system, **Proc.**
Int. Symp Controlled Rel. Bioact. Mater. v.24 p.147–148,1997.

BUNT, C.R.; RATHBONE, M.J.; BURGGRAAF, S. ; OGLE, C.R. Development of a
QC release assessment method for physically large veterinary product containing a
highly water insoluble drug and the effect of formulation variables upon release **Proc.**
Int. Symp. Controlled Release Society. v.24 , p. 145-146, 1997

BUNT, C.R.; RATHBONE, M.J.; BURGGRAAF, S.; OGLE, C.R. BURKE, C.R.
Elevation of plasma progesterone levels in cattle using a poly(ϵ -caprolactone) and
cyclodextrin intravaginal insert containing progesterone **Proc. Int. Symp. Controlled**
Release Society. v.26 , p. 1172-1173, 1999.

CALDWELL, B. V.; TILLSON, S. A.; BROCK, W. A.; SPEROFF, L. The effects of
exogenous progesterone and estradiol on prostaglandin F levels in ovariectomized
ewes. **Prostaglandins**, v. 1,p. 217-228, 1972.

CASTRANE, V. D., JORDAN, V. C. The effect of estrogen and progesterone on
uterine prostaglandin biosynthesis in the ovariectomized rat. **Biology**
Reproduction.POR EXTENSO, v. 13 p. 587-596, 1975.

CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. **Advanced**
Materials. v. 8, n. 4, p. _____, 1996.

COLAZO, M. G.; MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of
dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in
beef heifers **Animal Reproduction Science**, v. 72, p. 47-62, 2002.

CROWE, M.A.; KELLY, P.; DRIANCOURT, M. A.; BOLAND, M.P.; ROCHE. J. F.
Effects of follicle stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum
hormone concentrations, follicle growth, and intra-follicular estradiol and aromatase
activity in gonadotropin-releasing hormone-immunized heifers. **Biology**
Reproduction, v. 64: p. 368-374, 2001.

D'OCCHIO, M. J.; FORDYCE, G.; WHYTE, T. R.; JUBB, T. F.; FITZPATRICK, L. A.;
COOPER, N. J.; ASPDEN, W. J.; BOLAM, M. J.; TRIGG, T. E. Use of GnRH agonist
implants for long-term suppression of fertility in extensively managed heifers and
cows. **Animal Reproduction Science**, v. 74, n. 3-4, p. 151-162, 2002.

D'OCCHIO, M. J.; JILLELLA, D.; LINDSEY, B.R. Factors that influence follicle
recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers:

opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. **Theriogenology**, v. 51. p. 9-3,1999.

DERVAL, S.R.; FILHO, R. P.; AGNELLI, J.A.M. Avaliação da biodegradação de poli- β -(hidroxibutirato), Poli- β -(hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- ϵ -(caprolactona) em solo compostado. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.12 n°4, p.311-317,2002

DEY, S. K.; HOVERSLAND, R. C.; JOHNSON, D. C. Phospholipase A₂ activity in the rat uterus : modulation by steroid hormones. **Journal Steroides Hormone**, v. 23, p. 619-630, 1982.

DZIUK, P.J.; COOK, B. Passage of steroids through silicone rubber. **Endocrinology**, v. 78, p. 208–211, 1966.

EGGLESTON, D. L.; WILKEN, E. A.; VAN KIRK, R. G.; SLAUGHTER, T. H. J; MURDOCH, W.J. Progesterone induces expression of endometrial messenger RNA encoding for cyclooxygenase (sheep). **Prostaglandins**, v. 39, p. 675-683, 1990.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

FORMOLO, M. C.; DUARTE, M. A. T.; SCHNEIDER, A. L. S.; FURLAN, S. A.; PEZZIN; A. P. T. Polihidroxicanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 4, n. 2, p. 14-21, 2003.

FORMOLO, M. C.; VOGELSANGER JR., N.; SCHNEIDER, A. L. S.; FURLAN, S. A. ARAGÃO, G. M. F.; PEZZIN, S. H.; PEZZIN, A. P. T. Biossíntese de polímero biodegradável: caracterização térmica e espectroscópica In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS**, 7., Belo Horizonte. Anais... p.340-341,2003

FORTUNE, J. E.; QUIRK, S. M. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 1-8, 1988.

GAMBINI, A. L. G.; MOREIRA, M. B. P.; CASTILHO, C.; BARROS, C. M. Desenvolvimento folicular e Sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 22, p. 210–210. 1998.

GARVERICK, H. A. Ovarian follicular cysts in dairy cows. **Journal Dairy Science** , v. 80, p. 995-1004, 1997.

