

SUPEROVULACIÓN DE HEMBRAS BOVINAS: ALTERNATIVAS PARA REDUCIR EL NÚMERO DE INYECCIONES DE FSH

Édgar Mauricio Mogollón-Waltero*, MV, M.Sc., Ph.D. (c)₁, Angelo Jose Burla-Dias, MV, M.Sc., Ph.D.₁

₁ Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, LRMGA, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil

Recibido: 18 de enero del 2013 Aprobado: 24 de abril del 2013

*Autor de correspondencia: Mauricio Mogollón-Waltero, Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, LRMGA, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes (RJ), Brasil, Av. Alberto Lamego 2000, 3132456701, correo electrónico: mao5_2000@yahoo.com

Cómo citar este artículo: Mogollón-Waltero EM, Burla-Dias AJ. Superovulación de hembras bovinas: alternativas para reducir el número de inyecciones de FSH. *Spei Domus*. 2013; 9(18): 37-47.

Resumen. Las mejoras en la eficiencia reproductiva y la multiplicación de genotipos más productivos están directamente ligadas a incrementos en la productividad, los cuales son factores decisivos para la sustentabilidad de la actividad pecuaria. Por esta razón, las investigaciones en este campo proponen la transferencia de embriones (TE) como una de las herramientas biotecnológicas básicas para aumentar la cantidad y la calidad de los bovinos producidos. El proceso convencional para TE en bovinos utiliza ocho aplicaciones de hormona foliculo estimulante (FSH) con intervalos de 12 horas; este procedimiento aumenta la manipulación y el estrés de los animales, lo que hace que incida negativamente en los resultados. El objetivo de esta revisión es compilar los progresos más marcados de las dos últimas décadas en las investigaciones que han centrado su interés en la reducción del número de aplicaciones de FSH, habiendo utilizado para ello estrategias que van desde la simple aplicación subcutánea de la hormona hasta su transporte y liberación controlada en dispositivos electrónicos colocados en el tracto reproductivo, pasando también por la vehiculización en sustancias poliméricas que permiten controlar la liberación hacia el torrente sanguíneo. Concluimos que indudablemente estos avances revolucionarán la industria pecuaria e influirán de manera positiva en la masificación del uso de biotecnologías embrionarias, lo cual permitirá, por obvias razones, mejoras genéticas evidentes en lapsos de tiempo más cortos dentro de los hatos bovinos.

Palabras clave: biotecnologías reproductivas, ovulación múltiple, polímeros transportadores, transferencia de embriones.

Superovulation of Bovine Females: Alternatives to Reduce the Number of FSH Injections

Abstract. Improvements in reproductive efficiency and the multiplication of more productive genotypes are directly linked to increases in productivity, which are decisive factors for livestock sustainability. Research in this field thus proposes embryo transfer (ET) as a basic biotechnological tool to increase the quantity and quality of cattle produced. The conventional process of superovulation for embryo transfer in cattle uses eight applications of follicle stimulating hormone (FSH) with 12 hour intervals. This procedure increases the handling and stress of these animals, which can adversely affect the results. The aim of this review is to compile the most marked examples of progress in research over the past two decades focused on reducing the number of FSH applications. Different strategies have been used, ranging from the simple subcutaneous hormone application to transport and controlled release through electronic devices placed in the reproductive tract, as well as vehiculization of polymeric substances to control release into the bloodstream. We conclude that these advances will certainly revolutionize the cattle industry and positively influence massive use of embryonic biotechnologies which, for obvious reasons, will facilitate genetic improvements in shorter time spans within bovine herds.

Keywords: reproductive biotechnologies, multiple ovulation, transport polymers, embryo transfers.

Superovulação de fêmeas bovinas: alternativas para reduzir o número de injeções de FSH

