

VITOR HUGO GUILGER GONZAGA

**Correlação *in vitro-in vivo* (IV-IVC) de um novo dispositivo
intravaginal de progesterona em matriz de silicone para
vacas leiteiras**

São Paulo/SP

2023

VITOR HUGO GUILGER GONZAGA

**Correlação *in vitro-in vivo* (IV-IVC) de um novo dispositivo
intravaginal de progesterona em matriz de silicone para vacas
leiteiras**

versão corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira

São Paulo/SP

2023

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)

Gonzaga, Vitor Hugo Guilger

Correlação *in vitro-in vivo* (IV-IVC) de um novo dispositivo intravaginal de progesterona em matriz de silicone para vacas leiteiras / Vitor Hugo Guilger Gonzaga; orientador Ed Hoffmann Madureira. – São Paulo, 2023.

91 f. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal – Departamento de Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Álcool. 2. SDS. 3. Concentração plasmática. 4. Higuchi. 5. Solubilidade. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Correlação in vitro-in vivo (IV-IVC) de um novo dispositivo intra-vaginal de progesterona em matriz de silicone para vacas leiteiras", protocolada sob o CEUA nº 8917190821 (ID 009073), sob a responsabilidade de **Ed Hoffmann Madureira e equipe; Vitor Hugo Guilger Gonzaga** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/10/2021.

We certify that the proposal "In vitro-in vivo correlation (IV-IVC) of a new intra-vaginal progesterone device in silicone matrix for dairy cows", utilizing 20 Bovines (20 females), protocol number CEUA 8917190821 (ID 009073), under the responsibility of **Ed Hoffmann Madureira and team; Vitor Hugo Guilger Gonzaga** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/14/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [10/2021](#) a [12/2021](#)

Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [36 a 72 meses](#)

N: [20](#)

Linhagem: [Holandesa](#)

Peso: [450 a 850 kg](#)

Local do experimento: Fazenda COLORADO (Araras/SP)

São Paulo, 03 de outubro de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GUILGER GONZAGA, Vitor Hugo

Título: **Correlação *in vitro-in vivo* (IV-IVC) de um novo dispositivo intravaginal de progesterona em matriz de silicone para vacas leiteiras**

Tese 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 Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho e nossa vitória, principalmente aos meus pais Luiz Carlos Gonzaga e Maria Aparecida Guilger Gonzaga, vocês são a base de nossas conquistas e sinônimos do verdadeiro amor em família. Às minhas irmãs Vanessa Cristiane e Samanta Tatiane, meu irmão Kléber (in memorian), apoiadores e incentivadores na busca de meus sonhos. E à minha princesa Lis Belle (mozão) que veio ao mundo trazer ainda mais amor e luz em nossas vidas. Aos meus irmãos (anjos de patas) e eterno amigos Pingo, Ted e Whisky que em meio à pandemia desencarnaram e viraram estrelinhas, mas continuam vivos em nossas memórias e corações. Aos meus avôs Lázaro e Vicentina (in memorian).

A todos – NEOQEAV

Minha família, gratidão pela vida, pela amizade, ensinamentos, educação e amor. Graças a vocês me tornei o homem que sou e serei eternamente realizado se vir a ser 1/10 do que vocês são, meu alicerce. Muito obrigado pela educação e formação como homem e ser humano.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois com Ele tudo é possível. Toda honra e glória ao Pai Celestial. São Francisco e Nossa Senhora.

Aos meus pais, irmãos e afilhada, pelo apoio, paciência, amor e carinho, vocês são demais.

Ao Departamento de Reprodução Animal desta casa, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, à Universidade de São Paulo e professores e ao campus “Fernando Costa”.

À Fazenda Colorado (XANDÔ), ao MV Sérgio Soriano, técnico Morivaldo, Valéria, Rocha, MV Sica e Ricardo e todos os colaboradores.

Aos animais (12210, 12243, 12247, 12545, 12811, 12883, 13056, 13108, 13554, 13620, 13733, 13855, 14053, 14272, 14395, 14488, 14592, 14986, 14989, 15015) que fizeram parte do experimento, a minha eterna gratidão e carinho, que Deus os abençoe, e muito obrigado pela convivência e aprendizado.

Aos animais do Campus e a todos do meu convívio.

Aos funcionários Clayton, Seu João, Seu Zé Maria, Márcio, Cris e as “tias” da limpeza, toda minha gratidão. À secretária Harumi, profissional exemplar, uma mãezona e um ser humano iluminado, de um coração enorme, sempre disposta a ajudar, toda minha gratidão. Harumi, sem você eu não teria finalizado essa etapa da minha vida. Sou eternamente grato a você e essa vitória é sua também.

Agradeço aos colegas do departamento, Alessandra e Priscila, ao estagiário Jefferson – esse filho também é seu, Luiza e Paulo (que me acolheram no meu retorno à cidade) e principalmente a Carol, presente nesse último ano de doutorado me apoiando sempre, nas alegrias e nas tristezas. Obrigada Carol pela amizade e os bate-papos.

Aos meus alunos, obrigado pelo apoio e carinho.

Aos membros da banca, em especial o prof Edson da FZEA pela atenção, sugestões e apoio, e a professora Eneiva Carla pela oportunidade de iniciar meus estudos na casa.

Minha amiga de graduação Talita Conti pelo incentivo e amizade de anos e meu amigo/irmão Geraldo Pereira pela amizade e parceria de sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – “Código de Financiamento 001.”

E principalmente ao professor Ed Hoffmann Madureira pela orientação. Dedico também ao seu pai Ferdinando Madureira Rodrigues (*in memoriam*), que fizeram parte dessa história.

Senhor,
Fazei de mim um instrumento de vossa Paz.
Onde houver Ódio, que eu leve o Amor,
Onde houver Ofensa, que eu leve o Perdão.
Onde houver Discórdia, que eu leve a União.
Onde houver Dúvida, que eu leve a Fé.
Onde houver Erro, que eu leve a Verdade.
Onde houver Desespero, que eu leve a
Esperança.
Onde houver Tristeza, que eu leve a Alegria.
Onde houver Trevas, que eu leve a Luz!
Ó Mestre, fazei que eu procure mais:
consolar, que ser consolado;
compreender, que ser compreendido;
amar, que ser amado.
Pois é dando, que se recebe.
Perdoando, que se é perdoado e
é morrendo, que se vive para a vida eterna!
Que assim seja.
(São Francisco)

RESUMO

GUILGER GONZAGA, V. H. **Correlação *in vitro-in vivo* (IV-IVC) de um novo dispositivo intravaginal de progesterona em matriz de silicone para vacas leiteiras**. 2023. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Dispositivo intravaginal de progesterona (P4) é uma importante ferramenta da reprodução, para ter ganho produtivo em fazendas leiteiras. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: 1) obter o perfil de liberação da P4, *in vitro*, durante nove dias, de um novo dispositivo intravaginal (SM-3,2g), para gado leiteiro, empregando-se dois meios de dissolução: solução de etanol:água (60:40) e solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,5%; 2) quantificar, por radioimunoensaio (RIE), a P4 sérica, em vacas leiteiras lactantes, após a aplicação intravaginal do dispositivo SM-3,2 g, por um período de nove dias e; 3) estabelecer a correlação do perfil de liberação *in vivo*, com os perfis de liberação obtidos a partir dos dois experimentos *in vitro*. Para o experimento *in vivo*, em delineamento alternado, com medidas repetidas no tempo, vinte vacas múltiparas e lactantes foram submetidas à protocolo de sincronização do ciclo estral pré inclusão, com a finalidade de induzir a formação de corpo lúteo. Ao término dessa etapa (D0) os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: 1) Grupo controle (**CON**; n=10): vacas com implante auricular subcutâneo de progestágeno; e 2) Grupo tratado (**SM**; n=10): vacas com dispositivo intravaginal, com 3,2 g de progesterona. Imediatamente antes de receberem os tratamentos, foi colhida a primeira amostra de sangue (T0) e também nos tempos 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216h, em seguida a colocação dos implantes, também foram colhidas amostras de sangue. Posteriormente a última colheita de sangue (216h), os implantes foram retirados e mais quatro amostras de sangue foram colhidas nos tempos 228, 240, 252 e 264h, quando então, foi administrado GnRH para nova sincronização do ciclo estral pré inclusão. Por se tratar de delineamento alternado, houve a inversão dos grupos experimentais; assim, os animais que eram do grupo controle, no primeiro período (P1) do experimento, passaram, nesse segundo período (P2), para o grupo dos animais tratados e vice-versa. O protocolo de sincronização e as demais etapas seguiram a cronologia do período anterior (P1). Os testes de dissolução *in vitro*, foram conduzidos em triplicata

e a quantificação de P4, realizada por espectrofotometria. Realizou-se teste de correlação (PROC CORR) entre os tratamentos (*in vitro* x *in vitro* e *in vitro* álcool x *in vitro* SDS). Para todas as comparações foi utilizado o nível de significância estatística de 5% ($p \leq 0,05$). Assim, a concentração plasmática de P4, nos animais tratados com SM-3,2, obtidas no *teste in vivo*, apresentou pico, após 12 horas de inserção do DIV ($1,1 \pm 0,097$ ng/mL), que se manteve por dois dias ($1,1 \pm 0,063$) e, só a partir de 72 horas (D3), é que começou a declinar ($0,86 \pm 0,095$ ng/mL), permanecendo constante ($0,80 \pm 0,078$ ng/mL) até o dia de retirada do implante. Além disso, os animais tratados com a fonte exógena de P4 e que produziam maior quantidade de leite (Classe - 1) apresentaram aumento na concentração plasmática do esteroide ($0,61 \pm 0,04$ ng/mL), porém, menor do que as vacas da Classe - 2 ($0,73 \pm 0,04$ ng/mL). No teste *in vitro*, ao final das 216h, o dispositivo de 3,2g, liberou $2815,66 \pm 39,44$ mg de P4 no meio alcoólico e $2066 \pm 25,61$ no Dodecil Sulfato de Sódio e ambos se ajustaram ao modelo matemático de Higuchi ($Q_t = K_h t^{1/2}$), com coeficiente angular (slope) de $905,79 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ e $543,38 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$, respectivamente. Por fim, obtiveram-se correlações positivas e fortes entre: a) os testes *in vitro* ($r = 0,99281$), b) entre o teste *in vitro*, realizado com meio alcoólico e o experimento *in vivo* ($r = 0,78895$) e c) no teste *in vitro* realizado com meio surfactante e o teste *in vivo* ($r = 0,8158$). Conclui-se que o novo implante intravaginal (SM-3,2) foi eficaz para inibir a ovulação dos folículos dominantes dos animais tratados. O coeficiente angular (slope) do SDS é um pouco menor do que o encontrado no meio ÁLC, devido ao fato da solubilidade da P4 ser maior em meio alcoólico do que em SDS 0,5%.

Palavras-chave: ÁLCOOL. SDS. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA. HIGUCHI. SOLUBILIDADE.

ABSTRACT

GUILGER GONZAGA, V. H. ***In vitro-in vivo* correlation (IV-IVC) of a new silicone matrix progesterone intravaginal device for dairy cows.** 2023. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Intravaginal progesterone (P4) device is an important reproduction tool to have a productive gain in dairy farms. Thus, the aims of this work were: 1) to obtain the P4 release profile, *in vitro*, during nine days, from a new intravaginal device (SM–3,2g), for dairy cattle, using two dissolution media: ethanol:water solution (60:40) and 0,5% Sodium Dodecyl Sulfate solution (SDS); 2) quantify, by radioimmunoassay (RIA), serum P4 in lactating dairy cows, after intravaginal application of the SM-3,2 g device, for a period of nine days and; 3) establish a correlation between the *in vivo* release profile with the release profiles obtained from the two *in vitro* experiments. For the *in vivo* experiment, in an alternate design, with repeated measurements over time, twenty multiparous and lactating cows were submitted to a pre-inclusion estrous cycle synchronization protocol, in order to induce the formation of an corpus luteum. At the end of this stage (D0) the animals were randomly distributed into two experimental groups: 1) Control Group (**CON**; n=10): cows with subcutaneous auricular implant of progesterone; and 2) Treated Group (**SM**; n=10): cows with intravaginal device, with 3,2 g of progesterone. Immediately before receiving the treatments, the first blood sample (T0) was collected and also at times 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 and 216h, after placement implants, blood samples were also collected. After the last blood collection (216h), the implants were removed and four more blood samples were taken at times 228, 240, 252 and 264h, when GnRH was administered for new synchronization of the pre-inclusion estrous cycle. As this was an alternating design, the experimental groups were reversed; therefore, the animals that were in the control group, in the first period (P1) of the experiment, were transferred, in this second period (P2), to the group of treated animals and vice versa. The synchronization protocol and the other steps followed the chronology of the previous period (P1). *In vitro* dissolution tests were conducted in triplicate and P4 quantification was performed by spectrophotometry. A correlation test (PROC CORR) was performed between treatments (*in vitro* x *in vitro* and *in vitro* alcohol x *in vitro* SDS). For all comparisons, a

statistical significance level of 5% ($p \leq 0,05$) was used. Hence, the plasmatic concentration of P4, in the animals treated with SM-3,2, obtained in the *in vivo* test, presented a peak, after 12 hours of IVD insertion ($1,1 \pm 0,097$ ng/mL), which was maintained for two days ($1,1 \pm 0,063$) and, only after 72 hours (D3), it began to decline ($0,86 \pm 0,095$ ng/mL), remaining constant ($0,80 \pm 0,078$ ng/mL) until the day of implant removal. In addition, animals treated with the exogenous source of P4 and that produced a greater amount of milk (Class - 1) showed an increase in the plasma concentration of the steroid ($0,61 \pm 0,04$ ng / mL), but less than the cows in Class - 2 ($0,73 \pm 0,04$ ng/mL). In the *in vitro* test, at the end of 216 hours, the 3,2g device had released $2815,66 \pm 39,44$ mg of P4 into the alcohol medium and $2066 \pm 25,61$ into the sodium dodecyl sulphate medium and both fitted Higuchi's mathematical model ($Q_t = K_h t^{1/2}$), with an angular coefficient (slope) of $905,79 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ and $543,38 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$, respectively. Finally, positive and strong correlations were obtained between a) *in vitro* tests ($r = 0,99281$), b) between the *in vitro* test, performed with alcoholic medium and the *in vivo* experiment ($r = 0,78895$) and c) the *in vitro* test performed with surfactant medium and the *in vivo* test ($r = 0,8158$). It is concluded that the new intravaginal implant (SM-3,2) was effective in inhibiting the ovulation of the dominant follicles of the treated animals. The angular coefficient (slope) of SDS is a little lower than that found in ALC medium, since P4 solubility is higher in alcoholic medium than in SDS 0,5%.

Keywords: ALCOHOL. SDS. PLASMATIC CONCENTRATION. HIGUCHI. SOLUBILITY.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alterações fisiológicas e endócrinas nos períodos pré, peri e puberal em novilhas	24
Figura 2 - Modelo farmacocinético de base fisiológica para liberação de drogas de anel vaginal	30
Figura 3 - Estrutura química do policarbonato	32
Figura 4 - Fazenda Colorado (XANDÔ), com sede na cidade de Araras/SP	40
Figura 5 - Animais com escore de condição corporal (E. C. C.) entre 2,5 e 3,0 (escala 1 a 5)	41
Figura 6 - Imagem ultrassonográfica ovariana (com CL e FD), no modo - B	42
Figura 7 - Sistema de confinamento em “free stall” – Fazenda Colorado	43
Figura 8 - Ilustração do delineamento experimental com protocolo de sincronização do ciclo estral para inclusão de animais no estudo, avaliações ultrassonográficas e períodos de colheita de sangue (P1)	44
Figura 9 - Canzil de contenção dos animais – “free stall” da Fazenda Colorado	45
Figura 10 - Imagem ultrassonográfica no modo – Doppler do ovário com CL vascularizado	46
Figura 11 - Protótipo do novo dispositivo intravaginal SM – 3,2g	47
Figura 12 - Realização da colheita sanguínea em veia epigástrica superficial (mamária)	48
Figura 13 - Laboratório com centrífuga (Centrífuga Refrigerada Hettich – 380R)	50
Figura 14 - Mesa laboratorial com tubos de heparina (plasma) e <i>eppendorf</i>	50
Figura 15 - Modelo de silicone contendo 3,2 gramas de progesterona (SM-3,2g)	51
Figura 16 - Cortes pequenos da peça de silicone do dispositivo SM-3,2g	53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média \pm erro padrão da média dos valores de progesterona quantificada *in vivo* (em ng/mL) nos grupos CON (Controle) e SM-3,2 (Sincromilk), em função de tempo (0h à 264h) 57
- Tabela 2 - Peso dos silicones contendo 10% de Progesterona, P4 residual (em %) e P4 liberada (em g e em %) pelos dispositivos utilizados em cada animal, no experimento *in vivo* 61
- Tabela 3 - Média \pm erro padrão da média da concentração de progesterona plasmática (em ng/mL), em animais da Classe – 1 (produção leiteira acima da mediana – 51L/dia) e Classe - 2 (produção leiteira abaixo da mediana – 51L/dia) submetidos aos tratamentos CON e SM-3,2 62
- Tabela 4 - Média \pm erro padrão da média da quantidade de progesterona acumulada *in vitro* (em mg), utilizando-se dois diferentes meios de dissolução, ÁLC-60% (Álcool - 60%) e SDS-0,5% (Dodecil Sulfato de Sódio – 0,5%), em função de tempo (0,33h à 216h) 64
- Tabela 5 - Média \pm erro padrão da média da porcentagem de progesterona acumulada *in vitro*, em cada intervalo e acumulada em dois meios de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%), ao longo dos tempos (0,33h à 216h) 66
- Tabela 6 - Média \pm erro padrão da média da quantidade de progesterona liberada *in vitro* (em mg e em porcentagem), em cada intervalo de tempo, em dois meios de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%), em função de tempo (0,33h à 216) 68
- Tabela 7 - Correlações entre os testes de dissolução *in vitro* nos dois diferentes meios, entre o teste *in vitro* (ÁLC – 60%) e o experimento *in vivo* e, entre o teste *in vitro* (SDS-0,5%) e o experimento *in vivo* 70

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Concentração plasmática de progesterona em animais do grupo CON (Controle) e SM-3,2 (Sincromilk), ao longo dos tempos (0h à 264h) 59
- Gráfico 2 - Comportamento da progesterona liberada e acumulada *in vitro* (em mg) em dois meios de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%), em função de tempo (0,33h à 216h) 65
- Gráfico 3 - Porcentagem de progesterona acumulada segundo meio de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%), em função de tempo (0,33h à 216h) 67
- Gráfico 4 - Valores totais de progesterona liberada *in vitro* (em mg), a cada 24 horas, no meio de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%) 69
- Gráfico 5 - Quantidade acumulada de progesterona liberada por cm² em função da raiz quadrada do tempo, conforme os meios de dissolução; e os coeficientes angulares (slopes) 69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Concentrações e diluições para preparo da curva padrão

54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	CADEIA LEITEIRA	20
2.2	IATF	21
2.3	CICLO ESTRAL	23
2.4	PROGESTERONA	25
2.4.1	Teor plasmático de P4 e hipoprogesteronemia	28
2.4.2	Administração de fonte exógena de P4	30
2.5	DISPOSITIVOS	31
2.5.1	Policarbonato	32
2.5.2	Silicone	33
2.6	TESTE <i>IN VIVO</i> (Determinação de P4 <i>in vivo</i>)	34
2.7	TESTE <i>IN VITRO</i> (Determinação de P4 <i>in vitro</i>)	35
2.7.1	Dodecil sulfato de sódio (SDS)	36
3	OBJETIVOS	38
4	HIPÓTESES	39
5	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	40
5.1.1	Local e período do experimento <i>in vivo</i>	40
5.1.2	Animais e critérios	41
5.1.3	Delineamento experimental	43
5.1.3.1	Exame ultrassonográfico	48
5.1.3.2	Tratamento	48
5.1.3.3	Colheita das amostras (sangue) e processamento	49
5.1.4	Quantificação da progesterona	51
5.2	TESTES DE DISSOLUÇÃO DE P4 <i>IN VITRO</i>	51
5.2.1	Local e período dos experimentos de dissolução <i>in vitro</i>	51
5.2.2	Amostras	51
5.2.3	Delineamento experimental	52

5.3	TESTE QUANTIFICAÇÃO DE P4 RESIDUAL	52
5.4	PREPARO DA CURVA PADRÃO PARA OS TESTES <i>IN VITRO</i> E PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES RESIDUAIS DE P4	54
5.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	56
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6.1	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	57
6.2	TESTES <i>IN VITRO</i>	64
6.3	CORRELAÇÃO “ <i>IN VITRO–IN VIVO</i> ”	70
7	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

É evidente que a produção mundial de leite cresce ano após ano. Dados recentes da *Food and Agriculture Organization* (FAO) mostram que esse alimento, oriundo da espécie bovina, é o mais consumido em todo o planeta e alcança importantes marcas na casa de centenas de bilhões de litros de leite, ordenhados principalmente nos últimos anos (RESENDE et al., 2019; LEITE; STOCK; RESENDE, 2021). O Brasil, mesmo com a oscilação em sua produção, encontra-se entre os maiores produtores mundiais do alimento (ROCHA; CARVALHO, 2018; BUCHHOLZ, 2019; RESENDE et al., 2019), e a cadeia leiteira busca de diversas formas, aumentar cada vez mais sua eficiência, com a produção de um maior volume de leite por animal (ALVES; LÍCIO; CONTINI, 2016), seja implantando boas práticas de manejo, disponibilizando estruturas e meios que possam propiciar um ambiente adequado, sem estresse e de bem-estar (ALLENDORF; WETTEMANN, 2015), ou adotando a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), como ferramenta para o aumento da eficiência reprodutiva e do rebanho e, conseqüentemente, do leite (BARUSELLI, 2021; BARUSELLI, 2022).

No entanto, em vacas *Bos taurus* e, principalmente as holandesas altamente eficientes, existe uma correlação negativa entre a produção leiteira x duração de estro, decorrente da menor concentração de esteroide circulante, ocasionado pelo aumento de sua biotransformação hepática (WILTBANK et al., 2006), o que acarreta dificuldade da observação e reconhecimento de estro. Outra dificuldade que pode ocorrer nessa categoria de animais, é o crescimento exacerbado dos folículos (cistos foliculares), desencadeando uma condição anovulatória (WILTBANK; GÜMEN; SARTORI, 2002).

E é nesse sentido que a IATF se torna um procedimento de relevância e destaque para as propriedades leiteiras, pois, com a administração de fármacos é possível emergir nova onda folicular, controlar e encerrar a fase progestacional, induzir e sincronizar a ovulação (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002) e, assim inseminar todos os animais em um período pré-determinado.

A IATF tem como principais vantagens eliminar a etapa de observação de estro, alcançar 100% de taxa de serviço (LARSON et al., 2006; BARUSELLI et al., 2017), além de propiciar a redução do intervalo entre partos (IEP), o que gera à propriedade direta e indiretamente ganho de 10% em sua produção (BARUSELLI, 2019), evidenciando que, quando realizada de forma apropriada, é uma ferramenta

importante para o gerenciamento eficiente da produção leiteira (WALKER; NEBEL; MCGILLIARD, 1996).

A progesterona é o principal hormônio utilizado nessa técnica e a apresentação em forma de dispositivo intravaginal é a base de protocolos de sincronização (BÓ et al., 2002), pré e ressincronização (CHEBELL et al., 2006) de muitos médico-veterinários. No entanto, antes desse esteroide ser consolidado no mercado, foi preciso passar por diversos estudos. Ainda hoje, para que um novo dispositivo à base de progesterona seja lançado, algumas exigências devem ser estabelecidas, como a avaliação de liberação *in vitro* por dissolução, desenvolvido de acordo com as diretrizes da Farmacopéia estadunidense utilizando-se meio alcóolico (BUNT et al., 1997), com a finalidade de verificar a conformidade da liberação do ingrediente ativo Progesterona *in vitro*.

In vivo, os dispositivos utilizados na hormonioterapia devem manter sua eficácia (teores de pelo menos 1 ng/mL) até o momento de sua retirada. Por esse motivo, é de extrema importância avaliar a liberação *in vitro* e a farmacocinética *in vivo* desses implantes (WEISS et al., 2019), pois, o sincronismo entre a taxa de liberação do hormônio no teste de dissolução e as concentrações de progesterona no sangue, em quantidades adequadas, é o maior desafio para o aprimoramento de dispositivos já existentes, o desenvolvimento de novos (MARIANO et al., 2010) e para que se obtenha a aprovação pelas agências regulatórias (TOSCA et al., 2021).