GARVERICK, H. A.; SMITH, M. F. Mechanisms associated with subnormal luteal function. **Journal Animal Science**, p. 6225-6246,1986. Supplement 1.

GARVERICK, H. A. Secretory patterns of LH and FSH follicular growth following administration of PGF₂ α during the early luteal phase in cattle. **Theriogenology**, v. 31, n. 3, p.5 13-524, 1989.

GASSNER, F.; OWEN, A. J. On the physical properties of Biopol/EVA blends. **Polymer**, v. 33, p. 2508-2512, 1992.

GASSNER, F.; OWEN, A. J. Physical properties of poly(β -hidroxybutyrate)-poly(ϵ -caprolactone) blends. **Polymer Report**, v. 35, p. 2233-2236, 1994.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULLICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p.1079-1093, 1999.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOFF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal. Reproduction. Science**. v.20,p.187, 1989

GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; JKASTELIC, P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal Reproduction Fertility**. v. 87,p. 223, 1989.

GINTHER, O. J.; KOTT, K.; KULLICK, L. J.; WILTBANK, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75-87, 1997.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRIKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-94, 1996.

Hafez, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 720 p. 1988

KINDAHL, H. Prostaglandin Biosynthesis and Metabolism, **Jounal Animals Veterinary Medical Association**. v. 176, p. 1173-1177, 1980.

KOTWICA, G.; FRAN CZAK, A.; OKRASA, S.; KOTWICA, J. Effect of na oxytocin antagonist n prostaglandin F₂ α secretion and the course of luteolysis in sows. **Acta Veterinary Hungary**, v. 47, n. 2, p. 249-262, 1999.

KOTWICA, J.; SCARZYNSKI, D.; BOGACKI, M.; MELIN, P.; STAROSTKA, B. The use of an oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 1287-1299, 1997.

KOTWICA, J.; SKARZINSKY, D.; JAROSZEWSKI, J.; WILLIAMS, G. L.; BOGACKI, M. Uterine secretion of prostaglandin F₂ α stimulated by different doses of oxytocin and

released spontaneously during luteolysis in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 38, p. 217-226, 1998.

KUNZE, H.; VOGT, W. Significance of phospholipase A for prostaglandin formation. **Animal NY Academy Science** . v. 180, p. 123-125, 1971.

LANDS, W. E. M.; SAMUELSSON, B. Phospholipid precursors of prostaglandins. **Biopsy's . Acta** v. 164, p. 426-429, 1968.

LUO, S.; NETRAVALI, A. N. A study of physical and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) during composting. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, p. 59-66, 2003.

MADUREIRA, E.H.; PIMENTEL, J.R.V.; ALMEIDA, A.B.; ROSSA, L.A.F. Sincronização com progestágenos, IN: **Simpósio Internacional de Reprodução Aplicada**, Londrina- PR. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade de São Paulo, São Paulo. Anais... v. 1, 246p, 2004.

MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 307-320, 1996.

MANTOVANI, A. P. Utilização prolongada de dispositivo intravaginal contendo progesterone (CIDR[®]) para indução de folículos persistentes em receptoras de embrião bovino. 84 f__ Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) **Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2003

MARTINO F. ; CAPITAINE FUNES, A ; BO, G. Comparación de 2 programas de inseminación en vacas lecheras. **Von Franken S.A.I.C** Gral. Lavalle 2247/49 - (1602) Florida, Bs As. Argentina (on line) disponível em: 23 de maio, 2006 (<http://www.fatrovonfranken.com.ar/informes/11.htm>)

MAUER, R. E.; WEBEL, S. K.; BROWN, M. D. Ovulation control in cattle with progesterone intravaginal device (PRID) and ovarian changes in inseminated dairy heifers after an gonadotrophin releasing hormone (GnRH), **Animal Biochemical Biopsy's**. v. 15, p. 291-296, 1975.

MAUER, R. E.; WEBEL, S. K.; BROWN, M. D. Ovulation control in cattle with progesterone intravaginal device (PRID) and ovarian changes in inseminated dairy heifers after an gonadotrophin releasing hormone (GnRH), **Ann. Biol. Anim. Biochemical Biopsy's**. v. 15, p. 291-296, 1975.

MCCRACKEN, J. A. Prostaglandins and leukotrienes. In: CONN, P. M.; MELMED, S.; CLIFTON, N. J.; HUMANA, P. (Ed.). **Endocrinology: basic and clinical principles**. 1997. p.101-114.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263-323, 1999.

MEYER J.; BOOTH, N. H.; MACDONALD, L. E. **Farmacologia e terapeutica em veterinária**, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1000 p 1983.