Resumo. As melhorias na eficiência reprodutiva e a multiplicação de genótipos mais produtivos estão diretamente ligadas a aumentos na produtividade, os quais são fatores decisivos para a sustentabilidade da atividade pecuária. Por esta razão, as pesquisas neste campo propõem a transferência de embriões (TE) como uma das ferramentas biotecnológicas básicas para aumentar a quantidade e a qualidade dos bovinos produzidos. O processo convencional de superovulação para TE em bovinos utiliza oito aplicações de hormônio foliculo estimulante (FSH) com intervalos de 12 horas; este procedimento aumenta a manipulação e o estresse dos animais, o que faz com que incida negativamente nos resultados. O objetivo desta revisão é compilar os progressos mais marcados das duas últimas décadas nas pesquisas que vêm centrando seu interesse na relação do número de aplicações de FSH, tendo utilizado para isso estratégias que vão desde a simples aplicação subcutânea do hormônio até seu transporte e liberação controlada em dispositivos eletrônicos colocados no trato reprodutivo, passando também pela veiculação em substâncias poliméricas que permitem controlar a liberação à corrente sanguínea. Concluimos que indubitavelmente estes avanços revolucionarão a indústria pecuária e influenciarão de maneira positiva na massificação do uso de biotecnologias embrionárias, o que permitirá melhorias genéticas evidentes em lapsos de tempo mais curtos dentro dos rebanhos bovinos.

Palavras-chave: biotecnologias reprodutivas, ovulação múltipla, polímeros transportadores, transferência de embriões.

Introducción

Mundialmente son transferidos más embriones congelados, producidos in vivo, que embriones frescos (291.000 y 244.000, respectivamente). Esa estadística no se mantiene para América del Sur, donde fueron transferidos cuatro veces más embriones frescos que congelados. Una de las razones es el gran número de receptoras disponibles en Brasil y Argentina [1, 2].

Los datos anteriores implican la realización constante de múltiples trabajos de investigación que permitan marcadas mejorías en la implementación de biotecnologías reproductivas en Latinoamérica.

Entre las biotecnologías reproductivas usadas en los últimos tiempos en la industria pecuaria, es cada vez más común el uso de las que precisan de ovulación múltiple o superovulación. Sin embargo, aún no es posible disminuir el efecto negativo generado por el manejo de los animales por causa de la vida media corta de la hormona FSH que varía de 5 a 12 horas aproximadamente [3].

La superovulación requiere ocho inyecciones de FSH durante cuatro días consecutivos, lo que causa estrés excesivo y aumenta tanto la mano de obra involucrada en el trabajo como la manipulación de los animales en el corral, por la necesidad de inyectar la hormona cada 12 horas [4].

Actualmente, la industria farmacéutica ha conseguido grandes avances con matrices poliméricas biocompatibles, biodegradables y termosensibles, capaces de encapsular y hacer liberación controlada de medicamentos.

Los polímeros degradables en procesos hidrolíticos o enzimáticos a hidroxácidos no tóxicos son usados comúnmente en la medicina por ofrecer ventajas como biocompatibilidad y biodegradabilidad. Además ofrecen la posibilidad de constituir dispositivos apropiados para el transporte de medicamentos y disminuir la toxicidad de los medicamentos transportados [5].

El costo de las hormonas para sincronización y superovulación es también uno de los problemas que enfrenta la TE. El gran interés es evaluar la disminución del número de entradas de los animales al corral, como también la cantidad de hormona FSH inyectada, visto que algunas matrices poliméricas permiten la liberación controlada y constante de diferentes tipos de medicamentos una vez introducidos en el cuerpo, tanto humano como animal.

Superovulación

Se denomina superovulación (so) al aumento del número fisiológico de ovulaciones propias de la especie, provocado por la administración de gonadotropinas. En el bovino se considera una respuesta al tratamiento cuando se producen más de dos ovulaciones. El hecho de que la especie bovina sea monovular imposibilita la obtención de varios descendientes de manera natural en corto tiempo a partir de una hembra genéticamente superior [6].

La aplicación de biotecnologías embrionarias requiere el proceso denominado superovulación que se consigue mediante el uso de hormonas exógenas. Esa biotecnología permite la producción de varios embriones en el mismo ciclo estral, difiriendo de la producción unitaria que alcanza una hembra bovina en cada ciclo [7].

La eficiente respuesta al tratamiento superovulatorio es la condición fundamental para que un programa de transferencia de embriones tenga éxito y para el desarrollo científico de biotecnologías más avanzadas que dependan de la disposición de embriones y ovocitos, como material de investigación (micromanipulación y sexado de embriones, clonación y transgénesis) [8].

La gran variabilidad en la respuesta a los tratamientos hormonales puede ser influenciada por factores relacionados con los tratamientos o, en algunos casos, con factores individuales asociados a las características de la dinámica folicular [9].