Nesse sentido, testes de dissolução *in vitro*, são essenciais para avaliar a liberação de drogas contidas em implantes intravaginais, e quando possuem capacidade de prever essa liberação *in vivo*, tornam-se ferramentas importantes no controle da qualidade de grandes empresas. Assim, a correlação *in vitro-in vivo* (IVIVC) é utilizada para apoiar a bioisenção, reduzir carga regulatória, além de proporcionar a economia de tempo e de recursos financeiros (EMAMI, 2006; TIETZ; KLEIN, 2019).

Diante disso, o estudo quantificou a P4 plasmática de vacas leiteiras lactantes e de alta produção, após a aplicação intravaginal de um novo dispositivo (SM-3,2). Avaliou-se o perfil de liberação de P4 desse dispositivo, utilizando-se o teste de dissolução *in vitro* com emprego de solução Álcool-60% e outro com solução SDS-0,5% e, estabeleceu a correlação do perfil de liberação *in vivo*, com os perfis obtidos a partir dos dois meios utilizados no *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CADEIA LEITEIRA

Segundo levantamento recente da FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação), a produção mundial de leite cresce ano após ano e já ultrapassa a casa de meio bilhão de toneladas do produto, oriundo somente da espécie bovina (RESENDE et al., 2019). Só no ano de 2020, em meio à pandemia, a produção mundial de leite foi estimada em 532,3 milhões de toneladas, aumento de 1,5% frente a 2019 (524,3 milhões de t) (LEITE; STOCK; RESENDE, 2021).

No Brasil, a atividade leiteira evoluiu de maneira contínua nas últimas décadas, e resultou em crescimento consistente da sua produção, com destaque para os estados de Minas Gerais (maior produtor do país) e a Aliança Láctea Sulista, composta por Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (LANA, MARTINS, CARNEIRO, 2019), que possibilitaram também posicionar o país entre os cinco maiores produtores mundiais do setor (ROCHA; CARVALHO, 2018; BUCHHOLZ, 2019; RESENDE et al., 2019), gerando aproximadamente 25 bilhões de litros de leite inspecionados em 2019 e quase 26 bilhões de litros do produto inspecionados em 2020 (ROCHA; CARVALHO, 2021; CILEITE, 2021) de um total de 35,4 bilhões de litros de leite/ano produzidos, conforme dados recentes de 2020 do Centro de Inteligência do Leite.

A melhora na cadeia produtiva do leite e o aumento do consumo anual de leite de vaca, per capita, pelo mercado interno (ALVES; LÍCIO; CONTINI, 2016) são fatores que alavancaram o progresso e a evolução desse setor, porém, esses números podem progredir ainda mais, já que mesmo o país sendo um dos maiores produtores mundiais de leite, menos de 10% do rebanho total, que no último levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2021 contabilizou 224,6 milhões, são animais de aptidão leiteira, ou seja, somente cerca de 20 milhões de vacas são ordenhadas, e fazem parte desta enorme cadeia produtiva e de grande impacto econômico do país.

Esses números possuem enorme potencial para prosperar e uma ferramenta útil que possibilita o aumento da eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, um acréscimo considerável no número de animais em rebanhos leiteiros e na sua produção, é a implantação em propriedades destinadas para esses fins, do uso da

biotécnica da reprodução, a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) (BARUSELLI, 2021; BARUSELLI, 2022).

2.2 IATF

A inseminação artificial moderna é uma técnica de deposição mecânica do sêmen (espermatozoides), dentro do aparelho genital das fêmeas, para fertilização dos ovócitos. Foi “descoberta” pelo cientista e fisiologista italiano Lazzaro Spallanzani, no terço final do século XVIII, quando iniciou experimentos com rãs e, em seguida, com cadelas, realizando a primeira inseminação, na qual comprovou que uma única gota de sêmen era capaz de realizar a fertilização, gerando três filhotes da espécie canina e, assim, hipotetizou que os espermatozoides eram agentes fertilizantes. Em 1825, o cientista chamado Dumas, coletou folículos de coelha e junto dos gametas masculinos produziu um embrião, confirmando a hipótese levantada há mais de 40 anos por Spallanzani (SENGER, 2012).

No Brasil, empregou-se a inseminação artificial pela primeira vez na década de 1930 e foi considerada biotécnica reprodutiva pioneira, utilizada para o melhoramento genético inicialmente de equinos, em seguida de bovinos, suínos e ovinos. Até hoje é apontada como maior evento da produção animal que democratizou e popularizou o uso de reprodutores geneticamente superiores para grandes e pequenos produtores (SEVERO, 2015). Mesmo ela sendo a base e essência para outras técnicas como superovulação, transferências de embriões, sêmen sexado entre outras (MARTINS et al., 2009), sua utilização apresenta alguns entraves, como por exemplo, em casos de anestro pós-parto de ordem fisiológica ou patológica, onde haverá a necessidade de aguardar a manifestação de um próximo estro (WEIS; REIST; BRUCKMAIER, 2004; PETER; VOS; AMBROSE, 2009) e em casos de falha na detecção de cio (FOOTE, 1975; SENGER, 1994; ROELOFS et al., 2005; MAYO et al., 2019; ADENUGA; OLAGUNJU, ASHFIELD, 2020). Nessa segunda condição, encontra-se a maior dificuldade da técnica, pois depende da avaliação de um colaborador treinado, que possa realizá-la, tornando-a subjetiva, já que depende também do fator humano.

Como a detecção visual do estro é um trabalho árduo, desafiador e que requer muito treinamento, a IATF surge como alternativa de manejo reprodutivo que contorna os problemas da baixa taxa de serviço, principalmente no período pós-parto dos

animais, facilita o manejo do rebanho e aumenta a eficiência da inseminação artificial, sem a necessidade de detectar o cio (VASCONCELOS et al., 1999).

A IATF é o procedimento de maior relevância reprodutiva no Brasil e de grande destaque, tanto para as propriedades de corte quanto para as leiteiras, pois promove o controle da função luteínica e folicular pela administração de fármacos, possibilitando emergir nova onda folicular, controlar e encerrar a fase progestacional, induzir e sincronizar a ovulação (DISKIN; AUSTIN; ROCHE, 2002; BARUSELLI et al., 2012) e, assim, inseminar todos os animais em um período pré-determinado. Tem como principal vantagem eliminar a etapa de observação de estro, além de alcançar 100% de taxa de serviço, ou seja, inseminar todos os animais que receberam o tratamento (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; LARSON et al., 2006; BARUSELLI et al., 2012; BARUSELLI et al., 2017), em plantéis que não apresentem problemas sanitários (TENHAGEN et al., 2004; JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006), além de auxiliar: 1) no controle de doenças sexualmente transmissíveis, como por exemplo, a campilobacteriose genital bovina, afecção responsável por prejuízos econômicos na bovinocultura, por causar repetições de cio, morte embrionária e esterilidade enzoótica de fêmeas infectadas (SILVEIRA et al., 2018; BALZAN et al., 2020); 2) no controle sanitário; 3) em maior aporte e heterogeneidade genética do rebanho; 4) no aumento da produtividade vaca/ano, além de propiciar a redução de um mês no intervalo entre partos (IEP) e do número de vacas descartadas por infertilidade (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; LEBLANC, 2001), quando comparado aos sistemas que empregam a detecção de cio (IA e monta natural) (BARUSELLI, 2019).

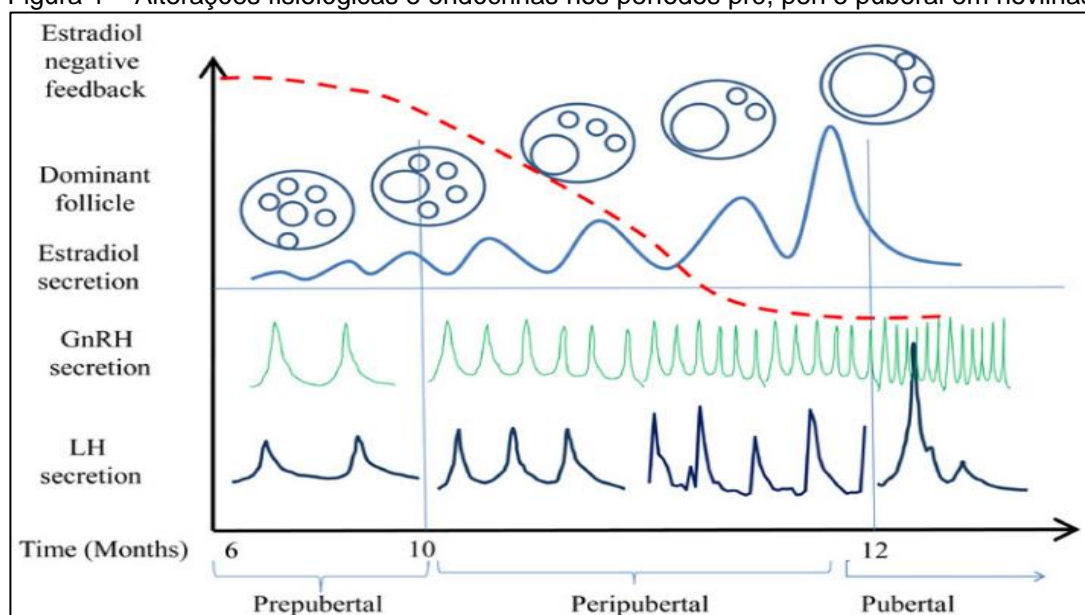
Gera ainda à propriedade um ganho direto de 10% na produção anual de leite e agrega, indiretamente, com nascimento de bezerros, lactação, geração de fêmeas de reposição, entre outros, um valor estimado de R\$ 1,5 bilhão na economia brasileira, somente com sua adoção (BARUSELLI, 2019), o que evidencia que, quando incorporada de forma apropriada na rotina da fazenda, é uma ferramenta de manejo importante, para o acréscimo da eficiência reprodutiva da pecuária, da produtividade geral da unidade agrícola e também para a produção leiteira (WALKER; NEBEL; MCGILLIARD, 1996; BARUSELLI et al., 2012), em um mercado onde somente 12% do plantel leiteiro brasileiro é inseminado artificialmente (2.216.340 fêmeas inseminadas de 18.876.049 de matrizes). Mesmo sendo uma técnica consolidada no Brasil, ainda possui grande potencial para ser explorada, utilizando-se os meios de indução da ovulação e controle do ciclo estral do rebanho (BARUSELLI, 2020).

2.3 CICLO ESTRAL

O ciclo estral é controlado principalmente por interações de alguns hormônios, como o hormônio liberador de gonodotrofinas (GnRH), originário do hipotálamo; o folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), advindos da adenohipófise ou hipófise anterior; a progesterona (P4), estradiol (E2) e a inibina do ovário; e a prostaglandina (PGF2 α), principalmente do útero (MACMILLAN; BURKE, 1996; FORDE et al., 2011). Essas interatividades, na espécie bovina, iniciam-se no período de desenvolvimento das novilhas (a partir de 2 meses) e atuam mais intensamente entre os 6 -12 meses de idade (FORDE et al., 2011; DAY; ANDERSON, 1998; DAY; NOGUEIRA, 2013) quando há maior liberação de GnRH pelo hipotálamo e uma resposta hipofisária secretando LH e, conseqüentemente, estradiol (Figura 1). Em uma próxima fase, há o desenvolvimento gonadal, aumento nas concentrações de E2 e diminuição do LH e, na (fase) seguinte, diminui-se o feedback negativo E2/LH, desencadeando no pico puberal de LH hipofisário (DAY; NOGUEIRA, 2013), que acarretará o crescimento final e maturação dos folículos ovarianos, levando à primeira ovulação (KINDER; DAY; KITTOK, 1987; KINDER et al., 1995), momento esse que representará o início do padrão cíclico da atividade ovariana, que induzirá as novilhas a se tornarem receptivas reprodutivamente, acasalarem e estabelecerem uma futura prenhez (TERASAWA; FERNANDEZ, 2001; FORDE et al., 2011).

A partir de então, as fêmeas da espécie bovina tornam-se poliéstricas não-estacionais, ou seja, apresentam cio no decorrer de todo o ano, em média a cada 21 dias (18 - 24 dias) e com duração de mais ou menos de 12 horas cada (ALVES et al., 2003; FORDE et al., 2011) mas, que pode variar por diversos fatores como por exemplo, idade (novilhas têm o estro mais curto), condições sanitárias, manejo, raça ou até mesmo a quantidade da produção leiteira do animal (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004; LOPEZ et al., 2005).

Figura 1 – Alterações fisiológicas e endócrinas nos períodos pré, peri e puberal em novilhas



Fonte: Day; Nogueira (2013).

Além disso, o ciclo é dividido em quatro etapas: estro (dia 0), metaestro (dia 1 a 3), diestro (dia 4 a 18) e proestro (dia 19 até manifestar cio), que são agrupados em dois estágios (MACMILLAN e BURKE, 1996), o primeiro, conhecido como estágio progesterônico ou luteínico, que se inicia após a ovulação, quando há o predomínio da progesterona e ocorre a formação do corpo lúteo e se encerra quando ocorre a luteólise, podendo durar entre 14 e 18 dias. Segue-se um outro período, mais curto, denominado estrogênico ou folicular, que se inicia logo após a luteólise, há a predominância do estradiol, ocorre o crescimento folicular e ovulação e tem duração média entre 4 e 6 dias (ROCHE; CROWE; BOLAND, 1992; MACMILLAN e BURKE, 1996; FORDE et al., 2011).

Durante essas etapas, podem ocorrer entre duas (vacas leiteiras) (SAVIO et al., 1988), três (novilhas e vacas de corte) e em alguns casos até quatro ondas de crescimento do folículo e, cada uma delas, consiste em períodos de emergência folicular, seleção de um folículo dominante (FD), atresia ou maturação final e ovulação (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; FORDE et al., 2011).

Na emergência, há acréscimo nas concentrações do FSH que se liga a receptores das células da granulosa, aumentando a atividade enzimática, convertendo andrógenos em estrógenos, acarretando o crescimento do folículo (ADAMS et al. 1992). O aumento da produção do estradiol (E2) e da inibina é sinalizado na hipófise, que promove diminuição do FSH e atresia dos folículos dependentes, ao contrário do

FD que com os receptores de LH nas células da teca e granulosa permanece crescendo, há o aumento de estradiol e em seguida a sua ovulação (GINTHER et al., 2000).

Um detalhe importante é que, somente na última onda folicular após a luteólise (regressão do corpo lúteo), e com as concentrações de progesterona (P4) diminuídas, ocorre a pulsatilidade mais intensa do LH, aumento do E2, secreção do GnRH, pico do LH e conseqüente ovulação do FD, já que nas ondas anteriores o corpo lúteo ativo secretava P4 que causava *feedback* negativo no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), inibindo a secreção gonadotrófica da hipófise, que bloqueava o pico de LH e causava atresia dos folículos dominantes (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; FORTUNE, 1994; GINTHER et al., 2000). Após a ovulação, o espaço que era ocupado pelo folículo é envolvido por fibroblastos, células musculares lisas e do sistema imune (REYNOLDS et al., 1994; SANGHA; SHARMA; GURAYA, 2002; WEBB; WOAD; ARMSTRONG, 2002), células endoteliais e, as células da teca e da granulosa, que antes sintetizavam estrógenos, agora se diferenciam e se reorganizam, formando um corpo hemorrágico (DIAZ et al., 2002; SHIRASUNA et al., 2007), e próximo de 3 dias essa glândula responsável pela síntese de P4, o corpo lúteo, já está estabelecida (MIYAMOTO; SHIRASUNA; SASAHARA, 2009).

Sabendo-se dessa complexa interação hormonal no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, existem diversos protocolos que possibilitam alterar pela hormonioterapia, o ciclo estral da espécie bovina, que são determinados conforme as características das categorias de animais ou até mesmo pelo tipo de manejo estabelecido nas propriedades (BARUSELLI et al., 2012). Esse controle pode ser realizado administrando-se GnRH e PGF2 α , como o Ovsynch (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; LEBLANC, 2001) modificando-se os padrões da onda folicular, encurtando o estágio progestacional, fazendo uso da PGF2 α e/ou até mesmo estendendo essa fase através de um protocolo já bem estabelecido no Brasil e de ótima eficiência reprodutiva e fácil aplicabilidade, à base de estradiol e progesterona (BÓ et al., 2002; BARUSELLI et al., 2012; COLAZO; MAPLETOFT, 2014).

2.4 PROGESTERONA

A progesterona (P4) é um hormônio esteroide endógeno, caracterizado por uma estrutura básica lipídica, um complexo policíclico, com 21 átomos de carbono,

formando um sistema de quatro anéis (TARABORRELLI, 2015). Devido ao seu pequeno tamanho e lipossolubilidade, consegue atravessar facilmente a barreira hemato-encefálica (BHE) por transporte transmembranar livre e se difundir pelos tecidos nervosos (PARDRIDGE; MIETUS, 1979; BANKS, 2012) e, por ser um neuroesteroide, pode ser sintetizada localmente no sistema nervoso pela glia e pelos neurônios (MENSAH-NYAGAN et al., 1999; BAULIEU; ROBEL; SCHUMACHER, 2001; GUENNOUN et al., 2015).

Além disso, por ser um hormônio esteróide de natureza lipídica, pode atravessar facilmente a membrana de uma célula-alvo, se ligar e ativar os receptores de progesterona localizados no citoplasma. A P4 então, sofre dimerização e em seguida esse complexo P4 e receptor se transloca para o núcleo ligando-se à fita de DNA, próximo às regiões promotoras de genes, que possuem intensificadores, contendo elementos de resposta hormonal, permitindo a regulação da expressão gênica (TARABORRELLI, 2015; ZUBELDIA-BRENNER et al., 2016).

Assim como outros hormônios esteroides (andrógenos e estrogênios), sua biossíntese inicia-se com o acetato e se converte em colesterol (ANDERSEN; DIETSCHY, 1978), e é catalisada por enzimas do citocromo P450, das membranas do retículo endoplasmático e das mitocôndrias. A enzima transportadora de esteroides transfere o colesterol para as mitocôndrias onde é convertido por uma reação catalisada pelo colesterol desmolase em pregnenolona (TAKASE et al., 1999). A mesma (pregnenolona) se desloca para o retículo endoplasmático liso e nela a enzima 3β -hidroxiesteroide desidrogenase desidrogena/catalisa uma porção originando a progesterona. Nesse momento, a 17α -hidroxilase, hidroxila parte da pregnenolona e da progesterona no retículo endoplasmático liso, originando a 17α -hidroxipregnenolona e a 17α -hidroxiprogesterona. E em seguida, outra fração da 17α -hidroxipregnenolona também é convertida em 17α -hidroxiprogesterona (WILTBANK; BELFIORE; NISWENDER, 1993; STOFFEL-WAGNER, 2001; MILLER, 2002; GUENNOUN, 2020).

Assim, durante o processo de formação de cAMP e a ativação do sistema da proteína quinase A, que promove a fosforilação das enzimas envolvidas na esteroidogênese, há a estimulação do LH nas células luteínicas pequenas (oriundas das células da teca), para a secreção de P4, que por apresentar receptores de LH, captam o colesterol e potencializam o transporte para o seu citoplasma, especialmente para o interior de sua membrana mitocondrial, desencadeando esse

processo de conversão de colesterol em P4 (WILTBANK; BELFIORE; NISWENDER, 1993; MILVAE; HINCKLEY; CARLSON, 1996).

Apesar de ser conhecida como o hormônio da gravidez na espécie humana, pois a maior parte de sua função está relacionada à manutenção da gestação, preparando o endométrio, diminuindo as contrações do miométrio para implantação, promovendo a gestação e inibindo a lactação durante esse período (GOLETIANI; KEITH; GORSKY, 2007), ela também é um dos principais hormônios gonadais sintetizados/secretados pelo corpo lúteo (CL), quando a fêmea encontra-se vazia ou durante as primeiras semanas de gestação (REKAWIECKI et al., 2008); pela placenta já durante a gestação (CABLE; GRIDER, 2022); e, em concentrações menores, pelo córtex adrenal, células de Leydig, tecido adiposo entre outros tecidos (ROSSATO et al., 1999; ZHANG et al., 2009; KOLATOROVA et al., 2022).

Mesmo sendo sintetizados em diferentes estruturas, um dos principais locais em que é formada é no corpo lúteo (CL) (O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989; CABLE; GRIDER, 2022). Uma glândula reprodutiva transitória, responsável pelo estabelecimento e manutenção da gestação (SCHAMS; BERISHA, 2004), constituída por tecido heterogêneo, com células endoteliais, luteínicas esteroidogênicas grandes e pequenas, fibroblastos, células musculares lisas e células imunes, e sua formação é desencadeada principalmente mediante estímulos do hormônio luteinizante (LH).

O controle da secreção desse hormônio (LH) é realizado pela própria P4, no eixo hipotálamo-hipofisário, pela modificação da liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, que inicia a cascata de eventos e que regula as gônadas; ou pelo efeito direto do esteroide (P4) nas células secretoras de gonadotrofina na hipófise anterior (NETT et al., 2002). As células hipofisárias (que secretam LH e FSH) expressam receptores específicos para o GnRH, e sua ativação (dos receptores) pelo GnRH inicia-se pelas vias de transdução de sinal intracelular, para induzir a síntese e liberação das gonadotrofinas, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH) (DUELLO; NETT, 1980; NETT et al., 2002).

Como na fase pré-ovulatória, há o pico de LH e esses estímulos promovem, a partir das células remanescentes do folículo (teca e granulosa) (DAVIS; RUEDA, 2002; DENSCHLAG; KECK, 2002), a ovulação e, conseqüentemente, a formação do CL (AYAD et al., 2007). Na espécie bovina, existe uma alta relação entre LH x P4 na fase luteínica, o que impacta a duração das ondas foliculares e o crescimento dos folículos (HATLER et al., 2008). O uso de progesterona e progestágenos exógenos é

uma excelente ferramenta de manipulação do ciclo estral do animal, que proporciona maiores concentrações de P4 circulante, reduz a frequência de pulsos de LH e bloqueia o pico pré-ovulatório durante o desenvolvimento do folículo dominante, proporcionando-lhe um crescimento adequado, evitando a maturação prematura do oócito (KESNER; PADMANABHAN; CONVEY, 1982; IMWALLE; FERNANDEZ; SCHILLO, 2002; KIM; TANAKA; KAMOMAE, 2003; WILTBANK et al., 2011a; HE et al., 2017), da ovulação e expressão do estro (TRIMBERGER; HANSEL, 1955; ALLRICH, 1994; IMWALLE; FERNANDEZ; SCHILLO, 2002), pois a administração desse esteroide na forma natural ou sintética, pela via oral, subcutânea, intramuscular e, principalmente, intravaginal (RATHBONE et al., 2001), possibilita sua liberação gradual e controlada, proporcionando o controle do momento do estro e da ovulação (MACMILLAN; PETERSON, 1993). Consequentemente, melhores taxas de prenhez podem ser obtidas (VASCONCELOS et al., 2001; INSKEEP, 2004; WILTBANK et al., 2011b). Por essas características, os progestágenos são muito utilizados, tanto na medicina humana (CHAKRAVARTY et al., 2005; GANESH et al., 2011; TOMIC et al., 2015; SAHARKHIZ et al., 2016; IBRAHEM, 2019; MACEDO et al., 2022), quanto na medicina veterinária, principalmente na espécie bovina (GALVÃO et al., 2004; LIMA et al., 2009; CHEBEL et al., 2010; BISINOTTO et al., 2013; COLAZO et al., 2013; PUGLIESI et al., 2019).

2.4.1 Teor plasmático de P4 e hipoprogesteronemia

O teor de progesterona circulante das fêmeas bovinas durante o desenvolvimento do folículo ovulatório é fundamental para alcançar uma taxa satisfatória de fertilidade em vacas leiteiras (BISINOTTO et al., 2010). Ele é determinado por um conjunto de mecanismos fisiológicos, como ligações às proteínas plasmáticas, seu acúmulo em tecido adiposo, absorção em tecidos e órgãos que contêm seus receptores, ingestão alimentar (HAMUDIKUWANDA et al., 1996; RABIEE; MACMILLAN; SCHWARZENBERGER, 2001) e um equilíbrio entre a sua própria produção, principalmente pelo corpo lúteo e o seu metabolismo, sobretudo pelo fígado. Em vacas leiteiras, o volume de tecido luteínico é o fator determinante na produção desse esteroide, porém, a inadequada concentração sérica de P4 nessa espécie está associada ao metabolismo excessivo do esteroide, resultado de um fluxo

sanguíneo hepático extremamente elevado em animais de alta produção leiteira (WILTBANK et al., 2011a).