MEYER, H. H. D.; MITTERMEIER, T.; SCHAMS, D. Dynamics of oxytocin, oestrogen, and progesterone receptors in the bovine endometrium during the estrous cycle. **Acta Endocrinologica** v. 118, p. 96–104, 1988.

MEYER, M.D.; HANSEN, P.J.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; BADINGA, L.; ROBERTS, R.M.; LI, J.; OTT, T.L.; BAZER, F. W. Extension of corpus luteum life span and reduction of uterine secretion of prostaglandin F_{2a} of cows in response to recombinant interferon-tau. **Journal Dairy Science**; v. 78, p. 1921-1931, 1995.

MISHELL JR., D. R.; LUMKIN, M. E. Contraceptive effect of New varying dosages of progestogen in silastic vaginal rings, **Fertility. Sterile**, v. 21, p. 99-103, 1970

MISHELL JR., D. R.; LUMKIN, M. E. Contraceptive effect of New varying dosages of progestogen in silastic vaginal rings, **Fertility. Sterile**, v. 21 p. 99-103. 1970.

MISHELL JR., D. R.; TALAS, M.; PARLOW, A. F.; MOYER. D. L. Follicle-stimulating hormone in largest follicles of post- Contraception by means of a silastic vaginal ring impartum beef cows, **Biology. Reproduction**, v. 38, p. 587-591, 1988.

MIZUTA, K. Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH,FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) 98 f__ Tese (Doutorado em Reprodução Animal) **Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2003

MURPHY, M. G.; ENRIGHT, W. J.; CROWE, M. A.; MCCONNELL, K.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, n. 2, p.333-338, 1991.

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American *Bos indicus* (ZEBU) CATTLE **Animal Reproduction Science**, v 82 p. 361–372, 2004.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriments of dairy cattle**. 7. ed. Washinton, D.C.: National Academy of Sciences, 2001. 381 p.

PEREIRA, J. C. C. Contribuição genética do Zebu na pecuária bovina do Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 21, p. 30–38, 2000.

PFISTER, W.R.; SHEERAN, M.A.; WATTERS, P.A. Proceed. International Symposium **Control Rel. Bioact. Mater.** v14 p. 223-224, 1987

PHARRIS, B. B.; TILLSON, S. A.; ERICKSON, R. R. Prostaglandin in luteal function. **Rec. Program Hormone. Res. arch.** v. 28, p. 51-89, 1972.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. I. Influence of day. *Anim. Reprod. Sci.* v. 14, p. 165–176, 1987.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, p. 21-37, 1988.

RAE, D. O.; CHENOWETH, P. J.; GIANGRECO, M. A.; DIXON, P. W.; BENNETT, F. L. Assessment of estrus detection by visual observation and electronic detection methods and characterization of factors associated with estrus and pregnancy in beef heifers. **Theriogenology**, v. 51, p. 1121-32, 1999.

RAJAKOSK, E. The Ovarian Follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. **Acta Endocrinology**, v. 34, p. 7-68, 1960.

RATHBONE, M. J.; BUNT, C. R.; OGLE, C. R.; S. BURGGRAAF, K. L.; MACMILLAN, C. R. ;BURKE, AND K. L. PICKERING. Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. **Journal Controlled Release** v.85,p.105–115. 2002a.

RATHBONE, M. J. ; BUNT, C. R. ; OGLE, C. R. ; BURGGRAAF, S. ; MACMILLAN, K. L. ; PICKERING, K. Development of an injection molded poly(e-caprolactone) intravaginal insert for the delivery of progesterone to cattle. **Journal of Controlled Release** v.85 p.61–71, 2002b.

RHODES, F. M.; BURKE, C. R.; CLARK, B. A.; DAY, M. L.; MACMILLAN, K. L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 69 , p. 139-150, 2002.

RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 4, p. 265-77, 1995.

RHODES, F. M.; MACDOUGALL, S.; BURKE, C. R.; VERKERK, G. A. MACMILLAN, K. L. Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anoestrous interval,. **Journal Dairy Science.** v 86 , p 1876-1894,2003.

ROBERTSON, D. M.; FOULDS, L. M.; LEVERSHA, L.; MORGAN, F. J.; HEARN, M. T. W.; BURGER, H. G.; WETTENHALL, R. E. H.; DDE KRETZER, M. Isolation of

inhibin from bovine follicular fluid. **Biochemist. Biopsy's. Research. Commune.** v. 126: p. 220–226, 1985.