Hormonas utilizadas para superovulación

Entre las gonadotropinas utilizadas para promover la superovulación se destacan la gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG), administrada aisladamente o asociada a suero anti-PMSG, y la hormona folículo estimulante (FSH), oriunda del extracto de pituitaria de porcinos, ovinos y equinos, o incluso la FSH recombinante bovina y la somatotropina bovina (bST) [9, 10].

La eCG permite conseguir una respuesta superovulatoria con apenas una dosis, entre los días 8 y 12 del ciclo estral, pero, por tener una mayor vida media en la sangre (más de diez días), resulta en prolongada estimulación del crecimiento folicular, provocando un crecimiento disperso con altos niveles de estrógenos que afectan tanto las tasas de fertilización como la calidad

embrionaria. Además de eso, esta hormona también induce respuesta inmunológica, lo que lleva a la producción de anticuerpos anti-eCG, lo cual hace que sea necesario el aumento de la dosis en aplicaciones subsiguientes para obtener el mismo efecto en los tratamientos posteriores [11, 12].

La hormona más utilizada en programas de transferencia de embriones bovinos es la FSH-p, cuyo tratamiento es realizado con la aplicación de dos dosis diarias, durante cuatro días, comenzando entre los días 8 y 12 del ciclo estral. Otras hormonas que pueden causar superovulación, aunque son poco utilizadas, son la EPE (extracto de pituitaria equina), FSH-O (extractos de pituitaria ovina) y HMG (gonadotropina aislada de mujeres en menopausia) [11].

Debido a la media vida corta de la FSH (aproximadamente 5 a 12 horas), es preciso realizar múltiples aplicaciones intramusculares para conseguir el efecto de superovulación en las hembras bovinas [9, 13]. Por tanto, los protocolos más comunes requieren seis a ocho aplicaciones de FSH con intervalos de doce horas, a fin de que varios folículos se desarrollen y pueda ocurrir una ovulación múltiple, para permitir mayor obtención de embriones en la colecta [14].

Evolución de la superovulación

A pesar del hecho de que la eCG tiene menor costo en el mercado, actualmente su uso no es muy difundido, visto que su acción prolongada (desde cuarenta horas hasta diez días) puede inducir el crecimiento folicular en la primera onda después de la ovulación, lo que causa incremento en las concentraciones de estradiol en la sangre, un proceso que, a su vez, tiene efecto deletéreo en las etapas iniciales del desarrollo embrionario. Además de eso, la eCG también puede provocar un crecimiento folicular continuo, lo que lleva al aumento del tamaño de los ovarios y a la formación de quistes foliculares [15].

La inyección de FSH dos veces al día, en dosis decrecientes, promueve una mejor respuesta superovulatoria en ganado bovino que la eCG, aunque las múltiples inyecciones no llevan sólo a inconvenientes técnicos para el veterinario, sino que a su vez causan excesivo estrés en las hembras [11].

La utilización de FSH como agente inductor de superovulación ha sido extensivamente estudiada. Por ejemplo, fue probado el uso de diferentes concentraciones

[16, 17], vías de administración [18, 19], eficiencia de productos comerciales de diferentes marcas y procedencias [19, 20] y variaciones en la relación FSH-LH entre los preparados comerciales [21, 22].

Fue demostrado que concentraciones elevadas de LH en una preparación de FSH tiene efectos negativos en la producción y en la calidad de embriones bovinos. El nivel máximo de contaminación con LH debe ser de 15 a 20% [23].

Los resultados inconstantes han sido asociados con las ovulaciones prematuras durante el tratamiento con FSH, con la consecuente formación precoz de cuerpo lúteo, que secreta niveles subluteales de progesterona en el periodo esperado de estro y, por tanto, la inhibición del pico pre-ovulatorio de LH y consecuentemente de ovulaciones [24].

Investigadores holandeses realizaron experimentos que permitieron, posteriormente, el desarrollo de protocolos de superovulación para realizar inseminación artificial a tiempo fijo [IATF]. Este protocolo fue llamado P-36, por mantener la fuente de progesterona por hasta 36 horas después de la aplicación de PGF2 α , y la ovulación será inducida con LH exógena, administrada 12 horas después de la remoción de la fuente de P4 (o sea, 48 horas pos aplicación de PGF2 α), evitando la inconveniencia de la detección de estro [25-27].