As concentrações séricas de P4 variam de acordo com raça, idade, estado nutricional, fase e período em que se encontram no ciclo estral, como por exemplo, vacas no pós-parto que apresentaram concentrações plasmáticas de progesterona próximo de 0,5 ng/mL (BRIDGES et al., 1999), assim como animais lactantes e ovariectomizados da raça pardo-suíço com concentrações plasmáticas de 0,3 ng/mL (HOLLENSTEIN et al., 2006), vacas também ovariectomizadas da raça Braford com níveis séricos de P4 menores que 0,5 ng/mL (ROCHA et al., 2011), holandesas com esses mesmos valores no início (D0) e final (D21) do ciclo estral e picos entre 5,1 ng/mL (no Dia 13) (DIAZ et al., 1986) a 16,0 ng/mL no diestro (BADINGA et al., 1994), lactantes da mesma raça na presença de corpo lúteo funcional com teores superiores a 1,5 ng/mL (MIALOT et al., 1999) e novilhas cíclicas com taxas acima de 1 ng/mL (WHISNAT; BURNS, 2002). Apesar dessas variações, em modo geral, e independente de raça, idade, estado nutricional e fase do ciclo estral, as concentrações plasmáticas nessa espécie são inferiores a 1 ng/mL nas fases que antecedem o diestro (ADEYEMO e HEATH, 1980).

Apesar disso, observa-se em vacas leiteiras lactantes, uma importante relação entre a ingestão de matéria seca, fluxo sanguíneo hepático e concentrações circulantes de P4 e até mesmo do estradiol-17 β , pois, o aporte desse tipo de alimento encarregado de suprir as demandas energéticas, para que ocorra a produção de grandes quantidades de leite (HARRISON et al., 1990), desencadeia o aumento do fluxo sanguíneo e do fígado, aumentando-se em mais de 60% a taxa de depuração metabólica, quando comparado com não lactantes (SANGSRITAVONG et al., 2002; TURINO et al., 2010), resultando em baixos teores de E2 e, principalmente, P4 (SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006), em atraso da ovulação e no envelhecimento do oócito (VANHOLDER et al., 2005), ou seja, há uma relação negativa entre a ingestão de ração e a concentração plasmática desse esteroide (VASCONCELOS et al., 2003), que interfere na duração do estro, compromete a fertilidade e impacta negativamente a eficiência reprodutiva desse grupo de animais (WASHBURN et al., 2002; LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004; LOPEZ et al., 2005; VANHOLDER et al., 2005; WILTBANK et al., 2006).

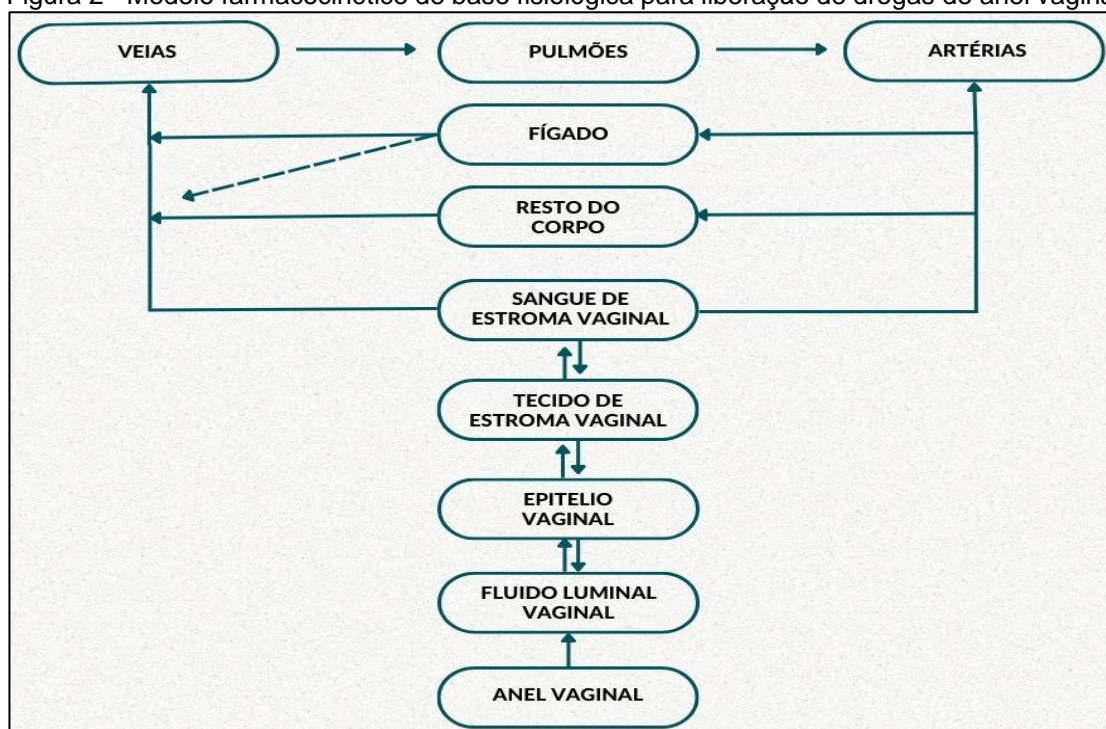
No entanto, essa hipoprogesteronemia pode ser suprida com a utilização de dispositivos para liberação de P4. Em programas de IATF, geralmente se empregam

tratamentos com duração de 7 a 9 dias, portanto, uma preocupação bastante pertinente diz respeito à capacidade dos dispositivos proporcionarem teores de progesterona próximos de 2 ng/mL no momento da retirada dos mesmos.

2.4.2 Administração de fonte exógena de P4

A progesterona foi um dos primeiros fármacos utilizados para o controle do ciclo estral de vacas (CHRISTIAN; CASIDA, 1948) e, desde então, surgiram diversas formas de administração exógena, como por exemplo, a via oral, a intramuscular, a subcutânea e, principalmente, a intravaginal que mostra-se eficiente em liberar o esteroide diretamente na vagina (Figura 2) o que bloqueia a ovulação e estro dos animais por tempo pré-determinado, maximiza o desempenho reprodutivo desses grandes ruminantes (ROCHE, 1976; BÓ; BARUSELLI, MARTINEZ, 2003; DE GRAAFF; GRIMARD, 2018) e caracteriza-o, principalmente no período do pós-parto, como indutor de ciclicidade ovariana (MIBM, 1999) em vacas em anestro e também em animais leiteiros (RHODES et al., 2002; CHEBEL et al., 2006).

Figura 2 - Modelo farmacocinético de base fisiológica para liberação de drogas de anel vaginal



Fonte: Adaptada de Kay et al., (2018).

A suplementação de P4 melhora respostas de fertilidade em vacas leiteiras em lactação, beneficia vacas sem corpo lúteo no início de protocolos, além de diminuir o risco de perda da prenhez, quando administrada durante o desenvolvimento do folículo ovulatório (BISINOTTO et al., 2015). Assim, a utilização de um dispositivo como fonte exógena de P4 é uma ferramenta eficaz para a sincronização de ovulações de vacas leiteiras, possibilitando um melhor controle da maturação dos folículos e do ciclo estral.

2.5 DISPOSITIVOS

O interesse da humanidade em controlar o ciclo reprodutivo e evitar a possibilidade de uma gestação é datado há mais de dois milênios quando o “Pai da Medicina Ocidental”, Hipócrates, recorria a diferentes meios para evitar a fecundação. Já no século XX, Christian e Casida (1948) utilizaram pela primeira vez a progesterona em ruminantes, com o intuito de entender e controlar os ciclos estrais em bovinos. Mas, somente a partir de 1950, com a comprovação de que a administração via oral de P4 era capaz de impedir a ovulação em mulheres, pelos cientistas Gregory Pincus e John Rock (SANTANA; WAISSE, 2016) é que ela passou a ser foco de importantes estudos ao redor do mundo.

Assim, em meados do século passado, iniciaram-se os primeiros experimentos desse esteroide em ovelhas (ROBINSON, 1965; DZIUK; COOK, 1966). Nos anos de 1960 estudos utilizando esponjas intravaginais de P4 sintética foram realizados nas espécies ovina e caprina (RATHBONE et al., 2000). Na década seguinte, Mishell e Lumkin (1970) conseguiram cessar os picos de LH e da ovulação em mulheres que utilizavam anéis vaginais de progestágenos em silicone e demonstraram o quão importante esse esteroide tornava-se, tanto para a medicina humana, quanto para a veterinária e, assim, iniciou-se a produção, em grande escala na indústria farmacêutica animal, principalmente para bovinos (ROCHE, 1974), dos dispositivos de P4 ou análogos de uso intravaginal, pelo fato do ambiente em que ele é inserido propiciar elevada distribuição sistêmica do fármaco (TIETZ; KLEIN, 2019).

Apesar de ser uma tecnologia descoberta há mais de 50 anos, até hoje ela continua sendo uma ferramenta de alta eficácia para o acréscimo do desempenho reprodutivo de ruminantes em programas de inseminação (RATHBONE et al. 2000, SALES et al., 2015; PEREIRA et al., 2017; DE GRAAFF; GRIMARD, 2018;

ZWIEFELHOFER et al., 2021), garantindo satisfatória sincronização para gado leiteiro (WALSH et al., 2007; MELO et al., 2018), além de diminuir as taxas de perda gestacional em vacas lactantes (BISINOTTO et al., 2015).

Esses implantes evoluíram pelo desenvolvimento de anéis flexíveis de silicone à base de polímeros orgânicos, o polissiloxano e de etileno acetato de vinila que continham progestinas ou progestinas combinadas com estrogênios (HARWOOD; MISHELL, 2001). Mais recentemente, a maioria dos dispositivos intravaginais (DIV) comerciais para espécie bovina são estruturas de nylon ou policarbonato em forma de “T” ou “Y”, revestidos por matriz inerte (silicone), impregnada uniformemente com progesterona (RATHBONE et al., 1997; RATHBONE et al., 2002a).

2.5.1 Policarbonato

Os policarbonatos (PC) são poliésteres lineares, derivados da reação do ácido carbônico com compostos di-hidroxilados aromáticos ou alifáticos (WIEBECK; HARADA, 2005; TAKEUCHI, 2012). São obtidos pela reação entre o bisfenol A ou defenilol propano e o fosgênio em meio alcalino e apresenta a seguinte estrutura básica (Fig. 3) (WIEBECK; HARADA, 2005; FREEMAN; LEVINE, 2017):

Figura 3 – Estrutura química do policarbonato



Fonte: Wiebeck e Harada (2005).

O polímero destaca-se por ser transparente como o vidro e resistente como o aço. Possui excelente processabilidade, resistência mecânica e tenacidade, ou seja, elevada resistência aos impactos. Com isso, ele combina características desejáveis dos metais e dos vidros, aliadas ao fácil processamento dos termoplásticos e às propriedades de longo prazo dos termofixos (WIEBECK; HARADA, 2005; HACKER; MIKOS, 2011; HACKER; KRIEGHOFF; MIKOS, 2019), além de possuir a temperatura

de transição vítrea de 145° C, o que geralmente é suficiente para a maioria das aplicações (WU et al., 2013).

Esse termoplástico, que também é inerte ao ataque de microrganismos, é facilmente moldado por processos de termoformagem (WU et al., 2013), no entanto, por serem higroscópicos (ou seja, absorvem água na estrutura química) precisam ser completamente secos antes do processamento térmico, para evitar a formação de bolhas de água no produto e não comprometer sua eficiência mecânica (PRATT; TOLLAFIELD, 2005).

Devido as características peculiares, milhões de toneladas do PC são produzidos em todo o mundo (TAKEUCHI, 2012) para diversos mercados e diferentes finalidades, entre elas, confecção de lentes para óculos de segurança (FREEMAN; LEVINE, 2017), aplicações elétricas (capas de computador, celulares e outros), artigos domésticos e de consumo (pias de cozinha, capacetes), embalagens (garrafas, recipientes para alimentos) (TAKEUCHI, 2012), faróis e as carcaças de lanternas para carros, visores, recipientes para uso em fornos de micro-ondas, tubos de centrífuga, régua e transferidores, partes internas de aviões, rotores de bombas e ventiladores entre outras (WIEBECK; HARADA, 2005).

Tão importante quanto as utilidades citadas anteriormente, é o uso do PC na medicina humana e veterinária para a produção de acessórios, de aparelhos hospitalares, em substituição ao aço e ao vidro (WIEBECK; HARADA, 2005), fabricação de placas ortopédicas (PRATT; TOLLAFIELD, 2005), filtros de sangue e marca-passos (TAKEUCHI, 2012) e confecção de sistemas de liberação de fármacos (HACKER; KRIEGHOFF; MIKOS, 2019), como por exemplo os implantes intravaginais que liberam progesterona dentro do ambiente vaginal de bovinos e outras espécies por meio de dispositivo de silicone.

2.5.2 Silicone

O silicone ou polisiloxano é uma mistura de moléculas poliméricas semi-inorgânicas composta por carbono, oxigênio, hidrogênio, e principalmente, de silício (BRODY, 1988; PEIXOTO, 2001; WIEBECK; HARADA, 2005; ZHU et al., 2006), que é o segundo elemento mais abundante na crosta terrestre depois do oxigênio (KSIAA et al., 2021), e encontrado em forma de areia ou cristais de rocha (WIEBECK; HARADA, 2005). Justamente ele, é o elemento central do silicone, que apesar de ter

sido descoberto no início do século XIX (PEIXOTO, 2001), foi somente após a Segunda Guerra Mundial que começou a ser amplamente utilizado em estruturas poliméricas de diferentes setores, como engenharias, transporte, cosméticos, têxtil (HALL, 1993), além da área médica (PATEL et al., 2022).

Neste tipo de composto, os polisiloxanos, o sílico (Si) forma cadeias semelhantes às dos hidrocarbonetos, nas quais seus átomos, juntamente com os de oxigênios se alternam no lugar dos átomos de carbono, fornecendo-lhes propriedades particulares, como no polidimetilsiloxano (PDMS), o membro mais utilizado desta família de polímeros (PEIXOTO, 2001; ZALEWSKI; CHYLEK; TRZCINSKI, 2021). Ou seja, a engenhosidade deste composto, quando comparado com a sílica natural, dá-se aos diferentes grupos orgânicos contendo “carbono” em sua estrutura molecular, que aferirão características peculiares e intrínseca, como maior ou menor fluidez, viscosidade e até rigidez no produto final (WIEBECK; HARADA, 2005; ZALEWSKI; CHYLEK; TRZCINSKI, 2021).

E, por estes motivos, a borracha de silicone possui propriedades químicas que lhe confere alta durabilidade e resistência às situações adversas a que possam ser expostas, como em choques mecânicos e oscilações de temperaturas, entre outros, que a elegem como um polímero altamente eficaz para desempenhar seu papel nos desafios encontrados, no ambiente intravaginal de grandes ruminantes.

2.6 TESTE *IN VIVO* (determinação de P4 *in vivo*)

Intrinsicamente, as concentrações plasmáticas da progesterona podem ser influenciadas por diversos fatores como, estado nutricional, raça, idade, amamentação, período do ciclo estral, presença ou não de corpo lúteo, entre outros (DIAZ et al., 1986; BADINGA et al., 1994; BRIDGES et al., 1999; MIALOT et al., 1999; WHISNAT; BURNS, 2002; HOLLENSTEIN et al., 2006; ROCHA et al., 2011), podendo ser mensuradas pela da coleta do plasma (*in vivo*) dos bovinos.

Além desses, sua concentração pode variar quando utilizadas fontes exógenas, como os DIV impregnados com P4 ou progestágenos em seu biomaterial, e serão influenciadas pela velocidade e capacidade de liberação do hormônio na matriz de silicone (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005), pela área e espessura da matriz polimérica, concentração de progesterona nesta matriz, além da espécie e categorias de animais e até mesmo, como dito anteriormente, capacidade de

biotransformação do esteroide (RATHBONE et al., 2002a; RATHBONE et al., 2002b; SILVA et al., 2021).

Assim, dispositivos da mesma marca e concentração podem apresentar diferenças nas quantidades de P4 liberada no decorrer dos dias de implantação (MACMILLAN et al., 1991; RATHBONE et al., 2002a; RATHBONE et al., 2002b), porém, apresentam o mesmo perfil de liberação *in vivo*, ou seja, rápido crescimento nos teores plasmáticos nas primeiras horas da inserção do dispositivo (SILVA et al., 2021) e gradual declínio até o dia da retirada dos implantes (RATHBONE et al., 2002a).

Além do teste *in vivo*, é de grande importância também avaliar a liberação *in vitro*, pois o sincronismo entre a taxa de liberação de hormônio e as concentrações de progesterona no sangue, são substanciais para facilitar a aprovação de DIV pelas agências regulatórias (TOSCA et al., 2021).

2.7 TESTE *IN VITRO* (determinação de P4 *in vitro*)

Sempre que um fármaco for aprimorado ou um novo registrado, é necessário garantir que a sua dissolução ocorra de maneira adequada (COSTA; LOBO, 2001). Para isso, desenvolveram-se os testes de liberação *in vitro*, que são habitualmente utilizados nas empresas como uma ferramenta de controle de qualidade, para testar formulações de produtos, mas pouco relatados na literatura e na predição do desempenho *in vivo* de implantes vaginais (BOYD et al., 2019).

Em 1997, Bunt e colaboradores adaptaram uma metodologia da United States Pharmacopeia, na qual dosava-se os teores de P4, *in vitro*, de dispositivos vaginais de mulheres para quantificá-las também em implantes de uso animal, e os valores liberados e acumulados em função do tempo obtidos são adaptáveis a diferentes modelos matemáticos, como por exemplo, Zero order kinetics, First Order kinetics, modelos de Weibull, Higuchi, Hixson–Crowell, Korsmeyer–Peppas, Baker–Lonsdale, e Hopfenberg, que descrevem a cinética de liberação no meio no qual o produto está introduzido (COSTA; LOBO, 2001).

Entre os modelos citados acima, o que mais parece se enquadrar para representar a taxa da liberação *in vitro* de progesterona, em DIV, é a Equação de Higuchi, cujo coeficiente angular pode ser obtido pela quantidade de P4 liberada por cm^2 em função da raiz quadrada do tempo (HIGUCHI, 1961; MARIANO et al., 2010)

e é representada pela seguinte fórmula: $Q_t = K_{ht}^{1/2}$, onde Q_t é a quantidade da P4 liberada no tempo (t) e K é constante da cinética de liberação.

No entanto, a difusão de uma substância em uma matriz depende também de outros fatores, como o material utilizado para a confecção do produto, a concentração inicial do esteroide, a geometria, entre outros (SIEPMANN; LECOMTE; BODMEIER, 1999).

Assim, é extremamente desafiador estabelecer os IVIVC de fármacos de ação modificada, como os implantes, devido à falta de padronização e a variabilidade farmacocinética (JUG et al., 2018). No entanto, há adaptações na equação que permitem relacioná-la com os resultados liberados *in vivo* (MARIANO et al., 2010).

2.7.1 Dodecil sulfato de sódio (SDS)

O Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) ou Lauril Sulfato de Sódio é um surfactante aniônico (carga negativa), de fórmula molecular $C_{12}H_{25}NaO_4S$ (ARENZON et al., 2003), capaz de solubilizar compostos insolúveis em água, que apresenta uma porção polar (hidrofílica), que o torna solúvel em água, pois interage ativamente por interações dipolo-dipolo ou íon-dipolo e um grupo sulfato e outra apolar (hidrofóbica) constituído por um hidrocarboneto linear, ramificado ou aromático e de cadeia longa (SINGER; TJEERDEMA, 1993; DEMISSIE; DURAISAMY, 2016).

Esse tensoativo é rotineiramente utilizado no cotidiano do homem em forma de detergentes, cosméticos, produtos de higiene pessoal, sabonetes e shampoos (NGUYEN; PHAN; SEN, 2016; MONDAL; ADAK; DATTA, 2019), pois possuem a capacidade de formar micelas que promovem a retenção das sujidades hidrofóbicas e, conseqüentemente, sua limpeza (MANIASSO, 2001), em indústrias agroquímicas (em forma de pesticidas), têxteis, mineradoras (MONDAL; ADAK; DATTA, 2019), celulósica e de polímeros (NGUYEN; PHAN; SEN, 2016), na indústria química, farmacêutica (SINGER; TJEERDEMA, 1993), em pesquisas que atuam com processos de biodegradabilidade (ANDERSON et al., 1990; MIRBAHOUSH; CHAIBAKHSH; MORADI-SHOEILI, 2019; SAHA; CHAKRABORTY; GHANGREKAR, 2020) e outras que envolvem processos bioquímicos como extração e desnaturação de proteínas (SEDDON; CURNOW; BOOTH, 2004; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2005; LIU; GUO; GUO, 2007), formulação de géis de eletroforese (ZHANG et al., 2005; DOSUNMU et al., 2020), na área da saúde (URDANETA et al., 2005; SÁNCHEZ et al.,

2007; RODI; TRUCCO; GENNARO, 2008) e até mesmo usados em preparações odontológicas, tópicas e vaginais, além de apresentar propriedades solubilizadoras em determinadas condições (SHALEL; STREICHMAN; MARMUR, 2002) que qualificam o SDS para ser um meio para realização de testes de dissolução de fármacos *in vitro* (WEISS et al., 2019).

3 OBJETIVOS

Quantificar a progesterona (P4) plasmática de vacas leiteiras lactantes e de alta produção, após a aplicação intravaginal do novo dispositivo contendo 3,2 gramas de progesterona (SM-3,2), por um período de nove dias, considerando-se os seguintes tempos de colheita de amostras de sangue: T0 (imediatamente antes da introdução do dispositivo), 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h; 72h, 96h, 120h, 144h, 168h, 192h e 216h, após a colocação dos dispositivos e, ainda nos tempos 228h, 240h, 252h e 264h, que correspondem à 12, 24, 36 e 48h após a retirada dos mesmos (**experimento *in vivo***).

Obter o perfil de liberação de P4 em teste de dissolução *in vitro*, com emprego de solução etanol-água desionizada (60:40 v:v), por um período de nove dias (D0 – 2 min/0,33 horas, 2 horas, 4h, 8h, 12h; 24h; 48h; 72h; 96h; 120h; 144h; 168h; 192h; 216h), do novo dispositivo intravaginal (SM-3,2), para vacas leiteiras de alta produção (**experimento 1 – *in vitro***);

Obter o perfil de liberação de P4, em teste de dissolução *in vitro*, com emprego de solução aquosa, com surfactante aniônico de Dodecil Sulfato de Sódio 0,5% (SDS-0,5%), por um período de nove dias (D0 – 2 min/0,33 horas, 2 horas, 4h, 8h, 12h; 24h; 48h; 72h; 96h; 120h; 144h; 168h; 192h; 216h), do novo dispositivo intravaginal (SM-3,2), para vacas leiteiras de alta produção (**experimento 2 – *in vitro***);

Obter a correlação do perfil de liberação *in vivo*, com os perfis de liberação obtidos a partir dos dois experimentos *in vitro*.

4 HIPÓTESES

O novo dispositivo intravaginal de progesterona (SM-3,2) proporciona, *in vivo*, um período de pelo menos nove dias de teores plasmáticos de progesterona, superiores à 1 ng/mL, evitando a ovulação do FD, durante o período de uso.

Esse novo implante intravaginal de P4 (SM-3,2) tem a capacidade de liberar o hormônio, obedecendo a equação de Higuchi, tanto pela técnica padrão de análise por dissolução, em solução etanol-água desionizada (ALC-60%), quanto pela técnica, utilizando-se Dodecil Sulfato de Sódio 0,5% (SDS-0,5%) como meio de dissolução *in vitro*.

Há correlação *in vitro-in vivo*, independente do meio (alcoólico ou SDS). Entretanto, o meio aquoso apresenta melhor correlação *in vitro-in vivo*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Endocrinologia da Reprodução (LFER), do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.1 EXPERIMENTO *IN VIVO*

5.1.1 Local e período do experimento *in vivo*

O ensaio *in vivo* foi realizado de setembro a dezembro de 2021, na matriz da Fazenda Colorado (XANDÔ), com sede na cidade de Araras/SP (Figura 4), no Laboratório de Farmacologia e Endocrinologia da Reprodução (LFER) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), localizado no Campus “Fernando Costa”, situado na cidade de Pirassununga/SP, em parceria com a Inovare Biotecnologia e Saúde Animal Ltda. e a Bioxen Pesquisa e Desenvolvimento em Medicina Veterinária. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 8917190821 - FMVZ/USP).

Figura 4 – Fazenda Colorado (XANDÔ), com sede na cidade de Araras/SP



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

5.1.2 Animais e critérios

Foram empregadas 20 vacas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*), múltiparas e lactantes, em boas condições clínicas, atestadas por exames físicos e escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 3,0 (escala de 1 a 5) (Figura 5).