ROBERTSON, D. M.; TSONIS, C. G.; MCLACHLAN, R. I.; HANDELSMAN, D. J.; LEASK, R.; BAIRD, D. T.; MCNEILLY, A. S.; HAYWARD, S.; HEALY, D. L.; FINDLAY, J. K.; BURGER, H. G.; DE KRETZER, D. M. Comparison of inhibin immunological and in vitro biological activities in human serum. **Journal Clinical Endocrinology Metabolic.** v. 67, p. 438–443, 1988.

ROCHE, J. F. Retention rate in cows and heifers of intravaginal silastic coils impregnated with progesterone, **Journal Reproduction Fertility** v. 46, p. 253–255, 1976.

ROCHE, J. F. Retention rate in cows and heifers of intravaginal silastic coils impregnated with progesterone, **Journal. Reproduction. Fertility.** v. 46, p. 253–255, 1976.

ROWDEN, J. N.; INGALLS, W.W.; ZIMMERMAN, J.E.; Influence of post-partum energy level on reproductive performance of Hereford cows restricted in energy intake prior to calving. **Journal Animal Science** v. 23, p. 1049-1053, 1964.

SAS. The **Statistical Analyse Systems for Windows V8.** Cary, 199-2001

SAVIO, J. D.; KENNAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle in heifers. **Journal Reproduction Fertility.** v. 83, p. 683, 1988.

SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; BERARDINELLI, J.G.; CUSTER, E.E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **Journal Animal Science;** v. 68, p. 799-816, 1990.

SILVA, M. A.; PEREIRA, F. A. Crescimento e desempenho reprodutivo de animais Zebus e mestiços Chianina–Zebu. **Revista da Sociedade Brasileira Zootecnia** v. 15, p. 116–123, 1986.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. **Biology of Reproduction,** v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SOUZA, E. M.; MILAGRES, J. C.; SILVA, M. A.; REGAZZI, A. J.; CASTRO, A. G. C. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. **Revista da Sociedade Brasileira Zootecnia.** v. 24, p. 926–935, 1995.

STELLFLUG, J. N.; LOUIS, T. M.; HAFS, H. D.; SEGUIN, B. E. Luteolysis, estrus and ovulation and blood prostaglandin F after intramuscularly administration of 15, 30 or 60 mg prostaglandin F 2 α . **Prostaglandin's** v.9 1975. p. 609-615.

STELLFLUG, J. N.; LOUIS, T. M.; HAFS, H. D.; SEGUIN, B. E. Luteolysis, estrus and ovulation, and blood prostaglandin F after intramuscular administration of 15, 30 or 60 mg prostaglandin F₂. **Prostaglandins** v.9, p. 609–615, 1975

STEVENSON, J. S. A review of oestrous behaviour and detection in dairy cows. In: Diskin MG, editor. **BSAS Occasional Publication**, v. 1, n. 26, p. 43–62, 2001.

TURZILLO, A. M.; FORTUNE, J. E. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. **Journal Reproduction Fertility** v. 89, p. 643–665, 1990.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, XXIII rev., **United States Pharmacopeia Convection**, Rockville, Md. 1995

VALENTTIM, RENATO. Concentrações plasmáticas de progesterona e eficiência reprodutiva de diferentes dispositivos de liberação lenta de progesterona usados em inseminação artificial em tempo fixo. **Tese** (Doutorado, Reprodução Animal) Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2004.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase (Cox-1 and Cox-2) . **Advanced Prostaglandin Leukotriene Reserch.** v. 23, p. 41-48, 1995.

VOGELSANGER JR., N.; FORMOLO, M. C.; SCHNEIDER, A. L. S.; FURLAN, S. A.; BERNARDO, H. P.; PEZZIN, S. H.; PIRES, A. T. N.; DUEK, E. A. R.; PEZZIN, A. P. T. Blendas biodegradáveis de poli(3-hidroxitbutirato) e poli(ε-caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 359-365, 2003.

WILSON, L.; CENEDELLA, R. J.; BUTCHER, R. L. Prostaglandin F_{2α} in the uterus of ewes during early pregnancy. **Prostaglandins**, v. 1, p. 479-482, 1972.

WILSON, L.; CENEDELLA, R. J.; BUTCHER, R. L.; INSKEEP, E. K. Levels of prostaglandins in the uterine endometrium during the ovine estrous cycle. **Journal Animal Science** v. 34, p. 93-99, 1972.

WILTBANK, M. C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21–52, 2002.

YAVAS, Y.; JOHNSON, W. H.; WALTON, J. S. Modification of follicular dynamics by exogenous FSH and progesterone , and the induction of ovulation using hCG in postpartum beef cows. **Theriogenology**, v. 52, p. 949-963, 1999.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, v. 54, p. 1-25, 2000a.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, v. 54, p. 25-55, 2000b.