En hembras de la raza Nelore ha sido utilizada una variación del protocolo P-36, según el cual el dispositivo intravaginal es retirado 24 horas después de la prostaglandina F2 α , que pasó, así, a ser llamado P-24. Esta variación puede tener resultados comparables con los de P-36, porque la capacidad ovulatoria en *Bos taurus indicus* es adquirida con diámetros inferiores a los observados en *Bos taurus taurus* [28].

Sorprendentemente, la utilización del protocolo P-36 en razas europeas disminuyó el número de embriones viables, comparado con protocolos convencionales con observación de estro. Esta observación motivó pequeños ajustes en el protocolo. En las razas Holstein y Angus, el protocolo P-36 se mostró más eficaz cuando el agente inductor de la ovulación (LH o GnRH) fue aplicado 60 horas (P36/LH60), en vez de 48 horas (P36/LH48), después de la administración de PGF2 α [29, 30].

A pesar de esos avances en los protocolos de superovulación, poco había sido hecho hasta entonces para definir estrategias que permitieran la reducción del número de inyecciones durante el tratamiento superovulatorio.

En una pesquisa realizada en la Universidad de Brisbane (Australia), se comprobó que una única aplicación de FSH en hembras Brahman, por vía intramuscular, estimula el crecimiento folicular por dos días. Ese trabajo sugirió una revisión de conceptos preestablecidos sobre el real tiempo de acción de la FSH en folículos en desarrollo [31, 32].

La gran ventaja de ese descubrimiento fue disminuir el número de aplicaciones de FSH que, tradicionalmente, eran ocho de 12 en 12 horas, pasando para tres aplicaciones en momentos estratégicos del protocolo, cada 36 horas (figura 1).

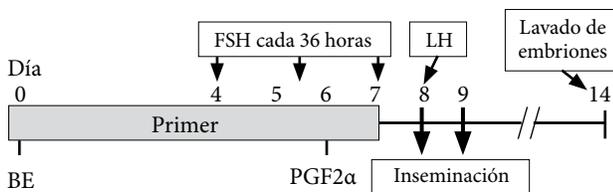


Figura 1. Proceso de superovulación con tres inyecciones de FSH cada 36 horas

Fuente: adaptado de Martins [31]

Algunos trabajos hacen referencia a la aplicación única, subcutánea, de hormona FSH, diluida en solución salina 0,9% NaCl, lo que muestra que existen, entretanto, diferentes opiniones. Bó et al. (1994) y Lovie et al. (1994) observaron que la aplicación única presenta resultados similares a los de la aplicación múltiple (ocho inyecciones); mientras que Takedomi y colaboradores (1995) no obtuvieron respuesta al realizar dicho protocolo [11, 33, 34].

Investigadores australianos han desarrollado un sistema electrónico de liberación de medicamentos, capaz de liberar múltiples medicamentos en diferentes proporciones y duraciones (simultánea o consecutivamente), el cual posee gran capacidad de almacenamiento y puede ser colocado de manera similar a los implantes intravaginales existentes; ya fue probado como liberador de progesterona in vivo durante siete días, produciendo simultáneamente pulsos de estradiol cada dos horas con seis días de intervalo [35].

Investigadores japoneses relataron que una única aplicación de FSH-p disuelta en solución salina 0,9% NaCl causa, primeramente, un drástico incremento, y luego continúa con una súbita disminución en la concentración plasmática de esa hormona, lo que expone a los ovarios a una alta concentración de FSH-p, mayor

que la normal, causando fallas en el desarrollo folicular y en la ovulación [11].

Otros estudios han mostrado que la inyección subcutánea de FSH resulta en múltiples ovulaciones, aunque el número de ovulaciones sea menor que con las inyecciones intramusculares múltiples [33, 34].

La inyección única de FSH, aplicada por vía subcutánea, es suficiente para inducir superovulación en bovinos. Sin embargo, esta inyección aumenta las concentraciones plasmáticas de FSH durante un corto periodo, de forma que una parte de los folículos estimulados puede parar su crecimiento en la ausencia de niveles adecuados de FSH en la etapa final de la maduración [36].

El efecto de diferentes métodos de administración de hormona FSH ha sido examinado y los resultados sugieren que la inyección única, por vía subcutánea, puede ser tan efectiva como las múltiples inyecciones intramusculares. Pero aunque la inyección única también cause superovulación en las hembras bovinas, la administración de múltiples inyecciones de hormona FSH produce mayor cantidad de embriones congelables y transferibles cuando es comparada con la primera [37].