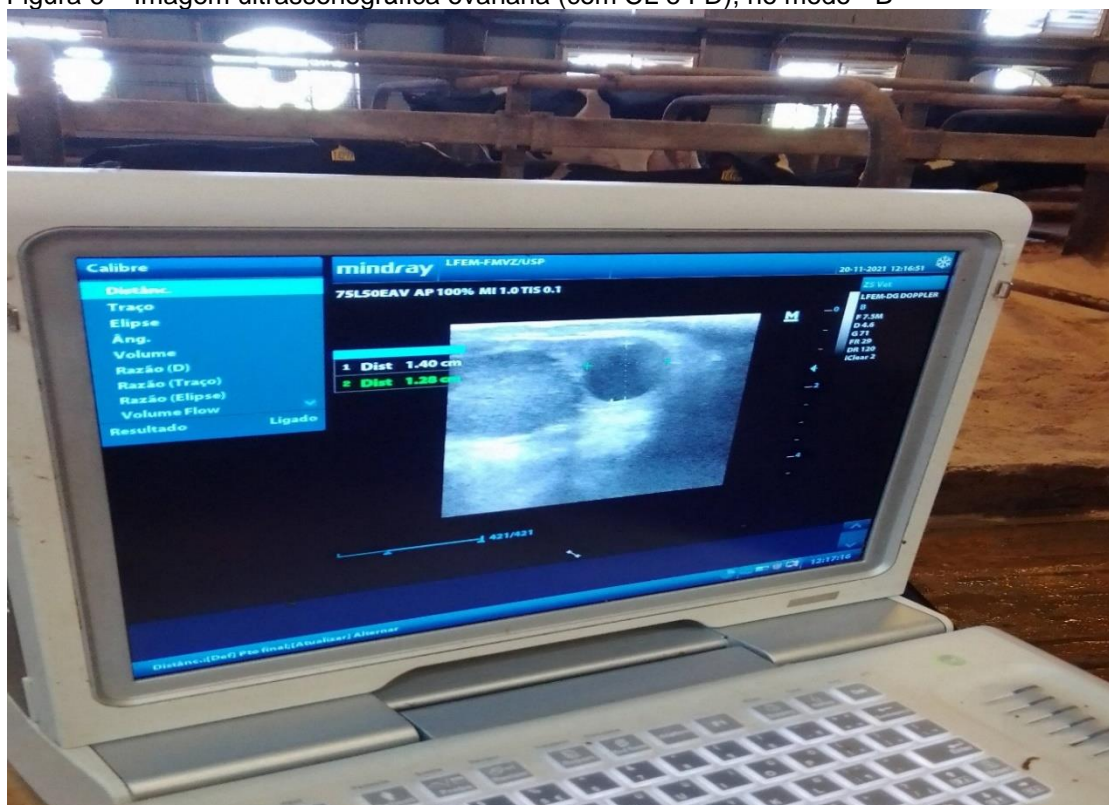
Figura 5 – Animais com escore de condição corporal (E. C. C.) entre 2,5 e 3,0 (escala 1 a 5)



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Além disso, as fêmeas deveriam estar ciclando o que foi verificado pelo escaneamento e visualização dos ovários (Figura 6) por meio de avaliações ultrassonográficas via transretal, com emprego de probe linear (Z-5 Mindray). As configurações da imagem foram padronizadas em escala de cinza (modo-B) e em frequência de 7,5 MHz (Megahertz), para melhor visualização das estruturas ovarianas. Quando necessário, realizou-se a varredura também pelo modo Doppler-colorido, para visualização do fluxo sanguíneo do CL em frequência de 5,7 MHz.

Figura 6 – Imagem ultrassonográfica ovariana (com CL e FD), no modo - B



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Os animais escolhidos para o estudo apresentavam-se vacinados contra febre aftosa e brucelose, com idade entre 36 e 60 meses, produção média leiteira de $52,1 \pm 7,77$ L/dia) e foram divididos em duas classes segundo a produção leiteira, utilizando-se a mediana (51L/dia): **Classe – 1** (animais de alta produção leiteira e acima da mediana - 51L/dia) e **Classe - 2** (vacas também de alta produção, no entanto, abaixo da mediana - 51L/dia).

Durante o estudo, os animais poderiam ser descontinuados, caso apresentassem alterações sistêmicas indicativas de doença, ou se eventualmente fossem tratados com antimicrobianos ou anti-inflamatórios, devido à qualquer outra ocorrência não relacionada à pesquisa. Também seriam excluídos animais que apresentassem alteração na glândula mamária, ao exame físico, ou que cessassem o período de lactação ao longo do estudo; no entanto, os animais participaram do estudo sem nenhuma ocorrência. Alterações causadas por estresse ou que apresentassem justificativa fisiológica não foram adotadas como critério de exclusão.

No decorrer do período experimental, os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais (luz e temperatura) e contidos em canzil, somente no momento do manejo. Receberam água e suplementação mineral *ad libitum* e após a

ordenha da manhã (5h), tarde (13h) e noite (20h), alimento volumoso composto de silagem de milho e caroço de algodão e concentrado à base de ração comercial. Os animais do estudo permaneceram no sistema de confinamento em “free stall” fechado e totalmente climatizado (Figura 7), com os demais da propriedade e, após o experimento, retornaram à rotina da fazenda.

Figura 7 – Sistema de confinamento em “free stall” – Fazenda Colorado

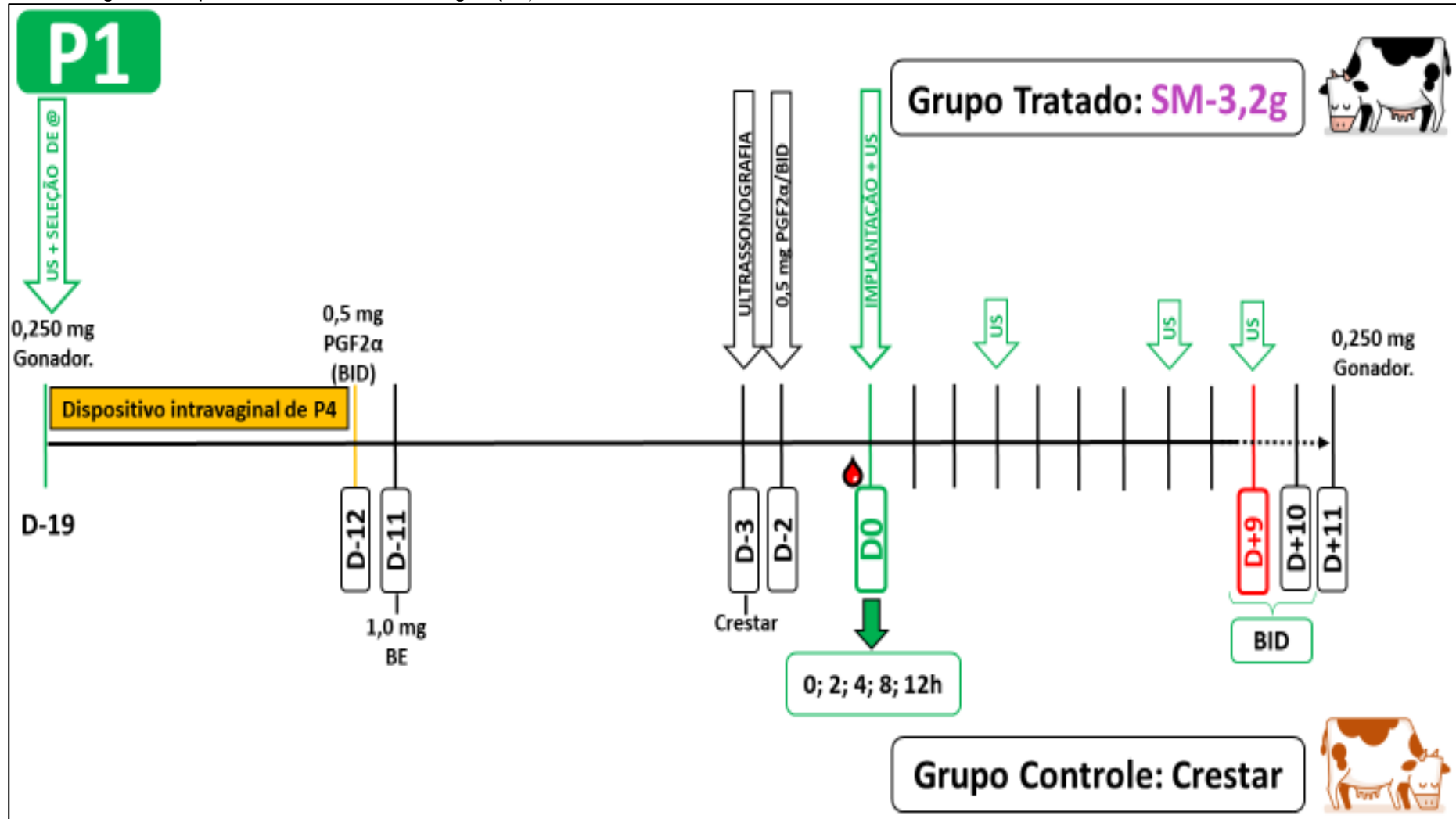


Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

5.1.3 Delineamento Experimental

Foi empregado um delineamento em “Cross over”, com dois períodos, nos quais distribuíram-se as 20 vacas em dois grupos experimentais: 1) Grupo **CON** - controle: vacas com implante auricular subcutâneo de progestágeno; e 2) Grupo **SM-3,2** - tratado: vacas com dispositivo intravaginal com 3,2 gramas de P4. Ao fator tratamento, foram acrescentadas amostras repetidas no tempo. Antes do início de qualquer atividade, submeteram-se as vinte fêmeas bovinas múltiparas e lactantes a um protocolo de sincronização do ciclo estral pré-inclusão, em dois momentos do experimento (P1 e P2), com a finalidade de induzir a formação de corpo lúteo. Para isso, adotou-se o protocolo apresentado nas Figura 8:

Figura 8 – Ilustração do delineamento experimental com protocolo de sincronização do ciclo estral para inclusão de animais no estudo, avaliações ultrassonográficas e períodos de colheita de sangue (P1)



Fonte: Guilger-Gonzaga (2021).

Dispositivo intravaginal de P4 - Dispositivo intravaginal de P4 (progesterona); Gonador: gonadorelina; PGF2 α : cloprostenol sódico; BE: benzoato de estradiol; Crestar: progestágeno; US: ultrassonografia retal; BID – *bis in die*.

Os animais foram contidos em canzil (Figura 9) e submetidos a avaliação clínica e ultrassonográfica no período matutino, no primeiro dia da sincronização do ciclo estral, para seleção e inclusão dos animais no estudo. A sincronização iniciou-se dezoito dias antes dos tratamentos dos grupos experimentais (D-19 no P1 e D+11 no P2) com a administração de 0,25 mg de Gonadorelina (Fertagyl® - MSD Saúde Animal Brasil), imediatamente antes da aplicação do dispositivo intravaginal de 1,9g de progesterona (CIDR® - Zoetis Brasil), que foi retirado após sete dias (D-12 / D+18), quando foi administrado 0,530 mg de Cloprostenol Sódico (Cioprostinn® - Boehringer Ingelheim). A retirada do dispositivo e a administração da prostaglandina asseguraram a interrupção da fase progestacional, proporcionando ao folículo dominante (FD) ambiente hormonal favorável à maturação folicular final. No dia seguinte após a retirada do dispositivo (D-11 / D+19) aplicou-se 1,0 mg de Benzoato de Estradiol (Estrovulinn® - Boehringer Ingelheim), com intuito de diminuir a variação no momento da ovulação.

Figura 9 – Canzil de contenção dos animais – “free stall” da Fazenda Colorado



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Após oito dias da administração do BE (D-3 / D+27), os animais foram submetidos à ultrassonografia transretal, para confirmar a presença do CL e inclusão

dos mesmos no estudo e, em seguida, todos eles receberam implante auricular subcutâneo do progestágeno Norgestomet (Crestar® - MSD Saúde Animal Brasil), para evitar possíveis ovulações de novos folículos, bloquear o eixo hipotálamo hipofisário e evitar a formação de CL, que produziria P4 endógena. No dia seguinte (D-2 / D+28), ou seja, dez dias após a retirada dos implantes, administrou-se 0,530 mg de Cloprostenol Sódico (BID), para induzir a regressão do CL e interromper a produção de P4 (Figura 10), para que as colheitas de sangue, seguramente, se iniciassem na ausência de CL funcional.

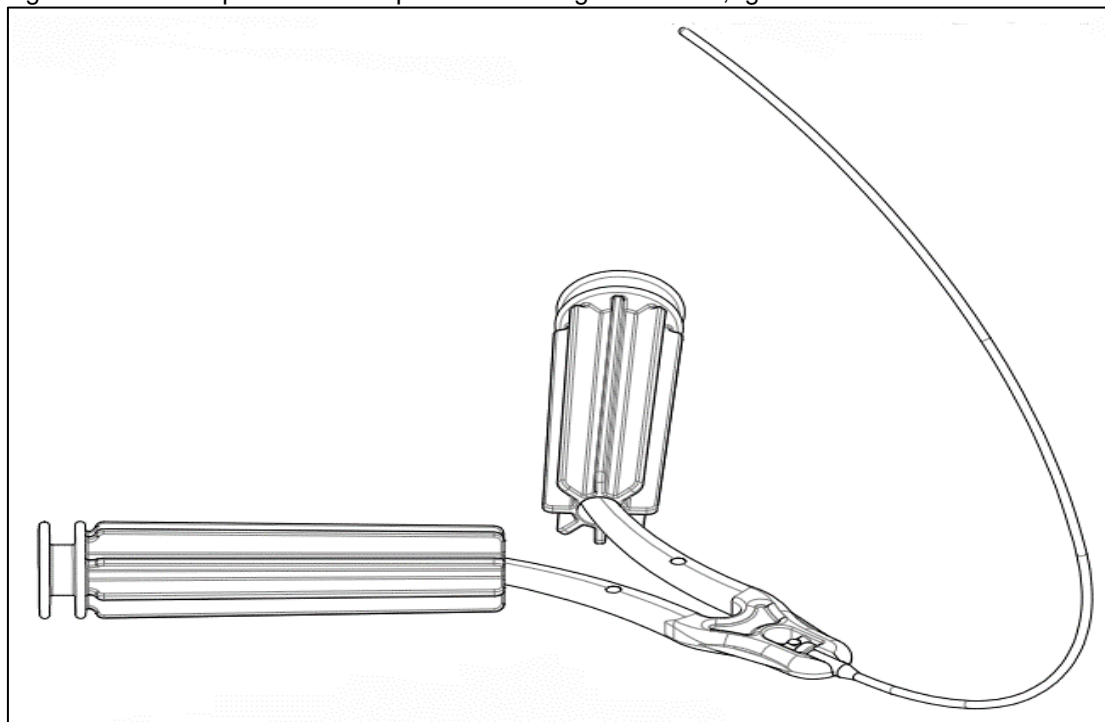
Figura 10 – Imagem ultrassonográfica no modo - Doppler do ovário com CL vascularizado



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Quarenta e oito horas após (no D0 / D+30) e, ainda no período matutino, realizou-se outra visualização ovariana, na qual foi confirmada a ausência de CLs funcionais e, em seguida, os animais foram estratificados em dois grupos, controle - **CON** (n=10) e tratado - **SM-3,2** (n=10). Assim, os animais do grupo **CON** receberam implante auricular subcutâneo de progestágeno adicional (Crestar®), enquanto os do grupo **SM-3,2** tiveram o implante subcutâneo retirado e receberam o novo dispositivo contendo 3,2g de P4 e com área superficial de 248,8 cm²/cada (Figura 11).

Figura 11 – Protótipo do novo dispositivo intravaginal SM – 3,2g



Fonte: Fonte: Innovare Biotecnologia e Saúde Animal Ltda (2023).

Neste dia (D0 / D+30), foram feitas as colheitas de amostras sanguíneas na veia epigástrica superficial (mamária) (Figura 12) no T0 (momento que antecede a implantação dos DIV nos animais) e 2h, 4h, 8h e 12h após colocação dos dispositivos. Entre os dias 1 e 9, foram colhidas as amostras, diariamente, até a retirada dos implantes: 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3), 96h (D4), 120h (D5), 144h (D6), 168h (D7), 192h (D8) e 216h (D9m). Após a retirada dos implantes, colheram-se mais 4 amostras de sangue, com intervalo de 12h, nos tempos : 228h (D9,5), 240h (D10) 252h (D10,5) e 264h (D11). No D10 foi administrado PGF2 α (BID), com intuito de eliminar qualquer CL “ativo”. Em seguida, no D11, aplicaram-se 0,250 mg de gonadorelina (Fertagyl® MSD Brasil), totalizando no final dessa primeira etapa do experimento, 18 amostras sanguíneas de cada animal. A administração da dose de GnRH, no último dia de coleta de sangue (D11), correspondeu ao início da segunda etapa (P2) do delineamento alternado, ou seja, os que eram do grupo controle, no primeiro período (P1), passaram ao grupo dos tratados e vice-versa e assim todas essas mesmas etapas foram repetidas no P2. Os dispositivos SM-3,2 retirados foram higienizados e encaminhados ao laboratório para quantificação do teor de P4 residual.

Figura 12 – Realização da colheita sanguínea em veia epigástrica superficial (mamária)



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

5.1.3.1 Exame ultrassonográfico

Com os animais devidamente contidos no canzil, realizou-se a varredura ovariana ultrassonográfica via transretal, com emprego de probe linear (Z-5 Mindray), enquanto os animais estavam implantados para verificar se algum deles não ovularam, tanto no P1 quanto no P2. As configurações da imagem também foram padronizadas em escala de cinza (modo-B) e em frequência de 7,5 MHz, e 5,7 MHz para o modo Doppler-colorido.

5.1.3.2 Tratamento

Foram administrados no D0, no período da manhã, os tratamentos no grupo CON (implante auricular subcutâneo de progestágeno) e no grupo SM-3,2 (dispositivo intravaginal com 3,2g de progesterona), este com auxílio de um aplicador intravaginal. Os implantes permaneceram nos animais por nove dias, tanto no período 1, quanto

no período 2 do experimento. Os horários de implantação e retirada dos dispositivos foram anotados em formulários e padronizados como horário-base para a colheita do material biológico até o final do experimento, ou seja, até o décimo primeiro dia após a colocação dos dispositivos, ou dois dias após a sua retirada.

5.1.3.3 Colheita das amostras (sangue) e processamento

Durante todas as etapas (pré-sincronização, exame clínico e ultrassonográfico, implantação e retirada dos dispositivos) os animais foram acompanhados até o canzil, evitando-se qualquer tipo de estresse e, ao final de cada manejo, os mesmos foram soltos e encaminhados junto aos outros animais do corredor.

Para a colheita das amostras de sangue e obtenção do plasma, realizou-se a assepsia do local com algodão e álcool 70° e, em seguida, utilizando-se agulhas estéreis e tubos tipo *Vacutainer*, puncionou-se e colheram-se, pela veia mamária, aproximadamente 9 mL de sangue, de cada animal, em tubos com heparina (tampa verde), tomando-se o cuidado de evitar borbulhamento da amostra. Os tubos, devidamente identificados com os respectivos números de registro dos animais, foram dispostos em estantes próprias e em caixa térmica de isopor contendo gelo gel artificial reutilizável até o momento do processamento das amostras. O horário de colheita do material biológico foi anotado em formulários e o tempo de colheita em todos os animais não excedeu uma hora nos dias de implantação dos dispositivos (D0) tanto do primeiro quanto do segundo período e, meia-hora (30 minutos) nos demais dias de coleta (D0 a D11), em ambos os períodos.

Todos os dias, após o término da colheita, os tubos foram encaminhados ao laboratório na própria sede, onde as amostras foram centrifugadas (Figura 13) à 1500 g durante 15 minutos à temperatura de 4°C (Centrífuga Refrigerada Hettich – 380R).

Figura 13 – Laboratório com centrífuga (Centrífuga Refrigerada Hettich – 380R)



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Após a centrifugação, com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, o plasma foi fracionado em três tubos de plásticos tipo *Eppendorf*, previamente identificados (aproximadamente 1,0 mL em cada) (Figura 14), acondicionados em caixas criogênicas e armazenados em freezer, até o envio ao laboratório, para dosagem da concentração plasmática de P4, por Radioimunoensaio (RIE).

Figura 14 – Mesa laboratorial com tubos de heparina (plasma) e *eppendorf*



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

5.1.4 Quantificação da progesterona

O método de quantificação da P4 no plasma de bovinos foi realizado por RIE, com o kit CT-500 (MP Biomedicals) no Contador Cobra Auto Gamma (Packard) da Perkin Elmer do Laboratório de Dosagens Hormonais, do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP– Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do Pesquisador Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira. Realizou-se a análise das amostras de plasma dos dez animais tratados com o novo produto (SM-3,2) e dez animais tratados com implante auricular subcutâneo de progestágeno (CON), tanto no primeiro, quanto no segundo período do experimento.

5.2 TESTES DE DISSOLUÇÃO DE P4 *IN VITRO*

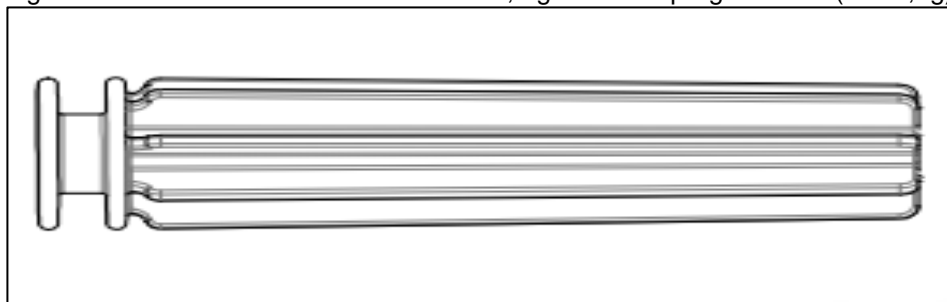
5.2.1 Local e período dos experimentos de dissolução *in vitro*

Foram realizados dois experimentos *in vitro* no ano de 2022, no laboratório da Innovare Biotecnologia e Saúde Animal Ltda., em conjunto com a Bioxen Pesquisa e Desenvolvimento em Medicina Veterinária.

5.2.2 Amostras

O experimento 1 foi realizado em triplicata, as peças do dispositivo SM-3,2 (Figura 15) adicionadas em um frasco e submetidas ao teste de dissolução, com emprego de solução etanol-água (60:40 v:v). E no experimento 2, a triplicata foi submetida ao teste de dissolução, com emprego do meio aquoso, com 0,5% de SDS.

Figura 15 – Modelo de silicone contendo 3,2 gramas de progesterona (SM-3,2g)



Fonte: Innovare Biotecnologia e Saúde Animal Ltda (2023).

A cavidade central das peças foi obstruída por um plug de policarbonato e vedada com adesivo acrílico Loctite®, que é impermeável à P4, para evitar a liberação da mesma pela face interna da peça, pois essa face praticamente não contribui com a liberação de P4 *in vivo*, mas pode ser significativa para liberação no teste *in vitro*, uma vez que o meio de dissolução tem contato direto com ela.

5.2.3 Delineamento experimental

Para a realização do teste de dissolução *in vitro*, prepararam-se 5 L de cada um dos dois meios de dissolução e, então, frascos Schott (com capacidade para 1.000 mL) receberam 700 mL do respectivo meio e foram levados à incubadora aquecida, com agitação orbital (120 rpm), até atingirem a temperatura de 38°C.

Ao atingirem a temperatura programada, as amostras de dispositivos foram submergidas nos respectivos frascos, uma a uma. Decorridos 2 minutos após a introdução do primeiro dispositivo, coletou-se a primeira amostra, de 2 mL, com pipeta semiautomática. A amostra de 2 mL foi dividida em dois vials, de modo a gerar duas alíquotas de 1 mL. Dois mL do meio foram repostos, imediatamente após a colheita da amostra. Repetiu-se este procedimento até que todos os dispositivos estivessem colocados na incubadora.

Após a colheita das amostras de dois minutos, repetiu-se o mesmo procedimento nos tempos 2h, 4h, 8h, 12h e 24h (D+1), coletando-se amostras de 1 mL, quando, a partir de então, nos tempos 48h (D+2), 72h (D+3), 96h (D+4), 120h (D+5), 144h (D+6), 168h (D+7), 192h (D+8) e 216h, após a colheita da amostra, ao invés da reposição de 1 mL de meio de dissolução, todo o volume do meio foi renovado à cada 24 h, totalizando ao final da incubação, 14 colheitas de cada dispositivo, para cada meio de dissolução. É importante salientar que todas as amostras colhidas foram acondicionadas sob refrigeração e retiradas somente no momento da quantificação por espectrofotometria (absorbância em comprimento de onda de 234 a 244 nm).

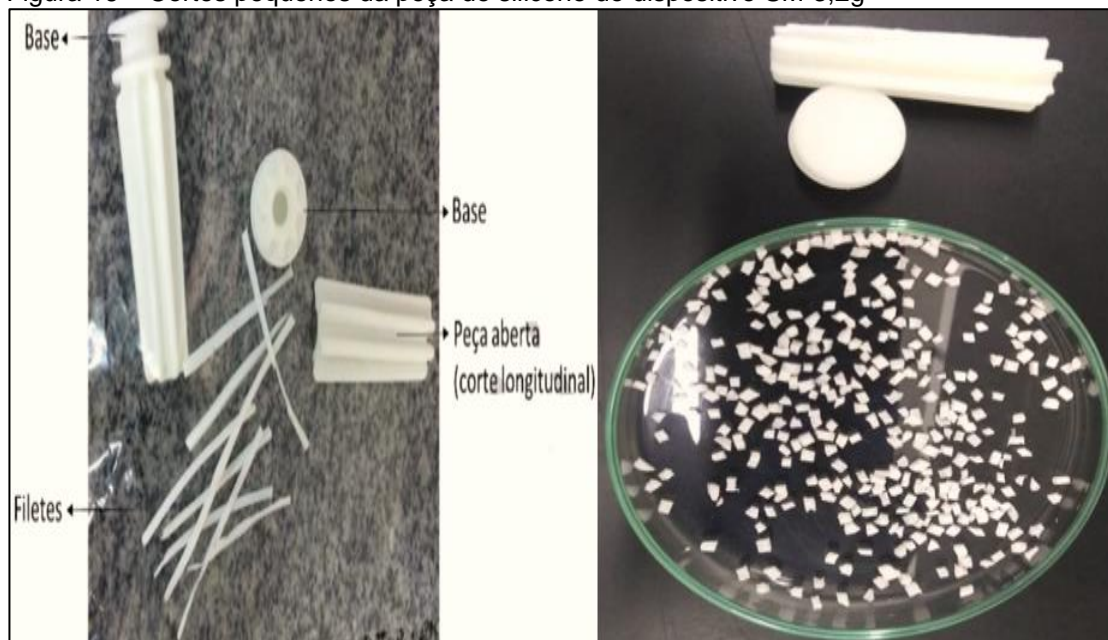
5.3 TESTE DE QUANTIFICAÇÃO DE P4 RESIDUAL

Após a realização dos testes *in vivo*, os dispositivos SM-3,2, retirados dos animais no D9, tanto na etapa 1 quanto na 2, foram higienizados em água corrente,

colocados em recipiente identificado com o número do animal e encaminhados ao laboratório para quantificar a P4 residual do dispositivo.

Pesaram-se 2.000 mg da peça picada (Figura 16) e, com auxílio de um funil, foram introduzidas em um balão volumétrico de 50 mL com álcool isopropílico. O balão foi levado ao banho ultrassônico (Eco-sonics mod. Q3,8L/40 kHz), por 60 minutos, para a extração total da P4 dos fragmentos de dispositivo. Logo após, deixou-se descansar, em temperatura de bancada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), por 120 min, voltando-a imediatamente ao ultrassom sob aquecimento por mais 30 min. Ao final, colocou-se a amostra na bancada e aguardou-se até o equilíbrio de sua temperatura com a do ambiente. A amostra foi então diluída, para que a leitura da absorbância estivesse próxima à de 50% da curva-padrão. Para isso, em um balão volumétrico de 10 mL calibrado, colocaram-se 10 mL de solução de álcool isopropílico: água (60:40), retiraram-se 25 μL da solução e acrescentaram-se 25 μL da solução de extração das peças. Logo após, homogeneizaram-se as amostras e realizaram-se as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro, também em comprimento de onda de 234 a 244 nm (INNOVARE BIOTECNOLOGIA E SAÚDE ANIMAL LTDA, 2023).

Figura 16 – Cortes pequenos da peça de silicone do dispositivo SM-3,2g



Fonte: Innovare Biotecnologia e Saúde Animal Ltda (2022).

5.4 PREPARO DA CURVA PADRÃO PARA OS TESTES *IN VITRO* E PARA QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES RESIDUAIS DE P4

Para o preparo da curva padrão de P4, utilizada nos testes acima, preparou-se a solução A da seguinte forma. Pesou-se a P4 Padrão (0,005g), em barco de pesagem, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e acrescentou-se a solução de álcool isopropílico:água, na proporção de 60:40. Deixou-se por 30 minutos na cuba ultrassônica à 40°C. Retirou-se e, ao atingir a temperatura do balcão, acertou-se o menisco e homogeneizou-se o balão. Preparou-se a curva-padrão em balões volumétricos de 10 mL, com auxílio de pipeta de 1000 µL, colocando-se 10 mL de solução A no balão, retirando-se o volume a ser colocado de solução de P4 e, em seguida, adicionando-se o volume especificado de solução A, para se obterem as seguintes concentrações (Quadro 1):

Quadro 1 – Concentrações e diluições para preparo da curva padrão

Concentrações	Diluições
15,0 mcg/mL	1,5 mL de solução A e qsp 10 mL de solução de diluição para curva padrão
10,0 mcg/mL	1,0 mL de solução A e qsp 10 mL de solução de diluição para curva padrão
7,5 mcg/mL	0,75 mL de solução A e qsp 10 mL de solução de diluição para curva padrão
5,0 mcg/mL	0,5 mL de solução A e qsp 10 mL de solução de diluição para curva padrão
2,5 mcg/mL	0,25 mL de solução A e qsp 10 mL de solução de diluição para curva padrão
1,25 mcg/mL	0,125 mL de solução A e qsp 10 mL de solução de diluição para curva padrão

Fonte: Inovare Biotecnologia e Saúde Animal Ltda (2023).

Homogeneizaram-se os balões e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 234 a 244 nm (absorbância entre 20% e 80%).

Para a quantificação de P4 do teste de dissolução *in vitro*, com emprego dos meios etanol:água (60:40) e SDS 0,5%, preparou-se a curva padrão, como descrito acima, utilizando-se como diluidor da solução A, o mesmo meio usado no teste de dissolução. Da mesma forma, também empregou-se o mesmo meio do teste de dissolução para as diluições das amostras, quando foram necessárias, para que a absorbância das mesmas ficasse entre 20 e 80%.

Para a quantificação do teor residual de P4, utilizou-se solução de álcool isopropílico e água (60:40), tanto para a diluição da solução A, quanto para a diluição das amostras, quando necessário, uma vez que toda a extração foi realizada em álcool isopropílico.

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados foram analisados com emprego do programa *Statistical Analysis Systems* (SAS version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Os mesmos foram previamente verificados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Os que não respeitaram a normalidade foram transformados e/ou feita a retirada de outliers. Os normais ou transformados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os tratamentos e tempos foram analisadas por medidas repetidas no tempo, pela seleção da melhor matriz (menor AICC) seguido da observação de diferenças entre os grupos, quando significativo, pelo teste de Tukey-Kramer (PROC GLIMMIX). Os tratamentos foram comparados em relação ao tempo, sendo analisados primeiramente a interação, e quando a mesma não foi encontrada foram analisados os efeitos isolados de tratamento e/ou tempo. Os dados foram apresentados em forma de média e erro padrão da média. Foi também realizado o teste de correlação (PROC CORR) entre os tratamentos (*in vitro* x *in vitro* álcool x *in vitro* SDS), onde o valor de “r” representa a força de correlação entre os tratamentos estatisticamente significantes. Para todas as comparações foi utilizado o nível de significância estatística de 5% ($p \leq 0,05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EXPERIMENTO *IN VIVO*

Em relação aos resultados de progesterona plasmática do teste *in vivo* realizados desde a implantação dos dispositivos nos animais (0h), até dois dias após sua retirada (264h/D11), foi observada interação de efeitos de tratamento x tempo ($p < 0,0001$) (Tabela 1). O grupo SM-3,2 apresentou concentrações plasmáticas de P4 maiores que o grupo CON, a partir de duas horas após a implantação, mantendo-se estável durante os nove dias após o implante (216h).

Tabela 1 - Média \pm erro padrão da média dos valores de progesterona quantificada *in vivo* (em ng/mL) nos grupos CON (Controle) e SM-3,2 (Sincromilk), em função de tempo (0h à 264h)

TEMPO	CON	SM-3,2
0h	0,09 \pm 0,009	0,14 \pm 0,027 ^C
2h	0,11 \pm 0,004 ^b	0,88 \pm 0,111 ^{ABa}
4h	0,11 \pm 0,006 ^b	0,84 \pm 0,1 ^{Ba}
8h	0,1 \pm 0 ^b	0,98 \pm 0,121 ^{ABa}
12h	0,1 \pm 0,003 ^b	1,1 \pm 0,097 ^{Aa}
24h (D1)	0,1 \pm 0,001 ^b	1,09 \pm 0,099 ^{Aa}
48h (D2)	0,1 \pm 0,006 ^b	1,1 \pm 0,063 ^{Aa}
72h (D3)	0,1 \pm 0,006 ^b	0,86 \pm 0,095 ^{Ba}
96h (D4)	0,11 \pm 0,01 ^b	0,72 \pm 0,049 ^{Ba}
120h (D5)	0,13 \pm 0,026 ^b	0,71 \pm 0,065 ^{Ba}
144h (D6)	0,1 \pm 0,009 ^b	0,75 \pm 0,066 ^{Ba}
168h (D7)	0,14 \pm 0,037 ^b	0,72 \pm 0,07 ^{Ba}
192h (D8)	0,11 \pm 0,012 ^b	0,66 \pm 0,06 ^{Ba}
216h (D9m)	0,1 \pm 0,007 ^b	0,8 \pm 0,078 ^{Ba}
228h (D9t)	0,11 \pm 0,007	0,17 \pm 0,049 ^C
240h (D10m)	0,11 \pm 0,009	0,15 \pm 0,032 ^C
252h (D10t)	0,09 \pm 0,005	0,11 \pm 0,014 ^C
264h (D11m)	0,09 \pm 0,006	0,11 \pm 0,012 ^C

Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

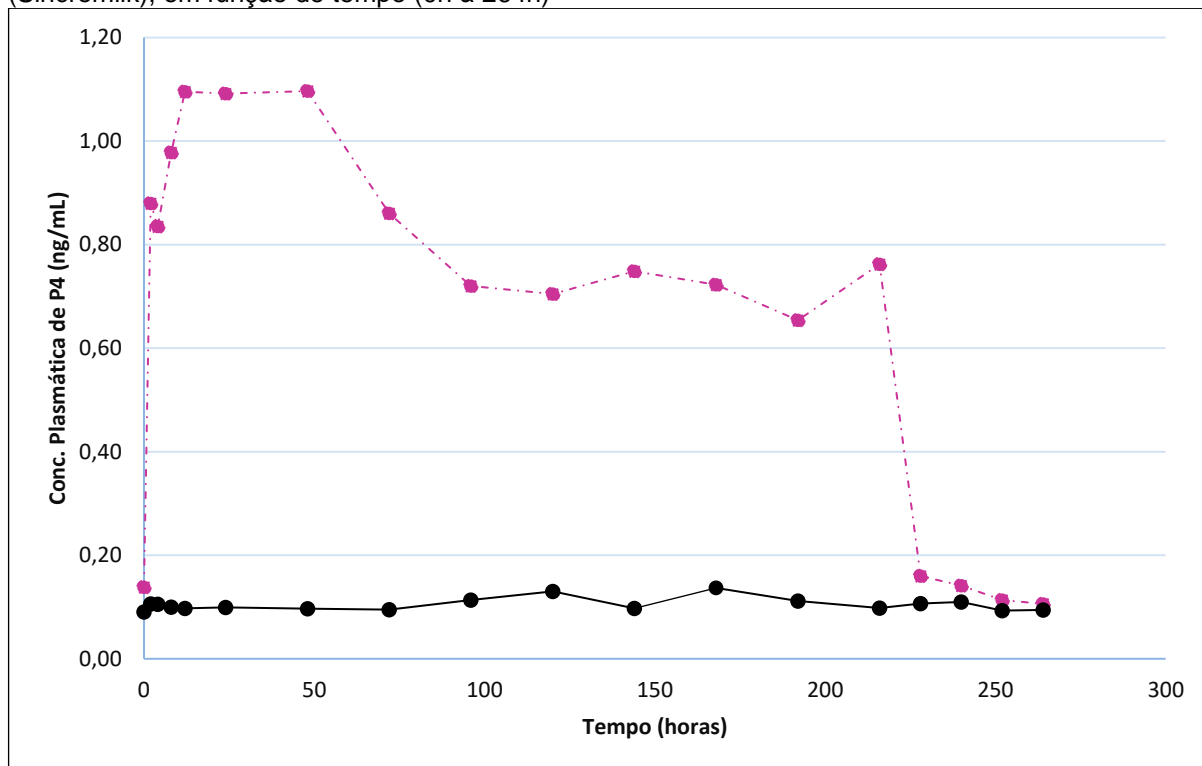
^{a,b} letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na linha (tratamento) pelo teste de médias de Tukey-Kramer ($p < 0,05$); ^{A,B,C} letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na coluna (tempo) pelo teste de médias de Tukey-Kramer ($p < 0,05$); *m (manhã); *t (tarde)

O primeiro dado importante dessa tabela é a concentração plasmática de P4, encontrada no marco inicial do experimento (0h). Notam-se teores, basais nos grupos CON e SM-3,2 ($0,09 \pm 0,009$ e $0,14 \pm 0,027$, respectivamente), ou seja, a escolha do protocolo, utilizando-se a PGF2 α (Fig. 8) foi efetivo, pois provocou a regressão luteínica e garantiu a ausência da fonte endógena de P4 (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995), evitando-se realizar a ovariectomia dos animais (VAN WERVEN et al., 2013), para que assim, após o estudo, os mesmos continuem normalmente nas linhas reprodutiva e produtiva da propriedade.

Ainda de acordo com a tabela anterior, é possível observar que a média das concentrações plasmáticas de progesterona, nos animais tratados com o novo DIV de 3,2g, quintuplicou, partindo de 0,14 ng/mL para 0,88 ng/mL em apenas duas horas após a inserção dos implantes. Vários autores têm demonstrado grande oscilação de P4 na espécie bovina, tanto em animais implantados, quanto nos que não possuem fonte exógena do esteroide; no entanto, todos eles evidenciam o aumento na concentração plasmática, quando utiliza-se o DIV. Robinson, Leslie e Walton (1989), em estudo realizado com vacas holandesas ovariectomizadas, mostraram que a concentração plasmática média de P4 pré-implantação era de $0,6 \pm 0,06$ ng/mL e após 24 horas, com o DIV, alcançavam valores médios de $3,68 \pm 0,25$ ng/mL. Em outro estudo com animais ovariectomizados, utilizando-se dispositivos intravaginais, observaram-se concentrações máximas de aproximadamente 5 ng/mL de progesterona já após 2 horas da implantação (UEHLINGER et al., 1995). Animais zebuínos igualmente ovariectomizados também apresentaram picos do esteroide circulante pós-implantação entre 5 – 6 ng/mL entre 1–3 h (BÓ; BARUSELLI, MARTINEZ, 2003) e, mais recentemente, as concentrações plasmáticas de P4, em vacas holandesas ovariectomizadas e não lactantes, apresentaram picos de 4 a 5 ng/mL também poucas horas após a inserção do DIV (VAN WERVEN et al., 2013).

Uma das características interessante desses implantes é que eles são capazes de proporcionar esse aumento abrupto nas concentrações plasmáticas de P4 e mantê-las elevadas por vários dias, até que eles sejam removidos. O comportamento da concentração plasmática de P4, nos animais de ambos os grupos, em função de tempo, durante os 11 dias do experimento *in vivo*, é apresentado no gráfico 1, a seguir.

Gráfico 1 – Concentração plasmática de progesterona em animais do Grupo CON (Controle) e SM-3,2 (Sincromilk), em função de tempo (0h à 264h)



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Legenda: roxo (tracejado) representa os animais implantados com o novo dispositivo (SM-3,2) e preto os animais do grupo controle (CON).

Constata-se neste gráfico, o pico de P4 plasmático, após 12 horas de inserção do DIV ($1,1 \pm 0,097$ ng/mL), que se manteve por dois dias ($1,1 \pm 0,063$) e, só a partir de 72 horas (D3), é que começou a declinar ($0,86 \pm 0,095$ ng/mL), permanecendo constante até o nono dia de tratamento ($0,80 \pm 0,078$ ng/mL), ou seja, o dia de retirada do implante.

Esses valores mesmo baixos, em animais dessa categoria, ou seja, vacas leiteiras em lactação, cíclicas, sem CL e implantadas, aparentam ser normais (LIMA et al., 2009; BISINOTTO et al., 2015). Em outro estudo, com animais da mesma raça e categoria, de alta produção leiteira (média de 45 kg/dia) e implantados com DIV novos ou usados, apresentaram concentrações plasmáticas de $0,77 \pm 0,05$ e $0,90 \pm 0,05$ ng/mL, nas três primeiras horas pós implantação, e concentração média de $0,78 \pm 0,04$ ng/mL (novo) vs. $0,67 \pm 0,04$ ng/mL (usado), durante tratamento de sete dias (CERRI, et al., 2009), ou seja, os resultados ficaram próximos dos deste experimento, com valores médios de 0,86 ng/mL, tanto nas três primeiras horas, quanto nos demais dias de tratamentos (216h/D9m), o que também corroborou com a média de $0,7 \pm 0,1$ ng/mL, encontrada no plasma bovino, quando utilizado um DIV de 0,75g de P4, durante um

período de dez dias de tratamento, em vacas holandesas não lactantes (SILVA et al., 2021). Entretanto, diferiu dos resultados encontrados por Uehlinger e colaboradores (1995), onde vacas pardo-suíças ovariectomizadas e implantadas, alcançaram concentrações próximas de 2 ng/mL, durante os seis dias de tratamento e de vacas holandesas, também castradas, com 2,5 e 3,0 ng/mL, no sétimo dia após a implantação (VAN WERVEN et al., 2013), e próximos de 2 ng/mL, no décimo e 1,7 ng/mL, no décimo primeiro dia, após a implantação do DIV (ROBINSON; LESLIE; WALTON, 1989). Já em vacas zebuínas, também castradas, observaram-se concentrações entre 2 e 3 ng/mL, que permaneceram constantes durante oito dias de tratamento (BÓ; BARUSELLI, MARTINEZ, 2003). Em novilhas Friesian, foram encontrados valores médios de 5,6 ng/mL, pico de 8,7 ng/mL em poucas horas após implantadas, e 2,5 ng/mL na remoção do mesmo (MACMILLAN et al., 1991). Mais recentemente, vacas holandesas não-lactantes e implantadas com DIV, contendo diferentes teores de P4 (entre 0,5 g e 2,0 g), apresentaram picos entre $1,6\pm 0,1$ e $2,9\pm 0,2$ ng/mL e médias das concentrações plasmáticas entre $0,7\pm 0,1$ e $1,6\pm 0,1$ ng/mL, durante dez dias de tratamento (SILVA et al., 2021).

Após a última colheita sanguínea (216h/D9m), no presente estudo, os animais implantados apresentaram concentração plasmática média de $0,8\pm 0,078$ ng/mL. Doze horas após a remoção do DIV (228h/D9t), houve queda brusca nessa concentração, com valores encontrados nesse momento de $0,17\pm 0,049$ ng/mL, com queda para $0,11\pm 0,012$ ng/mL, dois dias após (264h/D11). Isto quer dizer que não diferiram dos valores no tempo 0h, ou seja, com das concentrações plasmáticas do pré-tratamento ($0,14\pm 0,027$). Isto ocorre por que a meia-vida da progesterona na espécie bovina é de aproximadamente 30 minutos (MILLER et al., 1963), assim, após a retirada de implantes, em poucos minutos as concentrações de P4 vão a níveis considerados basais (ROBINSON; LESLIE; WALTON, 1989; RATHBONE et al., 1998).

Após a retirada dos DIV (D9m), os mesmos foram higienizados em água corrente, colocados em recipiente, identificados, encaminhados ao laboratório para quantificar a P4 residual dos dispositivos e os valores encontrados estão apresentados a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 – Peso dos silicones contendo 10% de Progesterona, P4 residual (em %) e P4 liberada (em g e em %) pelos dispositivos utilizados em cada animal, no experimento *in vivo*

Animal	Peso do silicone	P4 residual (em %)	P4 liberada (em g)	P4 liberada (em %)
12210	30,40	8,87	0,344	11,31
12243	31,20	9,63	0,115	3,7
12247	31,00	9,3	0,218	7,03
12545	30,60	8,85	0,318	10,39
12811	30,80	8,5	0,462	11,5
12883	30,60	8,74	0,386	12,61
13056	30,80	9,55	0,138	4,5
13108	31,20	9,67	0,104	3,33
13554	30,60	8,31	0,517	16,89
13620	30,60	9,06	0,288	9,4
13733	30,60	8,6	0,43	14,05
13855	30,80	8,28	0,53	17,2
14053
14272	30,80	8,61	0,43	13,96
14395	30,80	8,75	0,385	12,5
14488	31,00	8,58	0,44	14,21
14592	30,80	8,72	0,394	12,8
14986	30,80	8,33	0,516	16,75
14989	30,80	8,48	0,522	15,2
15015	30,60	7,88	0,648	21,02
Média	30,78	8,7742	0,3693	12,018
EPM	0,0481	0,1111	0,0338	1,100

Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Legenda: **14053** – número do animal que perdeu DIV no dia que antecedeu sua retirada.

Observa-se que a P4 liberada pelos DIV contendo 3,2g, variou entre 3,33% (0,104g) e 21,02% (0,648g), quantidade insuficiente para manter os teores plasmáticos acima de 1 ng/mL, após 72 horas de tratamento com o dispositivo (0,86 ±0,095) – Tabela 1, contrariando estudos de Macmillan e colaboradores (1991), onde dispositivos contendo 1,9g de P4 liberaram em torno de 50% do esteroide, e outros DIV que liberaram 1/3 da P4 total (RATHBONE et al., 2002a), alcançando concentrações plasmáticas próximo de 5 ng/mL (MACMILLAN et al., 1991).

De acordo com Wiltbank e colaboradores (2014), concentrações insuficientes de progesterona, durante o crescimento do folículo ovulatório comprometem o desenvolvimento dos folículos e não evitam a ovulação do FD.

No entanto, no presente estudo, mesmo liberando em média apenas 12,018±1,100% da P4 contida no DIV, somente um animal tratado (nº 12545), com o

SM-3,2 apresentou ovulação de seu FD (no D4), diferente do que foi observado em estudo recente, com vacas também holandesas, porém, não lactantes, utilizando-se DIV, com diferentes teores de P4 (até 1,55g), onde na primeira fase do experimento, o motivo de exclusão de 20% dos animais foi baseado na ausência do FD e presença de CL entre o D0 e D7 e, em uma segunda fase, mais 1/3 dos animais retirados apresentavam folículo ovulado entre D0 e D5 (SILVA et al., 2021), ou seja, essa baixa P4 liberada, contrariou de certa forma a afirmação de Rathbone et al. (2002), de que o fator carga de P4 no DIV intercede diretamente na liberação e manutenção das concentrações plasmáticas. Além disso, os animais 12243, 13056, 13108, tratados com DIVs que liberaram pouca progesterona, apresentaram folículo dominante de 12,5 x 13,7 mm, 18 x 18,4 / 11,3 x 15,5 e 14,9 x 17,8 / 13,5 x 15,8 mm, e concentrações plasmáticas médias entre o D0 e D9m de 0,81 ng/mL, 0,77 e 0,52 ng/mL, respectivamente, ou seja, tinham o FD presente até o momento da retirada dos implantes.

Mesmo a liberação da P4 pelo implante sendo relativamente baixa, uma relação interessante encontrada foi que esses mesmos animais, quando categorizados na **Classe - 1** (com alta produção e acima da mediana - 51L/dia) e na **Classe - 2** (também de alta produção, no entanto, abaixo da mediana - 51L/dia), quando submetidos a diferentes tratamentos (CON x SM-3,2), apresentaram efeito da interação tratamento x classe de produção de leite ($p=0,003$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Média \pm erro padrão da média da concentração de progesterona plasmática (em ng/mL), em animais da Classe - 1 (produção leiteira acima da mediana - 51L/dia) e Classe - 2 (produção leiteira abaixo da mediana - 51L/dia) submetidos aos tratamentos CON e SM-3,2

PRODUÇÃO LEITEIRA	CON	SM-3,2
Classe - 1	0,11 \pm 0 ^b	0,61 \pm 0,04 ^{Ba}
Classe - 2	0,10 \pm 0 ^b	0,73 \pm 0,04 ^{Aa}
TOTAL	0,10 \pm 0 ^b	0,67 \pm 0,03 ^a

Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

^{a,b} letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na linha pelo teste de médias de Tukey-Kramer ($p<0,05$); ^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na coluna pelo teste de médias de Tukey-Kramer ($p<0,05$).