Manipulación de la onda folicular

Existen dos formas básicas de controlar la emergencia de una nueva onda folicular para superovulación en hembras bovinas: la ablación mecánica del folículo dominante, mediante el uso de equipo de aspiración folicular guiado por ultrasonido, y la ablación farmacológica, con diferentes combinaciones de productos hormonales [38].

La ablación del folículo dominante puede ser conseguida usando un equipo de aspiración folicular guiado por ultrasonido. Puede realizarse la aspiración de todos los folículos mayores de 5 mm de diámetro o la ablación del folículo dominante de la primera onda de crecimiento folicular, lo que produce caída prematura de los estrógenos e indirectamente de la FSH, y sincroniza la emergencia de una nueva onda de crecimiento. Para mejorar el desarrollo folicular este tratamiento puede ser acompañado por inyecciones de somatotropina bovina [38].

El tratamiento hormonal más común es aquel que usa estradiol 17 β (E-17 β) o benzoato de estradiol (BE) combinado con progesterona (P4), inyectados en el

mismo momento de la inserción de un dispositivo intravaginal de liberación de P4 [39, 40].

GnRH y LH-p también han sido utilizados para inducir ovulación del folículo dominante y sincronizar la emergencia de la nueva onda, aunque su eficiencia depende del estado del folículo dominante en el momento del tratamiento, lo que hace que la emergencia de la onda folicular resultante pueda ser variable para la superestimulación [39, 40].

Una dificultad presentada, actualmente, es la prohibición del uso de estradiol en algunos países. Un abordaje alternativo podría ser el aumento de la respuesta ovulatoria del folículo dominante al tratamiento con GnRH y el inicio de los tratamientos con FSH en el momento de la emergencia de la nueva onda folicular [41].

Durante la superovulación, a fin de evitar la presencia de un folículo dominante que podría causar atresia de los folículos subordinados, el tratamiento con FSH debe comenzar justamente al inicio de la nueva onda folicular, es decir, cuatro días poscolocación del dispositivo intravaginal y la administración del estrógeno. Dos días después de la primera aplicación de FSH es administrada una dosis luteolítica de PGF_{2α}, y doce horas más tarde el dispositivo intravaginal es removido. Las donadoras son inseminadas artificialmente doce y veinticuatro horas posdetección del celo [42].

Seis a siete días más tarde, los embriones son colectados, clasificados y congelados o transferidos. Este protocolo presenta dos ventajas: puede ser iniciado en cualquier día del ciclo estral y dispensa la observación del celo inicial. Sin embargo, aún requiere la detección del estro para la inseminación artificial de las donadoras [27].

Algunos investigadores probaron la eficacia de protocolos, en los cuales el momento esperado de la ovulación era atrasado por 6 a 12 horas, manteniendo la liberación de P4 (CIDR o DIB), y la ovulación era inducida por la administración de LH o GnRH [27, 43].

Tales protocolos no aumentaron significativamente el número de embriones viables cuando fueron comparados con protocolos con detección del estro. Sin embargo, con estos tratamientos hormonales fue posible controlar el momento de la ovulación, lo cual permitió la utilización de IATF. A partir de estos experimentos fue posible el desarrollo del protocolo P-36, que consiste en mantener la fuente de progesterona hasta 36 horas después de la aplicación del agente luteolítico [43].

Factores que afectan la respuesta superovulatoria

Entre los factores que afectan la respuesta tanto en la superovulación como en la producción de embriones, hay algunos considerados fisiológicos, como la raza, edad, estado nutricional, sanidad, estado reproductivo, etc. Igualmente, se deben considerar aquellos factores relacionados con el tratamiento de superovulación, como el tipo de dosis de hormona, superovulaciones repetidas y sus respuestas [44].

Los programas tradicionales de superovulación aún presentan algunas limitaciones como: 1) manejo para detección de celo; 2) necesidad de iniciar el tratamiento superestimulador en momento específico del ciclo estral; 3) necesidad de detección del celo para inseminación de las hembras superestimuladas; 4) baja repetibilidad en la producción de embriones viables por donadora; 5) cerca de 20 a 30% de las donadoras no responden al tratamiento [32].