Os animais tratados com a fonte exógena de P4 e que produziam uma maior quantidade de leite (Classe - 1) apresentaram aumento na concentração plasmática do esteroide (0,61 \pm 0,04 ng/mL), porém, menor do que nas vacas da Classe - 2

($0,73 \pm 0,04$ ng/mL). Note-se que, independentemente da classe, as vacas do presente estudo produziam, em média, 52 L/dia (aproximadamente 50 kg/dia) e esses resultados muito se assemelham aos do estudo realizado com animais da mesma raça, leiteiros (produção média de 45 kg/dia) e tratados com a fonte exógena de P4, onde foram observadas concentrações médias de P4 entre $0,67 \pm 0,04$ e $0,78 \pm 0,04$ ng/mL (CERRI et al., 2009), ou seja, mesmo com a eficiência produtiva leiteira um pouco menor, os resultados são similares ao deste estudo ($0,67 \pm 0,03$).

A priori, a teoria de que a diferença entre as concentrações plasmáticas de P4 em diferentes classes de vacas, como por exemplo, holandesas não lactantes, lactantes e lactantes de alta produção está relacionada com a ingestão de matéria-seca, maior metabolização hepática, maior produção leiteira e, conseqüentemente, menor teor do esteroide no sangue (RABIEE; MACMILLAN; SCHWARZENBERGER, 2001; SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2011a). Este fato é bem aceito há anos, no entanto, essa oscilação da P4 plasmática no estudo, pode ser respaldada pela teoria proposta por De Ziegler (1995), denominada como “Efeito da Primeira Passagem Uterina”, na qual sugere-se que parte da progesterona administrada por via vaginal em mulheres, transite pelo útero antes de atingir a circulação sistêmica. Assim, a utilização desse hormônio altamente lipofílico no sangue venoso da vagina, move-se para as artérias que irrigam o útero, criando uma distribuição preferencialmente uterina (CICINELLI et al., 1998).

Na espécie bovina, dois modelos de distribuição foram propostos por Mariano et al., 2010. O primeiro, onde ocorre distribuição parcial da P4 administrada por via vaginal para o útero, sem atingir a circulação sistêmica (mecanismo de contra corrente entre veias e artérias do útero e vagina) e apenas uma parte do esteroide administrado por essa via atinge a circulação sistêmica por via direta, e o segundo supõe-se que a P4 no útero pode se mover de volta para a circulação sistêmica, enquanto somente uma fração dela liberada pelo DIV o atinge diretamente. Os modelos indicaram que somente entre 5 e 30% da progesterona liberada da inserção intravaginal atinge diretamente a circulação sistêmica e, o restante sofre o efeito de primeira passagem uterina (sistema porta uterino), que mostrou-se ainda mais significativa em vacas de alta produção ($37,15 \pm 6,27$ L/dia), ou seja, o aumento do fluxo sanguíneo nesses animais poderia concomitantemente produzir aumento do “efeito de primeira passagem uterina”, reduzindo, conseqüentemente, a quantidade de progesterona disponível para atingir a circulação sistêmica (MARIANO et al., 2010). Assim, os teores

plasmáticos de progesterona circulante podem influenciar a absorção do esteroide, oriundo do implante, já que dependerá da concentração do hormônio entre a veia e artéria uterina. Deste modo, as vacas com maiores concentrações de P4 absorveriam menos hormônio da cavidade vaginal (MARIANO et al., 2010) e também maiores concentrações da P4 local, ou seja, no útero, não acarretaria mudanças plasmáticas (CICINELLI, 2008).

6.2 TESTES *IN VITRO*

Resultados das análises laboratoriais dos testes *in vitro*:

A quantidade de P4 acumulada, em função de tempo, segundo o meio de dissolução utilizado (ÁLC-60% ou SDS-0,5%) nos testes *in vitro*, está apresentada na Tabela 4. Não houve interação entre meio utilizado e tempo ($p < 0,05$), sendo significativos os efeitos de meio ($p < 0,0001$) e de tempo ($p < 0,0001$).

Tabela 4 - Média \pm erro padrão da média da quantidade de progesterona acumulada *in vitro* (em mg), utilizando-se dois diferentes meios de dissolução, ÁLC-60% (Álcool - 60%) e SDS-0,5% (Dodecil Sulfato de Sódio - 0,5%), em função de tempo (0,33h à 216h)

TEMPO	ALC-60%	SDS-0,5%	MÉDIA
0,33h	33,93 \pm 0,38 ^a	6,64 \pm 0,32 ^b	20,28 \pm 6,11 ^N
2h	300,69 \pm 5,3 ^a	120,07 \pm 4,57 ^b	210,38 \pm 40,51 ^M
4h	443,31 \pm 2 ^a	184,34 \pm 9,68 ^b	313,82 \pm 58,08 ^L
8h	646,28 \pm 7,77 ^a	281,36 \pm 5,76 ^b	463,82 \pm 81,71 ^K
12h	776,69 \pm 18,53 ^a	352,18 \pm 11,37 ^b	564,44 \pm 95,42 ^J
24h	1143,99 \pm 21,61 ^a	543,4 \pm 3,11 ^b	843,69 \pm 134,65 ^I
48h	1585,95 \pm 24,55 ^a	838,94 \pm 4,31 ^b	1212,44 \pm 167,41 ^H
72h	1919,94 \pm 31,59 ^a	1051,3 \pm 7,49 ^b	1485,62 \pm 194,77 ^G
96h	2207,72 \pm 37,29 ^a	1259,56 \pm 10,15 ^b	1733,64 \pm 212,72 ^F
120h	2439,4 \pm 37,39 ^a	1438,66 \pm 15,08 ^b	1939,03 \pm 224,5 ^E
144h	2596,42 \pm 36,61 ^a	1619,36 \pm 19,91 ^b	2107,89 \pm 219,27 ^D
168h	2688,47 \pm 38,48 ^a	1777,33 \pm 23,2 ^b	2232,9 \pm 204,73 ^C
192h	2756,36 \pm 39,08 ^a	1924,75 \pm 26,46 ^b	2340,56 \pm 187,15 ^B
216h	2815,66 \pm 39,44 ^a	2066 \pm 25,61 ^b	2440,83 \pm 168,94 ^A

MÉDIA	1596,77±153,16 ^a	961,71±109,04 ^b
-------	-----------------------------	----------------------------

Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

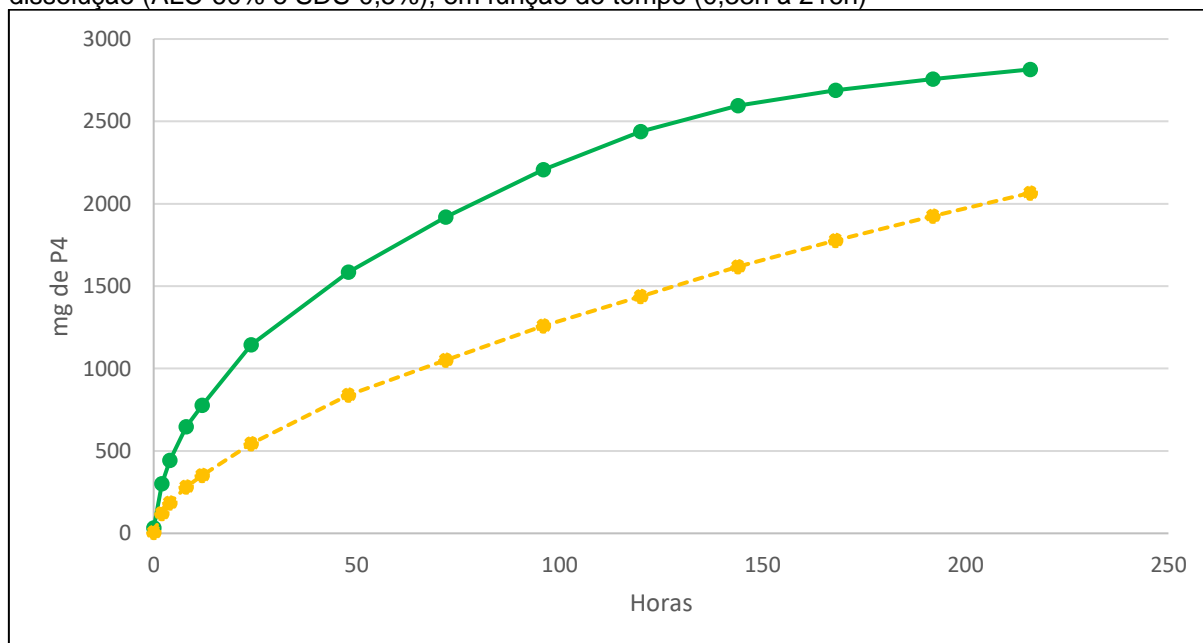
^{a,b} letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na linha pelo teste de médias de Tukey-Kramer ($p < 0,05$). A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na coluna pelo teste de médias de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

No tempo 0,33h (2 min) a P4 liberada pelo DIV contendo 3,2 g, no meio álcool foi de $33,93 \pm 0,38$ mg, enquanto no meio SDS foi de $6,64 \pm 0,32$ mg. Após duas horas, foram quantificados $300,69 \pm 5,3$ mg de P4 no álcool e $120,07 \pm 4,57$ mg no SDS, e depois de um dia, o valor no SDS ($543,4 \pm 3,11$) foi menos da metade do que no ÁLC-60% ($1143,99 \pm 21,61$). O interessante nesses primeiros tempos é que a liberação da P4 no meio surfactante além de ser menor, foi similar aos resultados de P4 liberadas por dispositivos contendo 1g ($499,10 \pm 24,48$) e 1,63g ($518,30 \pm 30,83$) de P4 em meio alcoólico (PIMENTEL et al., 2017).

Ao final das 216h, o dispositivo de 3,2g, liberou $2815,66 \pm 39,44$ mg de P4 no meio álcool e $2066 \pm 25,61$ no Dodecil Sulfato de Sódio.

No gráfico abaixo (2), é ilustrada a quantidade de progesterona acumulada nos dois meios de dissolução, em função de tempo, citada na Tabela 1.

Gráfico 2 – Comportamento da progesterona liberada e acumulada *in vitro* (em mg) em dois meios de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%), em função de tempo (0,33h à 216h)



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Legenda: laranja (tracejado) representa o meio de dissolução SDS-0,5% e verde o meio ÁLCOOL-60%.

A porcentagem acumulada de P4 liberada do silicone (de um total de 3,2g) em função de tempo (0,33h até 216h), segundo os meios de dissolução, é apresentada na tabela 5. Foi possível observar a interação meio x tempo ($p < 0,0001$), além dos efeitos isolados de meio ($p < 0,0001$) e tempo ($p < 0,0001$). Nota-se que a interação só foi significativa devido ao fato de os dados não diferirem estatisticamente no tempo 0,33h.

Tabela 5 - Média \pm erro padrão da média da porcentagem de progesterona acumulada *in vitro*, em cada intervalo e acumulada em dois meios de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%), ao longo dos tempos (0,33h à 216h)

TEMPO	ÁLC-60%	SDS-0,5%	MÉDIA
0,33h	1,06 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,64 \pm 0,19 ^N
2h	9,38 \pm 0,15 ^a	3,75 \pm 0,14 ^b	6,57 \pm 1,26 ^M
4h	13,83 \pm 0,05 ^a	5,76 \pm 0,31 ^b	9,8 \pm 1,81 ^L
8h	20,17 \pm 0,2 ^a	8,79 \pm 0,19 ^b	14,48 \pm 2,55 ^K
12h	24,25 \pm 0,62 ^a	11,01 \pm 0,37 ^b	17,63 \pm 2,98 ^J
24h	35,7 \pm 0,6 ^a	16,98 \pm 0,11 ^b	26,34 \pm 4,19 ^I
48h	49,5 \pm 0,67 ^a	26,22 \pm 0,16 ^b	37,86 \pm 5,21 ^H
72h	59,92 \pm 0,88 ^a	32,85 \pm 0,26 ^b	46,39 \pm 6,07 ^G
96h	68,9 \pm 1,05 ^a	39,36 \pm 0,34 ^b	54,13 \pm 6,62 ^F
120h	76,13 \pm 1,05 ^a	44,96 \pm 0,5 ^b	60,55 \pm 6,99 ^E
144h	81,04 \pm 1,06 ^a	50,61 \pm 0,63 ^b	65,82 \pm 6,83 ^D
168h	83,91 \pm 1,15 ^a	55,54 \pm 0,73 ^b	69,73 \pm 6,37 ^C
192h	86,03 \pm 1,17 ^a	60,15 \pm 0,83 ^b	73,09 \pm 5,82 ^B
216h	87,88 \pm 1,19 ^a	64,56 \pm 0,79 ^b	76,22 \pm 5,25 ^A
MÉDIA	201,12 \pm 19,11 ^a	147,57 \pm 11,14 ^b	

Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

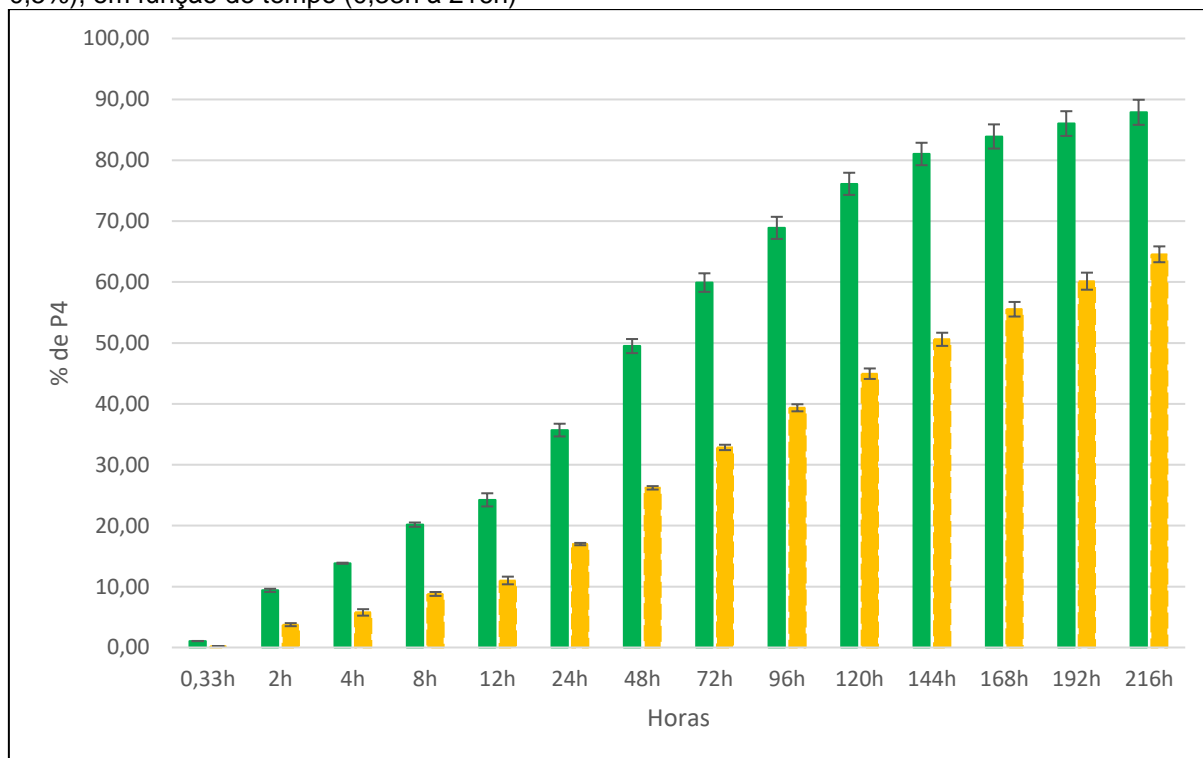
^{a,b} letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na linha pelo teste de médias de Tukey-Kramer ($p < 0,05$). A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na coluna pelo teste de médias de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Na tabela acima, observa-se que em apenas 2 horas a solução alcóolica foi capaz de extrair quase 10% da progesterona total impregnada no silicone, enquanto no SDS essa porcentagem foi alcançada próximo de 10 horas de imersão. Após quatro dias (96h), 39,36 \pm 0,34% da P4 foi liberada do silicone pelo meio SDS e 68,9,13 \pm 1,05% pelo Álcool 60%, valor próximo ao 69,9% quantificado de um DIV contendo 10% de P4, utilizando-se o mesmo meio de dissolução. No último dia de

análise (216h), liberaram-se, no meio SDS, $64,56 \pm 0,79\%$ de P4, e no meio álcool 60%, $87,88 \pm 1,19\%$, corroborando com 89,1% de P4 liberado no último dia de teste (96h) de um DIB® (PIMENTEL et al., 2017).

No gráfico 3, observa-se a porcentagem de progesterona acumulada segundo o meio de dissolução em função de tempo.

Gráfico 3 – Porcentagem de progesterona acumulada segundo meio de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%), em função de tempo (0,33h à 216h)



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Legenda: laranja (tracejado) representa o meio de dissolução SDS-0,5% e verde o meio ÁLCOOL-60%.

A quantidade de progesterona liberada, em cada intervalo avaliado do estudo *in vitro*, apresentou efeito de interação de meio x tempo ($p < 0,0001$). Os efeitos de meio ($p < 0,0001$) e tempo ($p < 0,0001$) também foram significativos, tanto para os resultados absolutos quanto os relativos (Tabela 6), apresentando-se maior no meio alcóolico nos dez primeiros períodos avaliados (até 120h), e no SDS nos seguintes.

Tabela 6 - Média \pm erro padrão da média da quantidade de progesterona liberada *in vitro* (em mg e em porcentagem), em cada intervalo de tempo, em dois meios de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%), em função de tempo (0,33h à 216h)

TEMPO	ÁLC-60%	%	SDS-0,5%	%
0 - 0,33h	33,93 \pm 0,38 ^a	1,06 \pm 0,01 ^a	6,64 \pm 0,32 ^b	0,21 \pm 0,01 ^b
0,33h - 2h	266,77 \pm 4,92 ^a	8,32 \pm 0,14 ^a	113,43 \pm 4,27 ^b	3,54 \pm 0,14 ^b
2h - 4h	142,62 \pm 3,41 ^a	4,45 \pm 0,11 ^a	64,27 \pm 8,69 ^b	2,01 \pm 0,28 ^b
4h - 8h	202,97 \pm 6,5 ^a	6,33 \pm 0,19 ^a	97,02 \pm 4,03 ^b	3,03 \pm 0,12 ^b
8h - 12h	130,41 \pm 26,27	4,07 \pm 0,83	70,83 \pm 5,75	2,21 \pm 0,18
12h - 24h	367,31 \pm 39,58 ^a	11,46 \pm 1,21 ^a	191,22 \pm 10,17 ^b	5,98 \pm 0,31 ^b
0 - 24h	1143,99 \pm 21,61 ^a	35,7 \pm 0,6 ^a	543,4 \pm 3,11 ^b	16,98 \pm 0,11 ^b
24h - 48h	441,96 \pm 4,2 ^a	13,79 \pm 0,11 ^a	295,54 \pm 4,8 ^b	9,24 \pm 0,15 ^b
48h - 72h	333,99 \pm 11,49 ^a	10,42 \pm 0,35 ^a	212,37 \pm 3,96 ^b	6,64 \pm 0,13 ^b
72h - 96h	287,78 \pm 6 ^a	8,98 \pm 0,18 ^a	208,25 \pm 3,09 ^b	6,51 \pm 0,1 ^b
96h - 120h	231,69 \pm 4,79 ^a	7,23 \pm 0,16 ^a	179,1 \pm 5,11 ^b	5,6 \pm 0,17 ^b
120h - 144h	157,02 \pm 12,45	4,9 \pm 0,4	180,71 \pm 10,06	5,64 \pm 0,31
144h - 168h	92,05 \pm 6,78 ^b	2,87 \pm 0,21 ^b	157,97 \pm 3,36 ^a	4,94 \pm 0,11 ^a
168h - 192h	67,89 \pm 2,2 ^b	2,12 \pm 0,07 ^b	147,42 \pm 3,68 ^a	4,61 \pm 0,11 ^a
192h - 216h	59,29 \pm 1,41 ^b	1,85 \pm 0,05 ^b	141,25 \pm 5,22 ^a	4,42 \pm 0,16 ^a

Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

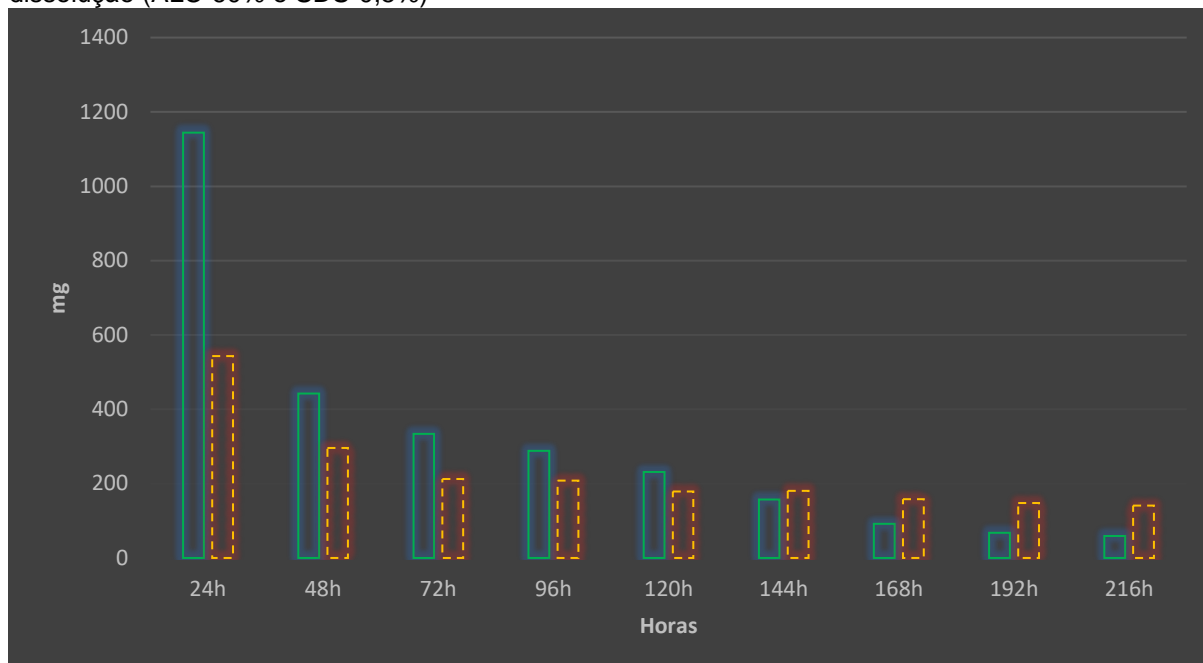
^{a,b} letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística na linha pelo teste de médias de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Na tabela acima (6), constata-se que houve maior liberação de P4, independente do meio, nas primeiras 24 horas de teste, na qual foi 1143,99 \pm 21,61 mg (35,7%) no ÁLC-60% e 543,4 \pm 3,11 mg (16,98%) no meio surfactante.

Até o intervalo de tempo entre 96 – 120h a porcentagem de P4 liberada no meio alcóolico sempre foi maior, a partir de então, o cenário se inverteu, ou seja, a porcentagem do esteroide encontrada no surfactante se tornou maior e manteve-se diariamente liberando entre 4 e 5% de P4 até o último intervalo de tempo (192h - 216h), provavelmente pelo fato de 76,13% da P4 do implante já ter sido extraída no meio alcóolico nesse período (96 - 120h) (Tabela 5).

A liberação da progesterona (em mg) a cada 24h, nos meios ÁLC-60% e SDS-0,5%, respectivamente, em função de tempo (24h à 216h), é ilustrada no gráfico a seguir (4).

Gráfico 4 – Valores totais de progesterona liberada *in vitro* (em mg), a cada 24 horas, no meio de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%)



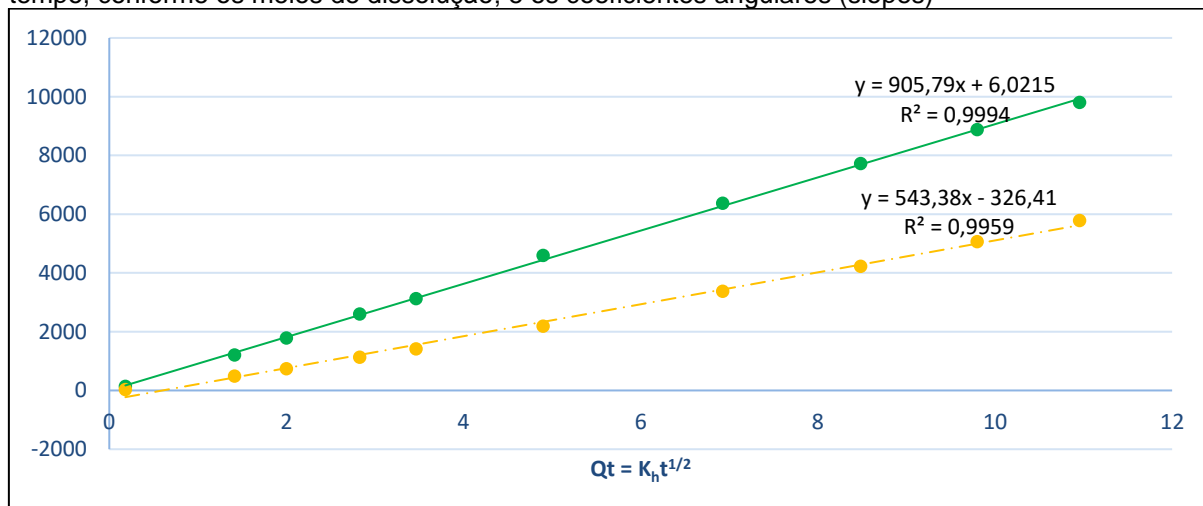
Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Legenda: laranja (tracejado) representa o meio de dissolução SDS-0,5% e verde o meio ÁLCOOL-60%.

O perfil de liberação *in vitro* ilustrado no gráfico acima, é típico de sistema de distribuição do tipo matriz, com uma liberação relativamente maior no início do teste, seguida por um período de lentidão, principalmente no meio surfactante (WEISS et al., 2019).

No gráfico 5, apresenta-se a quantidade de P4 liberada por cm^2 de área, em função da raiz quadrada do tempo, do dispositivo, nos diferentes meios de dissolução.

Gráfico 5 – Quantidade acumulada de progesterona liberada por cm^2 em função da raiz quadrada do tempo, conforme os meios de dissolução; e os coeficientes angulares (slopes)



Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

Legenda: laranja (tracejado) representa o meio de dissolução SDS-0,5% e verde o meio ÁLCOOL-60%.

No presente estudo, os novos dispositivos de 3,2 g e de área superficial de 248,8cm² (valores corrigidos considerando-se as duas unidades de silicone com P4), utilizados nos testes de dissolução *in vitro* nos meios ÁLC e SDS, seguiram o modelo matemático de Higuchi ($Q_t = K_h t^{1/2}$), ou seja, a quantidade de P4 liberada por cm² ocorreu em função da raiz quadrada do tempo (HIGUCHI, 1961; BUNT et al., 1997), fornecendo assim, uma reta com seus coeficientes angulares (slopes) correspondentes à sua liberação (RATHBONE et al., 2002a).

O coeficiente angular no meio alcoólico foi de 905,79, enquanto no surfactante foi de 543,38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$. Esse slope obtido do ÁLC-60% encontra-se mais próximo do 1.228 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ encontrado pela equipe de Bunt (1997) e do 1.300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{t}^{1/2}$ obtidos de um dispositivo de PCL com 10% de P4 (RATHBONE et al., 2002a), no qual utilizaram o mesmo meio de dissolução.

Apesar de constatar-se no gráfico 5 que as retas possuem padrão semelhante, o slope é bem menor no meio SDS. Partindo-se do princípio que os DIV possuem a mesma superfície de contato e concentração de P4, o meio é o responsável por esse coeficiente angular ser diferente. Isto se deve principalmente à diferença de solubilidade da P4 em cada um destes meios de dissolução. Segundo Bunt et al., 1997, a solubilidade da P4 em álcool:água (60:40) é de 25 mg/mL, enquanto em meio SDS 0,5% é de 0,872 mg/mL (DAVID FRIEND, informação pessoal).

6.3 CORRELAÇÃO “*IN VITRO-IN VIVO*”

Na Tabela (7), estão apresentadas as correlações entre os testes *in vitro* nos dois diferentes meios de dissolução (ÁLC-60% e SDS-0,5%), e também as correlações *in vitro* x *in vivo*, considerando-se os dois meios de dissolução.

Tabela 7 – Correlações entre os testes de dissolução *in vitro* nos dois diferentes meios, entre o teste *in vitro* (ÁLC-60%) e o experimento *in vivo* e, entre o teste *in vitro* (SDS-0,5%) e o experimento *in vivo*

VARIÁVEIS	r	P
Teste <i>In vitro</i> ÁLC-60% x Teste <i>In vitro</i> SDS-0,5%	0,99281	<0,0001
Teste <i>In vitro</i> ÁLC-60% x Experimento <i>In vivo</i>	0,78895	0,0115
Teste <i>In vitro</i> SDS-0,5% x Experimento <i>In vivo</i>	0,8158	0,0073

Fonte: Guilger-Gonzaga (2023).

A correlação entre os dois testes *in vitro*, independentemente de tempo, é positiva, muito forte ($r = 0,99281$) e pode ser respondida pela Equação de Higuchi, ilustrada no gráfico 5, na qual observamos retas similares, mas com os coeficientes angulares diferentes, ou seja, os meios, durante a realização do teste de dissolução, se comportam de forma semelhante.

A segunda e terceira correlações entre o teste *in vitro*, realizado com meio alcoólico e o experimento *in vivo*; e teste *in vitro* realizado com meio surfactante e o teste *in vivo*, também são positivas ($r = 0,78895$ / $r = 0,8158$, respectivamente). Entretanto, o teste realizado com SDS-0,5% apresentou correlação mais forte com os resultados *in vivo* ($r = 0,8158$) do que a obtida com o meio alcoólico.

Entre o quarto e nono dia de análise *in vitro*, a liberação da P4 no meio alcoólico variou entre $7,23 \pm 0,16\%$ e $1,85 \pm 0,05\%$ em cada intervalo de tempo, enquanto no meio SDS essa variação ficou entre $5,64 \pm 0,31\%$ e $4,42 \pm 0,16\%$ (tabela 3), ou seja, menores. Essa liberação mais uniforme pode ser associada com os valores encontrados no experimento *in vivo*, o qual também apresentou aumento das concentrações plasmáticas de P4 nas primeiras 48h, e após o terceiro dia (72h) apresentou platô nas concentrações de P4 até o momento que antecede a retirada do DIV (216h) dos animais implantados. Observou-se assim, melhor correlação entre o teste *in vitro* com SDS e o experimento *in vivo*.

Esse agente solubilizante de valor acessível, muito utilizado na área laboratorial da biologia molecular como desnaturante em géis de eletroforese, e que auxilia na quebra das estruturas secundárias e terciárias das proteínas e na sua separação (ZHANG et al., 2005; DOSUNMU et al., 2020), também é solúvel em água (HEJAZI; ERFAN; MORTAZAVI, 2013), e sua estrutura assemelha-se às moléculas de fosfolípidios de membrana, com porção hidrofílica e outra hidrofóbica, o que lhe confere diminuir a tensão superficial de soluções aquosas, além de permitir a interação com moléculas de água e de outras substâncias, (SINGER; TJEERDEMA, 1993; JAFARI et al., 2018), o que parece ser uma vantagem para utilizá-lo em testes de dissolução.

7 CONCLUSÕES

O novo implante intravaginal (SM-3,2) proporciona, *in vivo*, teores plasmáticos de progesterona superiores à 1 ng/mL, nas 48h iniciais, mas, não é capaz de mantê-los por nove dias (período de uso). Mesmo assim, foi eficaz em inibir a ovulação dos folículos dominantes e sincronizar a onda folicular dos animais tratados com o DIV;

Esse novo implante intravaginal de P4 (SM-3,2) libera de forma homogênea e sustentada o hormônio, obedecendo a equação de Higuchi, tanto pela técnica padrão de análise por dissolução, em solução etanol-água desionizada (ALC-60%), quanto pela técnica utilizando-se Dodecil Sulfato de Sódio 0,5% (SDS-0,5%) como meio de dissolução *in vitro*.

O coeficiente angular (slope) do SDS, indicativo da velocidade de liberação da progesterona contida no DIV, é menor do que o slope encontrado no meio ÁLC e parece mimetizar melhor o ambiente fisiológico das vacas, tornando-o boa opção como meio de dissolução para o teste *in vitro*.

Há correlações *in vitro-in vivo*, tanto para o teste de dissolução em álcool:água (60:40), quanto para a solução aquosa 0,5% de SDS. No entanto, o teste realizado com SDS-0,5% apresentou correlação mais forte com os resultados *in vivo* ($r = 0,8158$) do que a obtida com o meio alcoólico (0,78895).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. 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.
- ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in Bos Taurus and Bos indicus heifers. **Theriogenology**, v. 14, n. 6, p. 411 - 420, 1980.
- ALLENDORF, J. J.; WETTEMANN, P. J. C. Does animal welfare influence dairy farm efficiency? A two-stage approach. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7730-7740, 2015.
- ALLRICH, R. D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2738-2744, 1994.
- ALVES, E. R. A.; LÍCIO, A. M. A.; CONTINI, E. Perspectivas do Brasil no comércio internacional de lácteos. In: VILELA, D.; FERREIRA, R. P.; FERNANDES, E. N.; JUNTOLLI, F. V. **Pecuária de leite no Brasil – cenários e avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa, 2016, p. 18.
- ALVES, N. G.; ÁVILA PIRES, M. F.; SILVA FILHO, J. M.; VIANA, J. H. M.; VERNEQUE, R. S. Intervalos do início e do final do estro à ovulação em vacas das raças Gir e Guzerá após luteólise natural ou induzida por prostaglandina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, 2003.
- ANDERSEN, J. M.; DIETSCHY, J. M. Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary and testis in the rat. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 24, p. 9024-9032, 1978.
- ANDERSON, D. J.; DAY, M. J.; RUSSEL, N. J.; WHITE, G. F. Die-away kinetic analysis of the capacity of epilithic and planktonic bacteria from clean and polluted river water to biodegrade sodium dodecyl sulfate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 758-763, 1990.
- ARAYA-SIBAJA, A. M.; PAULINO, A. S.; RAUBER, G. S.; CAMPOS, C. E. M.; CARDOSO, S. G.; MONTI, G. A.; HEREDIA, V.; BIANCO, I.; BELTRANO, D.; CUFFINI, S. L. Dissolution properties, solid-state transformation and polymorphic crystallization: progesterone case study. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 19, n. 7, p. 779-788, 2014.
- ARENZON, A.; PINTO, R. F.; COLOMBO, P.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; Assessment of the freshwater annual fish *Cynopocilus melanotaenia* as a toxicity

test organism using three reference substances. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 2188-2190, 2003.

AYAD, A.; SOUSA, N. M.; SULON, J.; HORNICK, J. L.; WATTS, J.; LOPES-GATIUS, F.; IGUER-OUADA, M.; BECKERS, J. F. Influence of progesterone concentrations on secretory functions of trophoblast and pituitary during the first trimester of pregnancy in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 67, n. 9, p. 1503-1511, 2007.

BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J.; MORRIS, G.; ENTWISTLE, K.; WOLFENSON, D. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17-beta, progesterone and luteinizing hormone in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 42, n. 8, p. 1263-1274, 1994.

BALZAN, C.; ZIECH, R. E.; GRESSLER, L. T.; VARGAS, A. P. C. Campilobacteriose genital bovina: principais características e perspectivas para o diagnóstico e controle. **Ciência Rural**, v. 50, n. 3, p. 1-14, 2020.

BANKS, W. A. Brain meets body: the blood-brain barrier as an endocrine interface. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4111-4119, 2012.

BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 139-152, 2012.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; SÁ FILHO, M. F.; VIEIRA, L.; FREITAS, B. G. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 558-571, 2017.

BARUSELLI, P. S. IATF gera ganhos que superam 3,0 bilhões nas cadeias de carne e de leite. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal**, São Paulo, 2. ed, mar. 2019. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 06 abr. 2022.

BARUSELLI, P. S. Evolução da inseminação artificial em fêmeas bovinas de corte e de leite no Brasil. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal**, São Paulo, 4. ed, jul. 2020. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 04 abr. 2022.

BARUSELLI, P. S. Mercado da IATF cresce 30% em 2020 e supera 21 milhões de procedimentos. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal**, São Paulo, 5. ed, fev. 2021. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 05 abr. 2022.

BARUSELLI, P. S. IATF bate mais um recorde e supera 26 milhões de procedimentos em 2021. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal**, São Paulo, 6. ed, fev. 2022. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 05 abr. 2022.

BAULIEU, E. E.; ROBEL, P.; SCHUMACHER, M. Neurosteroids: beginning of the story. **International Review of Neurobiology**, v. 46, p. 1-32, 2001.

BISINOTTO, R. S.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3578-3587, 2010.

BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; LIMA, F. S.; MARTINEZ, N.; GRECO, L. F.; BARBOSA, L. F. S. P.; BUENO, P. P.; SCAGION, L. F. S.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Targeted progesterone supplementation improves fertility in lactating dairy cows without a corpus luteum at the initiation of the timed artificial insemination protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2214-2225, 2013.

BISINOTTO, R. S.; LEAN, I. J.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Meta-analysis of progesterone supplementation during timed artificial insemination programs in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 4, p. 2472-2487, 2015.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n.1, p. 53-72, 2002.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003.

BOYD, P.; VARIANO, B.; SPENCE, P.; MCCOY, C. F.; MURPHY, D. J.; BASHI, Y. H. D.; MALCOLM, R. K. In vitro release testing methods for drug-releasing vaginal rings. **Journal of Controlled Release**, v. 313, p. 54-69, 2019.

BRIDGES, P. J.; LEWIS, P. E.; WAGNER, W. R.; INSKEEP, E. K. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 573-583, 1999.

BRODY, G. S. Silicone technology for the plastic surgeon. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 15, n. 4, p. 517-520, 1988.

BUCHHOLZ, K. The biggest producers of milk in the world. **Dairy Industry**. Statista, 2019. Disponível em: <https://www.statista.com/chart/20110/biggest-producers-of-milk-in-the-world/>. Acesso em 05 abr. 2022.

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

CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO LEITE – CILEITE. **Leites em Números – Produção e Produtividade**. EMBRAPA, 2020. Disponível em: https://www.cileite.com.br/leite_numeros_producao. Acesso em: 28 abr. 2022.

CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. S.; SANTOS, J. E. P. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 1-2, p. 56-70, 2009.

CHAKRAVARTY, B. N.; SHIRAZEE, H. H.; DAM, P.; GOSWAMI, S. K.; CHATTERJEE, R.; GHOSH, S. Oral dydrogesterone versus intravaginal micronised progesterone as luteal phase support in assisted reproductive technology (ART) cycles: results of a randomised study. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 97, n. 5, p. 416-420, 2005.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. S. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4205-4219, 2006.

CHEBEL, R. C.; AL-HASSAN, M. J.; FRICKE, P. M.; SANTOS, J. E. P.; LIMA, J. R.; MARTEL, C. A.; STEVENSON, J. S.; GARCIA, R.; AX, R. L. Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 922-931, 2010.

CHRISTIAN, R. E.; CASIDA, L. E. The effect of progesterone in altering the oestrous cycle of the cow. **Journal of Animal Science**, v. 7, p. 540-550, 1948.

CICINELLI, E.; CIGNARELLI, M.; SABATELLI, S.; ROMANO, F.; SCHONAUER, L. M.; PADOVANO, R.; EINER-JENSEN, N. Plasma concentrations of progesterone are higher in the uterine artery than in the radial artery after vaginal administration of micronized progesterone in an oil-based solution to postmenopausal women. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 3, p. 471–473, 1998.

CICINELLI, E. Intravaginal oestrogen and progestin administration: advantages and disadvantages. **Best Practice and Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 22, n. 2, p. 391-405, 2008.

COLAZO, M. G.; DOUREY, A.; RAJAMAHENDRAN, R.; AMBROSE, D. J. Progesterone supplementation before timed AI increased ovulation synchrony and pregnancy per AI, and supplementation after timed AI reduced pregnancy losses in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 79, n. 15, p. 833-841, 2013.

COLAZO, M. G.; MAPLETOFT, R. J. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 55, n. 8, p. 772-780, 2014.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

- DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p.1949-1978, 2002.
- DAY, M. L.; ANDERSON, L. H. Current Concepts on the Control of Puberty in Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 3, p. 1-15, 1998.
- DAY, M. L.; NOGUEIRA, G. P. Management of age at puberty in beef heifers to optimize efficiency of beef production. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 4, p. 6-11, 2013.
- DE GRAAFF, W.; GRIMARD, B. Progesterone-releasing devices for cattle estrus induction and synchronization: device optimization to anticipate shorter treatment durations and new device developments. **Theriogenology**, v. 112, p. 34-43, 2018.
- DEMISSIE, H.; DURAISAMY, R. Effects of electrolytes on the surface and micellar characteristics of Sodium dodecyl sulphate surfactant solution. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 5, n. 6, p. 208-214, 2016.
- DENSCHLAG, D.; KECK, C. The corpus luteum. **Therapeutische Umschau. Revue therapeutique**, v. 59, n. 4, p. 159-162, 2002.
- DE ZIEGLER, D. Hormonal control of endometrial receptivity. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 4-7, 1995;
- DÍAZ, T.; MANZO, M.; TROCÓNIZ, J.; BENACCHIO, N.; VERDE, O. Plasma progesterone levels during the estrous cycle of Holstein and Brahman cows, Carora type and cross-bred heifers. **Theriogenology**, v. 26, n. 4, p. 419-432, 1986.
- DIAZ, F. J.; ANDERSON, L. E.; WU, Y. L.; RABOT, A.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and prostaglandin F₂ α production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 65-80, 2002.
- DISKIN, M. G.; AUSTIN, E. J.; ROCHE, J. F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 211-228, 2002.
- DOSUNMU, A.; UCHE, E.; OSIKOMAIYA, B.; ISMAIL, A.; AKINBAMI, A.; AKANMU, A. Red cell membrane protein abnormalities as defined by sds-page among patients with anemia in a West African region hospital practice. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 11, n. 3, p. 283-289, 2020.
- DUELLO, T. M.; NETT, T. M. Uptake, localization, and retention of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone analogs in rat gonadotrophs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 19, n. 1, p. 101-112, 1980.
- DZIUK, P. J.; COOK, B. Passage of steroids through silicone rubber. **Endocrinology**, v. 78, n. 1, p. 208-211, 1966.
- EMAMI, J. In vitro—in vivo correlation: From theory to applications. **Journal of Pharmacy & pharmaceutical sciences**, v. 9, n. 2, p. 169-189, 2006.

- FOOTE, R. H. Estrus detection and estrus detection aid. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 2, p. 248-256, 1975.
- FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 163-169, 2011.
- FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.
- FREEMAN, M. I.; LEVINE, S. M. Facts about glasses. In: STEIN, H. A.; STEIN, R. M.; FREEMAN, M. I. *The ophthalmic assistant*. 3.ed. Elsevier, p. 207-235, 2017.
- FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 313-332, 2005.
- GALVÃO, K. N.; SANTOS, J. E. P.; JUCHEM, S. O.; CERRI, R. L. A.; COSCIONI, A. C.; VILLASEÑOR, M. Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 12, p. 3508-3517, 2004.
- GANESH, A.; CHAKRAVORTY, N.; MUKHERJEE, R.; GOSWAMI, S.; CHAUDHURY, K.; CHAKRAVARTY, B. Comparison of oral dydrogesterone with progesterone gel and micronized progesterone for luteal support in 1,373 women undergoing in vitro fertilization: a randomized clinical study. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 6, p. 1961-1965, 2011.
- GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223-230, 1989.
- GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 2, p. 383-389, 2000.
- GOLETIANI, N. V.; KEITH, D. R.; GORSKY, S. J. Progesterone: review of safety for clinical studies. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 15, n. 5, p. 427-444, 2007.
- GUENNOUN, R.; LABOMBARDA, F.; GONZALEZ DENISELLE, M. C.; LIERE, P.; DE NICOLA, A. F.; SCHUMACHER, M. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, p. 48-61, 2015.
- GUENNOUN, R. Progesterone in the Brain: Hormone, Neurosteroid and Neuroprotectant. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, doi: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5271#>, 2020.

HACKER, M. C.; MIKOS, A. G. Synthetic Polymers. In: ATALA, A.; LANZA, R.; THOMSON, J. A.; NEREM, R. Principles of Regenerative Medicine. 2.ed. Elsevier, p. 587-622, 2011.

HACKER, M. C.; KRIEGHOFF, J.; MIKOS, A. G. Synthetic Polymers. In: ATALA, A.; LANZA, R.; THOMSON, J. A.; NEREM, R. Principles of Regenerative Medicine. 3.ed. Elsevier, p. 559-590, 2019.

HALL, J. F. History and Bibliography of Polymeric Insulators for Outdoor Applications. **IEEE Transactions on Power Delivery**, v. 8, n. 1, p. 376-385, 1993.

HAMUDIKUWANDA, H.; GALLO, G.; BLOCK, E.; DOWNEY, B. R. Adipose tissue progesterone concentrations in dairy cows during late pregnancy and early lactation. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 1, p. 15-23, 1996.

HARRISON, R. O.; FORD, S. P.; YOUNG, J. M.; CONLEY, A. J.; FREEMAN, A. E. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 10, p. 2749-2758, 1990.

HARWOOD, B.; MISHALL JR, D. R. Contraceptive Vaginal Rings. **Seminars in reproductive medicine**, v. 19, n. 4, p. 381-390, 2001.

HATLER, T. B.; HAYES, S. H.; RAY, D. L.; REAMES, P. S.; SILVIA, W. J. Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 3, p. 360-368, 2008.

HE, W.; LI, X.; ADEKUNBI, D.; LIU, Y.; LONG, H.; WANG, L.; LYU, Q.; KUANG, Y.; O'BYRNE, K. T. Hypothalamic effects of progesterone on regulation of the pulsatile and surge release of luteinising hormone in female rats. **Scientific Reports**, v. 7, 8096, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08805-1>, 2017.

HEJAZI, S. M.; ERFAN, M.; MORTAZAVI, S. A. Precipitation Reaction of SDS and Potassium Salts in Flocculation of a Micronized Megestrol Acetate Suspension. **Iran Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 239-246, 2013.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 10, p. 874-875, 1961.

HOLLENSTEIN, K.; JANETT, F.; BLEUL, U.; HÄSSIG, M.; KÄHN, W.; THUN, R. Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress. **Animal Reproduction Science**, v. 93, n. 3-4, p. 292-302, 2006.

IBRAHEM, M. A. Oral dydrogesterone versus vaginal micronized progesterone in luteal phase support after controlled ovarian stimulation using long gonadotropin-releasing hormone agonist in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. **Open Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 9, n. 12, p. 1558-1568, 2019.

IMWALLE, D. B.; FERNANDEZ, D. L.; SCHILLO, K. K. Melengestrol acetate blocks the preovulatory surge of luteinizing hormone, the expression of behavioral estrus,

and ovulation in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 5, p. 1280-1284, 2002.

INSKEEP, E. K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13, p. e24-e39, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Efetivos do rebanho, por tipo de rebanho**. IBGE, 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#notas-tabela>. Acesso em: 28 jul. 2023.

JAFARI, M.; MEHRNEJAD, F.; RAHIMI, F.; ASGHARI, S. M. The Molecular Basis of the Sodium Dodecyl Sulfate Effect on Human Ubiquitin Structure: A Molecular Dynamics Simulation Study. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20669-7>, 2018

JUG, M.; HAFNER, A.; LOVRIĆ, J.; KREGAR, M. L.; PEPIĆ, I.; VANIĆ, Ž.; CETINA-ČIŽMEK, B.; FILIPOVIĆ-GRČIĆ, J. An overview of *in vitro* dissolution/release methods for novel mucosal drug delivery systems, **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 350–366, 2018.

JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, p. 289-298, 2006.

KAY, K.; SHAH, D. K.; ROHAN, L.; BIES, R. Physiologically-based pharmacokinetic model of vaginally administered dapivirine ring and film formulations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 9, p. 1950-1969, 2018.

KESNER, J. S.; PADMANABHAN, V.; CONVEY, E. M. Estradiol induces and progesterone inhibits the preovulatory surges of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 26, n. 4, p. 571–578, 1982.