Por otro lado, la variabilidad en la respuesta de las donadoras de embriones a tratamientos superestimuladores con gonadotrofinas continúa siendo uno de los mayores problemas en los programas comerciales de transferencia de embriones [27].

El estrés es responsable por diversas alteraciones fisiológicas en los animales, incluyendo la subfertilidad. La interferencia del estrés en el rendimiento reproductivo de los bovinos muestra mayor importancia cuando se emplea manejo intensivo. Además de eso, tanto el cortisol (principal hormona indicadora de estrés) como la progesterona son liberados por la glándula adrenal en condiciones de estrés. En los bovinos, se considera como valor basal de cortisol 10 ng/ml, y ha sido demostrado que los manejos en corral elevan los niveles plasmáticos de esa hormona por encima de ese valor [45].

Estados repetidos de estrés agudo pueden afectar el pico preovulatorio de LH en el ganado, e inyecciones de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) exógena disminuyen significativamente la frecuencia de pulsos de LH [46, 47].

Adicionalmente al estrés por manejo en las regiones tropicales, debe ser tenido en consideración el estrés producido por las altas temperaturas que, en algunos casos, es capaz de producir largos periodos de aciclicidad (niveles de progesterona <1 ng/ml), o la ocurrencia de ciclos irregulares y, sobre todo, ciclos de corta duración. Siendo así, se concluye que el estrés calórico afecta negativamente la dinámica ovárica [48].

Algunos trabajos han reportado que el estrés de transporte causa disminución del número de cuerpos lúteos en las novillas superovuladas con incremento en las concentraciones plasmáticas de cortisol [49].

Los procesos de superovulación tienen la posibilidad de disminuir el estrés provocado por las múltiples inyecciones diarias, utilizando una hormona como la eCG, con resultados poco consistentes, o usar una hormona que presenta mejores resultados, pero requiere múltiples aplicaciones, acarreado problemas de estrés (FSH). Siendo así, la situación ideal sería utilizar FSH en una dosis única que permita garantizar su lenta liberación durante el tiempo apropiado para la estimulación del crecimiento folicular múltiple.

Polímeros vehiculizadores de fármacos

En la industria farmacéutica existe gran interés en la búsqueda y desarrollo de materiales poliméricos, como los llamados “polímeros inteligentes”, debido a su habilidad de controlar la liberación de medicamentos inyectados en el cuerpo, tanto humano como animal, además de ser cada vez menos agresivos con el medio ambiente [50].

Los polímeros han demostrado potencial en aplicaciones biomédicas como la reparación de tejidos. Matrices de polietileno glicol-poliácido láctico-co-ácido glicólico (PEG-PLGA) han sido usadas para promover la cura de la diabetes, como liberadoras de factor de transformación $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Este es un factor de crecimiento importante relacionado con la reparación de tejidos, y hoy está siendo usado experimentalmente en la reparación de defectos de tejido cartilaginoso en unión con condrocitos [51].

Los polímeros pueden ser clasificados, según su origen, en: homopolímeros compuestos de un solo tipo de monómero y heteropolímeros o copolímeros constituidos por monómeros diferentes, como la unión entre PEO (polietileno óxido) y PPO (polipropileno óxido). También pueden ser clasificados según el patrón de repetición de los monómeros en las cadenas de copolímeros, como copolímeros alternantes, en bloque, aleatorios y copolímeros de inserto (figura 2) [52].

Otras clasificaciones de los polímeros pueden ser hechas con base en su mecanismo de polimerización, su composición química, sus aplicaciones y su comportamiento bajo temperaturas elevadas [52].

Los materiales introducidos en los tejidos corporales con propósitos terapéuticos específicos, de

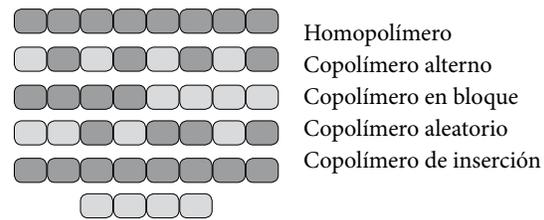


Figura 2. Clasificación de los polímeros según la unión de las unidades monoméricas

Fuente: IUPAC [52]

diagnóstico o propósitos preventivos, son llamados biomateriales. Estos deben ser biocompatibles, es decir, no deben causar respuesta fisiológica que pueda deteriorarlos en el medio donde son introducidos, y después de su interacción con los tejidos y fluidos corporales deben biodegradarse en componentes no tóxicos tanto química como físicamente, o por la combinación físico-química. Existen otros términos para describir la biodegradación, que son bioerosión y bioabsorción [53].