KIM, S.; TANAKA, T.; KAMOMAE, H. Different effects of subnormal levels of progesterone on the pulsatile and surge mode secretion of luteinizing hormone in ovariectomized goats. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 1, p. 141-145, 2003.

KINDER, J. E.; DAY, M. L.; KITTOK, R. J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 34, p. 167-186, 1987.

KINDER, J. E.; BERGFELD, E. G.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; KOJIMA, F. N. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 49, p. 393-407, 1995.

KOLATOROVA, L.; VITKU, J.; SUCHOPAR, J.; HILL, M.; PARIZEK, A. Progesterone: A Steroid with Wide Range of Effects in Physiology as Well as Human Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, doi: [10.3390/ijms23147989](https://doi.org/10.3390/ijms23147989), 2022.

KSIAA, M.; FARHAT, N.; RABHI, M.; ELKHOUNI, A.; SMAOUNI, A.; DEBEZ, A.; CABASSA-HOURTON, C.; SAVOURÉ, A.; ABDELLY, C.; ZORRIG, W. Silicon (Si) alleviates iron deficiency effects in sea barley (*Hordeum marinum*) by enhancing iron accumulation and photosystem activities. **Silicon**, <https://doi.org/10.1007/s12633-021-01376-x>, 2021.

LANA, M. S.; MARTINS, P. C.; CARNEIRO, A. V. Sul torna-se referência para o leite brasileiro. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Anuário Leite - Sua excelência, o consumidor**. São Paulo: Embrapa, 2019. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109959>>. Acesso em: 12 mar. 2022.

LARSON, J. E.; LAMB, G. C.; STEVENSON, J. S.; JOHNSON, S. K.; DAY, M. L.; GEARY, T. W.; KESLER, D. J.; DEJARNETTE, J. M.; SCHRICK, F. N.; DICOSTANZO, A.; ARSENEAU, J. D. Synchronization of estrus in suckled beef cows for detected estrus and artificial insemination and timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F_{2α}, and progesterone. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 2, p. 332-342, 2006.

LEBLANC S. The OvSynch breeding program for dairy cows – A review and economic perspective. **Bovine Practitioner**, v. 35, n. 1, p. 13-22, 2001.

LEITE, J. L. B.; STOCK, L. A.; RESENDE, J. C. Leite no mundo: produção deve crescer. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Anuário Leite – Saúde única e total**. São Paulo: Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1132875>. Acesso em: 04 abr. 2022.

LIMA, J. R.; RIVERA, F. A.; NARCISO, C. D.; OLIVEIRA, R.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P. Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5436-5446, 2009.

LIU, W.; GUO, X.; GUO, R. The interaction between hemoglobin and two surfactants with different charges. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 5, p. 548–557, 2007.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3-4, p. 209-223, 2004.

LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D. Z.; SATTER, L. D.; FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8, p. 2783-2793, 2005.

MACEDO, L. C. G. M.; CAVAGNA NETO, M.; DZIK, A.; ROCHA, A. R.; LIMA, S. M. R. R. Oral dydrogesterone in frozen-thawed embryo transfer cycles. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 68, n. 1, p. 100-105, 2022.

MACMILLAN, K. L.; TAUFA, V. K.; BARNES, D. R.; DAY, A. M. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v. 26, n. 1-2, p. 25-40, 1991.

MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1-4, p. 1-25, 1993.

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

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MARIANO, R. N.; TURINO, L. N.; CABRERA, M. I.; SCÁNDOLO, D. E.; MACIEL, M. G.; GRAU, R. J. A. A simple pharmacokinetic model linking plasma progesterone concentrations with the hormone released from bovine intravaginal inserts. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 250-256, 2010.

MARTINS, C. F.; SIQUEIRA, L. G. B.; OLIVEIRA, C. T. S. A. M.; SCHWARZ, D. G. G.; OLIVEIRA, F. A. S. A. M. Inseminação Artificial: uma tecnologia para o grande e o pequeno produtor. Documentos 261. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Cerrados. Planaltina. 2009.

MAYO, L. M.; SILVIA, W. J.; RAY, D. L.; JONES, B. W.; STONES, A. E.; TSAI, I. C.; CLARCK, J. D.; BEWLEY, J. M.; HEERSCHER JR, G. Automated estrous detection using multiple commercial precision dairy monitoring technologies in synchronized dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 2645-2656, 2019.

MELO, L. F.; MONTEIRO JR, P. L. J.; NASCIMENTO, A. B.; DRUM, J. N.; SPIES, C.; PRATA, A. B.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Follicular dynamics, circulating progesterone, and fertility in Holstein cows synchronized with reused intravaginal progesterone implants that were sanitized by autoclave or chemical disinfection. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3554-3567, 2018.

MENSAH-NYAGAN, A. G.; DO-REGO, J. L.; BEAUJEAN, D.; LUU-THE, V.; PELLETIER, G.; VAUDRY, H. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 63-81, 1999.

MIALOT, J. P.; LAUMONNIER, G.; PONSART, C.; FAUXPOINT, H.; BARASSIN, E.; PONTER, A. A.; DELETANG, F. Postpartum subestrus in dairy cows: comparison of treatment with prostaglandin F2 alpha or GnRH + prostaglandin F2 alpha + GnRH. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 901-911, 1999.

MIBM, M. Delayed Resumption of Cyclicity in Postpartum Dairy and Beef Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 3-4, p. 277-284, 1999.

MILLER, W. R.; WILLIAMS, R.; PIPES, G. W.; TURNER, C. W. Conjugation, distribution, and biological half-life ($t_{1/2}$) of radioactive progesterone in plasma and red cells of bovine blood. **Journal of Dairy Science**, v. 46, n. 12, p. 1402-1404, 1963.

MILLER, W. L. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 198, n. 1-2, p. 7-14, 2002.

MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T.; CARLSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v. 45, n. 7, p. 1327-1349, 1996.

MIRBAHOUSH, S. M.; CHAIBAKHSH, N.; MORADI-SHOEILI, Z. Highly efficient removal of surfactant from industrial effluents using flaxseed mucilage in coagulation/photo-Fenton oxidation process. **Chemosphere**, v. 231, p. 51–59, 2019.

MISHELL JR, D. R.; LUMKIN, M. E. Contraceptive effect of new varying dosages of progesterone in silastic vaginal rings. **Fertility and Sterility**, v. 21, n. 2, p. 99-103, 1970.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, n. 3, p. 159-169, 2009.

MONDAL, B.; ADAK, A.; DATTA, P. Degradation of anionic surfactant in municipal wastewater by UV-H₂O₂: Process optimization using response surface methodology. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 375, p. 237–243, 2019.

MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Thermodynamics of protein denaturation by sodium dodecyl sulfate. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 2, n. 3, p. 189-196, 2005.

NETT, T. M.; TURZILLO, A. M.; BARATTA, M.; RISPOLI, L. A. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 33-42, 2002.

NGUYEN, H. M.; PHAN, C. M.; SEN, T. Degradation of sodium dodecyl sulfate by photoelectrochemical and electrochemical processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 633–639, 2016.

O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHIO, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, n. 2, p. 483-487, 1989.

PARDRIDGE, W. M.; MIETUS, L. J. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 64, n. 1, p. 145-154, 1979.

PATEL, B. C.; WONG, C. S.; WRIGHT, T.; SCHAFFNER, A. D. Breast Implants. 2022 Aug 1. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 28723027. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441998/>. Acesso em: 01 mar 2023.

PEIXOTO, E. M. A. Silício. **Química Nova na Escola (QNEsc)**, nº 14, 2001.

PEREIRA, M. H. C.; SANCHEZ JR, C. P.; GUIDA, T. G.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Comparison of fertility following use of one versus two intravaginal progesterone inserts in dairy cows without a CL during a synchronization protocol before timed AI or timed embryo transfer. **Theriogenology**, v. 89, p. 72-78, 2017.

PETER, A. T.; VOS, P. L. A. M.; AMBROSE, D. J. Postpartum anestrus in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1333-1342, 2009.

PIMENTEL, J. R. V.; MATURANA FILHO, M.; CARDOZO-FILHO, L.; AGNELLI, J. A. M.; NASCIMENTO, J.; MADUREIRA, E. H. Assessment of the usage of biodegradable polymeric matrix in vaginal devices to sustain progesterone release in cows. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 10, p. 1658-1669, 2017.

PRATT, D.; TOLLAFIED, R. An introduction to mechanical therapeutics. In: TURNER, W. A.; MERRIMAN, L. M. *Clinical Skills in Treating the Foot*. 2. ed. Elsevier, p. 211-229, 2005.

PUGLIESI, G.; BISINOTTO, D. Z.; MELLO, B. P.; LAHR, F. C.; FERREIRA, C. A.; MELO, G. D.; BASTOS, M. R.; MADUREIRA, E. H. A novel strategy for resynchronization of ovulation in nelore cows using injectable progesterone (P4) and P4 releasing devices to perform two timed inseminations within 22 days. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 54, n. 8, p. 1149-1154, 2019.

PURSLEY, JR. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α e GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

RABIEE, A. R.; MACMILLAN, K. L.; SCHWARZENBERGER, F. Progesterone metabolism in ovariectomised non-lactating Holstein-Friesian cows treated with progesterone with two levels of feed intake. **Animal Reproduction Science**, v. 66, n. 1-2, p. 35-46, 2001.

RATHBONE, M. J.; MACMILLAN, K. L.; BUNT, C. R.; BURGGRAAF, S. Conceptual and commercially available intravaginal drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 3, p. 363-392, 1997.

RATHBONE, W. J.; MACMILLAN, K. L.; INSKEEP, K.; BURGGRAAF, S.; BUNT, C. R. Fertility regulation in cattle. **Journal of Controlled Release**, v. 54, n. 2, p. 117-148, 1998.

RATHBONE, M. J.; BURKE, C. R.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R.; BURGGRAAF, S.; MACMILLAN, K. L. Design and development of controlled release intravaginal

veterinary drug delivery systems. **Controlled Release Veterinary Drug Delivery: Biological and Pharmaceutical Considerations**, p. 173-200, 2000.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 1, p. 277–320, 2001.

RATHBONE, M. J.; BUNT, C. R.; OGLE, C. R.; BURGGRAAF, S.; MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R.; PICKERING, K. L. Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. **Journal of Controlled Release**, v. 85, n. 1-3, 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, n. 1-3, p. 61–71, 2002b.

REKAWIECKI, R.; KOWALIK, M. K.; SLONINA, D.; KOTWICA, J. Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. **Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 59, n. 9, p. 75-89, 2008.

RESENDE, J. C.; LEITE, J. L. B.; STOCK, L. A.; NARDY, V. P. D. R. Produção e produtividade de leite no mundo. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Anuário Leite - Sua excelência, o consumidor**. São Paulo: Embrapa, 2019. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109959>. Acesso em: 04 abr. 2022.

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; KILLILEA, S. D.; REDMER, D. A. Mitogenic factors of corpora lutea. **Progress in growth factor research**, v. 5, p. 159-175, 1994.

ROBINSON, T. J. Use of progestogen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep. **Nature**, v. 206, n. 4979, p. 39-41, 1965.

ROBINSON, N. A.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 202-207, 1989.

ROCHA, D. C.; BESKOW, A.; PIMENTEL, C. M. M.; MATTOS, R. C.; GREGORY, R. M. Níveis séricos de progesterona em vacas ovariectomizadas tratadas com MAD4® com diferentes concentrações e vias de administração. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 3, p. 1-6, 2011.

ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R.; Produção brasileira de leite: uma análise conjuntural. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Anuário**

Leite - Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. São Paulo: Embrapa, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro>. Acesso em: 04 abr. 2022.

ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R.; Leite inspecionado: Minas Gerais mantém liderança. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Anuário Leite 2021 – Saúde única e total.** São Paulo: Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132875/anuario-leite-2021-saude-unica-e-total#:~:text=Resumo%3A%20Nesta%20edi%C3%A7%C3%A3o%20do%20Anu%C3%A1rio,biosseguridade%20em%20fazendas%20de%20leite>. Acesso em: 29 abr. 2022.

ROCHE, J. F. Effect of short-term progesterone treatment on oestrous response and fertility in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 40, n. 2, p. 433-440, 1974.

ROCHE, J. F. Retention rate in cows and heifers of intravaginal silastic coils impregnated with progesterone. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 46, n. 1, p. 253-255, 1976.

ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 371-378, 1992.

RODI, P. M.; TRUCCO, V. M.; GENNARO, A. M. Factors determining detergent resistance of erythrocyte membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 135, n. 1-3, p. 14-18, 2008.

ROELOFS, J. B.; van EERDENBURG, F. J. C. M.; SOEDE, N. M.; KEMP, B. Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 64, n. 8, p. 1690-1703, 2005.

ROSSATO, M.; NOGARA, A.; MERICO, M.; FERLIN, A.; FORESTA, C. Identification of functional binding sites for progesterone in rat Leydig cell plasma membrane. **Steroids**, v. 64, n. 1-2, p. 168-175, 1999.

SAHA, J.; CHAKRABORTY, I.; GHANGREKAR, M. M. A novel tin-chloride-zirconium oxide-kaolin composite coated carbon felt anode for electro-oxidation of surfactant from municipal wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 6, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104489>, 2020.

SAHARKHIZ, N.; ZAMANIYAN, M.; SALEHPOUR, S.; ZADEHMODARRES, S.; HOSEINI, S.; CHERAGHI, L.; SEIF, S.; BAHEIRAEI, N. A comparative study of dydrogesterone and micronized progesterone for luteal phase support during in vitro fertilization (IVF) cycles. **Gynecological Endocrinology**, v. 32, n. 3, p. 213-217, 2016.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; SOARES, J. G.; GIROTTI, R. W.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of

circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time artificial insemination on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelores) beef cows.

Theriogenology, v. 83, n. 6, p. 1093-1100, 2015.

SÁNCHEZ, L.; MARTÍNEZ, V.; INFANTE, M. R.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. P. Hemolysis and antihemolysis induced by amino acid-based surfactants. **Toxicology Letters**, v. 169, n. 2, p. 177-184, 2007.

SANGHA, G. K.; SHARMA, R. K.; GURAYA, S. S. Biology of corpus luteum in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 53-64, 2002.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L. E.; WILTBANK, M. C. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 B in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2831-2842, 2002.

SANTANA, J. R.; WAISSE, S. Chegada e difusão da pílula anticoncepcional no Brasil, 1961-1972: qual informação foi disponibilizada às usuárias potenciais? **Revista Brasileira de História da Ciência**, v. 9, n. 3, p. 203-218, 2016.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 663-671, 1988.

SCHAMS, D. S.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 4, p. 241-251, 2004.

SEDDON, A. M.; CURNOW, P.; BOOTH, P. J. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1666, n. 1-2, p. 105-117, 2004.

SENGER, P. L. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2745-2753, 1994.

SENGER, P. L. Pathways to Pregnancy & Parturition. 3. ed. Current Conceptions Inc.: Redmond. p. 3-4, 2012.

SEVERO, N. C. História da inseminação artificial no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 17-21, 2015.

SHALEL, S.; STREICHMAN, S.; MARMUR, A. The mechanism of hemolysis by surfactants: effect of solution composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 252, n. 1, p. 66–76, 2002.

SHIRASUNA, K.; SHIMIZU, T.; HAYASHI, K-G.; NAGAI, K.; MATSUI, M.; MIYAMOTO. Positive association, in local release, of luteal oxytocin with endothelin 1 and prostaglandin F2alpha during spontaneous luteolysis in the cow: a possible intermediary role for luteolytic cascade within the corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 6, p. 965-970, 2007.

SIEPMANN, J.; LECOMTE, F.; BODMEIER, R. Diffusion-controlled drug delivery systems: calculation of the required composition to achieve desired release profiles. **Journal of Controlled Release**, v. 60, n. 2-3, p. 379-389, 1999.

SILVA, L. O.; VALENZA, A.; ALVES, R. L. O. R.; SILVAS, M. A., SILVA, T. J. B.; MOTTA, J. C. L.; DRUM, J. N.; MADUREIRA, G.; SOUZA, A. H.; SARTORI, R. Progesterone release profile and follicular development in Holstein cows receiving intravaginal progesterone devices. *Theriogenology*, v. 172, p. 207-215, 2021.

SINGER, M. M.; TJEERDEMA, R. S. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 133, n. 1, p. 95-149, 1993.

SILVEIRA, C. S.; FRAGA, M.; GIANNITTI, F.; MACÍAS-RIOSECO, M.; RIET-CORREA, F. Diagnosis of Bovine Genital Campylobacteriosis in South America. **Frontiers in Veterinary Science**, doi: [//doi.org/10.3389/fvets.2018.00321](https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00321), 2018.

STOFFEL-WAGNER, B. Neurosteroid metabolism in the human brain. **European Journal of Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 669-679, 2001.

TAKASE, M.; UKENA, K.; YAMAZAKI, T.; KOMINAMI, S.; TSUTSUI, K. Pregnenolone, pregnenolone sulfate, and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain and their seasonal changes. **Endocrinology**, v. 140, n. 4, p. 1936-1944, 1999.

TAKEUCHI, K. Polycarbonates. **Polymer Science: a comprehensive reference**, v. 5, p. 363-376, 2012.

TARABORRELLI, S. Physiology, production and action of progesterone. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 94, p. 8-16, 2015.

TENHAGEN B-A, DRILLICH M, SURHOLT R, HEUWIESER W. Comparison of Timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: reproductive and economic considerations. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 1, p. 85-94, 2004.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D. L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 1, p. 111-151, 2001.

TIETZ, K.; KLEIN, S. In vitro methods for evaluating drug release of vaginal ring formulations – a critical review. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 10, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100538>, 2019.

TOMIC, V.; TOMIC, J.; KLAIC, D. Z.; KASUM, M.; KUNA, K. Oral dydrogesterone versus vaginal progesterone gel in the luteal phase support: randomized controlled trial. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 186, p. 49-53, 2015.

TOSCA, E. M.; ROCCHETTI, M.; PÉREZ, E.; NIETO, C.; BETTICA, P.; DEL PRADO, J. M.; MAGNI, P.; DE NICOLAO, G. In Vitro–In Vivo Correlation (IVIVC) Population Modeling for the In Silico Bioequivalence of a Long-Acting Release

Formulation of Progesterone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020255>, 2021.

TRIMBERGER, G. W.; HANSEL, W. Conception rate and ovarian function following estrus control by progesterone injections in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 14, n.1, p. 224-232, 1955.

TURINO, L. N.; MARIANO, R. N.; CABRERA, M. I.; SCÁNDOLO, D. E.; MACIEL, M. G.; GRAU, R. J. A. Pharmacokinetics of progesterone in lactating dairy cows: gaining some insights into the metabolism from kinetic modeling. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 988-999, 2010.

UEHLINGER, H.; BINDER, H.; HAUSER, B.; RÜSCH, P.; ZEROBIN, K. Comparison of vaginal devices CIDR and PRID in ovariectomized cows using hormone analysis. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v. 137, n. 3, p. 81-86, 1995.

URDANETA, S.; WIGDAHL, B.; NEELY, E. B.; BERLIN JR, C. M.; SCHENGRUND, C. L.; LIN, H. M.; HOWETT, M. K. Inactivation of HIV-1 in breast milk by treatment with the alkyl sulfate microbicide sodium dodecyl sulfate (SDS). **Retrovirology**, v. 2, n. 28, doi: [10.1186/1742-4690-2-28](https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-28), 2005.

VANHOLDER, T.; LEROY, J. L. M. R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; MAES, D.; CORYN, M.; de KRUIF, A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 1-2, p. 33-44, 2005.

VAN WERVEN, T.; WALDECK, F.; SOUZA, A. H.; FLOCH, S.; ENGLEBIENNE, M. Comparison of two intravaginal progesterone releasing devices (PRID-Delta vs CIDR) in dairy cows: Blood progesterone profile and field fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3-4, p. 143-149, 2013.

VASCONCELOS, J. L.; SILCOX, R. W.; ROSA, G. J.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 1067-1078, 1999.

VASCONCELOS, J. L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307-314, 2001.

VASCONCELOS, J. L. M.; SANGSRITAVONG, S.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Acute reduction in serum progesterone concentration after feed intake in dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 795-807, 2003.

WALKER, W. L.; NEBEL, R. L.; MCGILLIARD, L. Time of Ovulation to mounting activity in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 79, p. 1555-1561, 1996.

WALSH, R. B.; LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; KELTON, D. F.; WALTON, J. S.; LESLIE, K. E. The effect of a progesterone releasing intravaginal device (PRID) on

pregnancy risk to fixed-time insemination following diagnosis of non-pregnancy in dairy cows. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 948-956, 2007.

WASHBURN, S. P.; SILVIA, W. J.; BROWN, C. H.; McDANIEL, B. T.; McALLISTER, A. J. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 244-251, 2002.

WEBB, R.; WOAD K. J.; ARMSTRONG, D. G. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 277-285, 2002

WEIS, D.; REIST, M.; BRUCKMAIER, R. M. The acyclic period postpartum in automatic and conventional milking. **Journal of veterinary medicine**, v. 51, n. 6, p. 268-272, 2004.

WEISS, H.; MARTELL, B.; CONSTANTINE, G. D.; DAVIS, S. M.; VIDAL, J. D.; MAYER, P. R.; DOORBAR, M.; FRIEND, D. R. Pharmacokinetics and tolerability of a novel progesterone intravaginal ring in sheep. **Drug delivery and translational research**, v. 9, n. 5, p. 1008-1016, 2019.

WHISNANT, C. S.; BURNS, P. J. Evaluation of steroid microspheres for control of estrus in cows and induction of puberty in heifers. **Theriogenology**, v. 58, n. 6, p. 1229-1235, 2002.

WIEBECK, H.; HARADA, J. **Plásticos de Engenharia – Tecnologia e aplicações**. 2005. 1 ed. São Paulo: Artliber Editora, 2005

WILTBANK, M. C.; BELFIORE, C. J.; NISWENDER, G. D. Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 97, n. 1-2, p. 1-7, 1993.

WILTBANK, M.C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 21-52, 2002.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17-29, 2006.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; BENDER, R. W.; NASCIMENTO, A. B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 238-243, 2011a.

WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; HERLIHY, M. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; NASCIMENTO, A. B.; SOUZA, A. H.; AYRES, H.; CUNHA, A. P.; KESKIN, A.; GUENTHER, J. N.; GUMEN, A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1568-1582, 2011b.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; CUNHA, A. P.; GIORDANO, J. O.; FRICKE, P. M.; BAEZ, G. M.; DISKIN, M. G. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. **Animal**, v. 8, n. 1, p. 70-81, 2014.

WU, W. I.; REZAI, P.; HSU, H. H.; SELVAGANAPATHY, P. R. Materials and methods for the microfabrication of microfluidic biomedical devices. *Microfluidic Devices for Biomedical Applications*. In: LI, X. J.; ZHOU, Y. 1. ed. WP Series in Biomaterials, p. 3-62, 2013.

ZALEWSKI, K.; CHYLEK, Z.; TRZCINSKI, W. A. A Review of Polysiloxanes in Terms of Their Application in Explosives. **Polymers**, v. 13, n. 7, doi: <https://doi.org/10.3390%2Fpolym13071080>, 2021.

ZHANG, L.; XIE, J.; WANG, X.; LIU, X.; TANG, X.; CAO, R.; HU, W.; NIE, S.; FAN, C.; LIANG, S. Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: Use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. **Proteomics**, v. 5, n. 17, p. 4510-4524, 2005.

ZHANG, Y.; NADEAU, M.; FAUCHER, F.; LESCELLEUR, O.; BIRON, S.; DARIS, M.; RHÉAUME, C.; LUU-THE, V.; TCHERNOF, A. Progesterone metabolism in adipose cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 298, p. 76-83, 2009.

ZHU, Y.; HAJI, K.; OTSUBO, M.; HONDA, C. Surface Degradation of Silicone Rubber Exposed to Corona Discharge. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 34, n. 4, p. 1094-1098, 2006.

ZUBELDIA-BRENNER, L.; ROSELLI, C. E.; RECABARREN, S. E.; DENISELLE, M. C. G.; LARA, H. E. Developmental and functional effects of steroid hormones on the neuroendocrine axis and spinal cord. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 7, doi: 10.1111/jne.12401, 2016.

ZWIEFEHLOFER, E. M.; MACMILLAN, K.; GOBIKRUSHANTH, M.; ADAMS, G. P.; YANG, S. X.; ANZAR, W.; ASAI-COAKWELL, M.; COLAZO, M. G. Comparison of two intravaginal progesterone-releasing devices in shortened-timed artificial insemination protocols in beef cattle. **Theriogenology**, v. 160, p. 75-82, 2021.