Hace casi tres décadas viene siendo utilizado un material polimérico para hilos de sutura, basado en derivados del poliácido láctico, tanto por su biocompatibilidad como por las propiedades no inmunogénicas y no tóxicas de este material en los tejidos. Él se descompone simplemente en ácido láctico, presente en todos los animales y microorganismos [50].

Si la matriz polimérica no fuera degradada dentro del cuerpo, ella debe ser quirúrgicamente removida, lo que implica un alto costo y riesgo para el paciente. Por ejemplo, en los sistemas alternativos para administración de vacunas, fue demostrado que la producción de anticuerpos, en ratones inmunizados con una única dosis de un antígeno, contenidos en una matriz polimérica no degradable, se mantenía por más de seis meses en niveles comparados a los de los ratones inmunizados por dos veces. Sin embargo, la aplicación de esta estrategia suscitó preocupación por los posibles efectos adversos que el material podría ocasionar en el organismo, creándose la necesidad de remoción quirúrgica del implante, posliberación del antígeno. En este sentido, la síntesis de polímeros biodegradables contribuyó para la mejoría de estos sistemas, puesto que ellos no requieren remoción quirúrgica y presentan pocos efectos colaterales [54].

Hoy los polímeros ofrecen ventajas como liberación de fármacos a una velocidad determinada (liberación temporal: control sobre la velocidad de liberación del fármaco) o una localización indicada para la

necesidad del cuerpo o estado de la enfermedad en un periodo específico de tiempo (liberación espacial: control sobre la localización del fármaco) [55].

Los poliésteres biodegradables, como el poliácido láctico, policaprolactona y poliácido glicólico y sus copolímeros, han sido sintetizados (poliésteres biodegradables sintéticos) debido a su biodegradabilidad desde la década de los setenta. Los biomateriales derivados del poliácido láctico han conquistado atención clínica en los últimos años, por su aceptación en organismos vivos. Estos han sido utilizados como elementos de fijación en materiales para reposición de huesos, hilos de suturas y matrices de encapsulación de drogas, en sistemas de liberación controlada [56].

Las matrices poliméricas biodegradables degradan in vivo en fragmentos menores que pueden ser excretados por el cuerpo. Estos productos de degradación no son tóxicos, y no deben crear ninguna respuesta inflamatoria. Otra característica importante es la ocurrencia de la degradación en un razonable periodo de tiempo, requerido por la aplicación [54].

Polímeros de gelificación termorreversible

Algunos investigadores ya consiguieron mezclar sustancias poliméricas con medicamentos, para su uso en el control de enfermedades cancerígenas, con éxito. Otros buscan la liberación regulada de medicamentos

y hormonas en el cuerpo. En estas búsquedas, fueron encontradas características muy interesantes más allá de la biocompatibilidad y biodegradabilidad, como la termosensibilidad de algunos polímeros, que les permite cambiar de líquido para gel cuando ocurre un aumento en la temperatura [57, 58].

En las formas de administración convencionales (spray, inyección, píldoras), la concentración de los fármacos en la corriente sanguínea presenta aumento hasta alcanzar un pico máximo y entonces declina. Cada medicamento posee una franja de acción terapéutica a partir de la cual si la dosis aumenta, es tóxica, y si disminuye, es ineficaz. Los niveles plasmáticos son dependientes de las dosis administradas. Este hecho es problemático si la dosis efectiva está próxima a la dosis tóxica. El objetivo de los sistemas de liberación controlada es mantener la concentración del fármaco entre estos dos niveles por un tiempo prolongado, utilizando una única dosis [54].

La diferencia de concentración plasmática efectiva en función del tiempo, entre sistemas convencionales y de liberación controlada, puede ser visualizada en la figura 3.

En el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos, se debe tener en cuenta: 1) tipo de material polimérico, 2) ruta de preparación, 3) tamaño de las partículas, 4) cantidad de fármaco incorporado, 5) carga, 6) fármaco liberado (in vivo e in vitro), 7) estabilidad del fármaco, 8) estabilidad del sistema de liberación, 9) efecto de almacenamiento, 10) propiedades

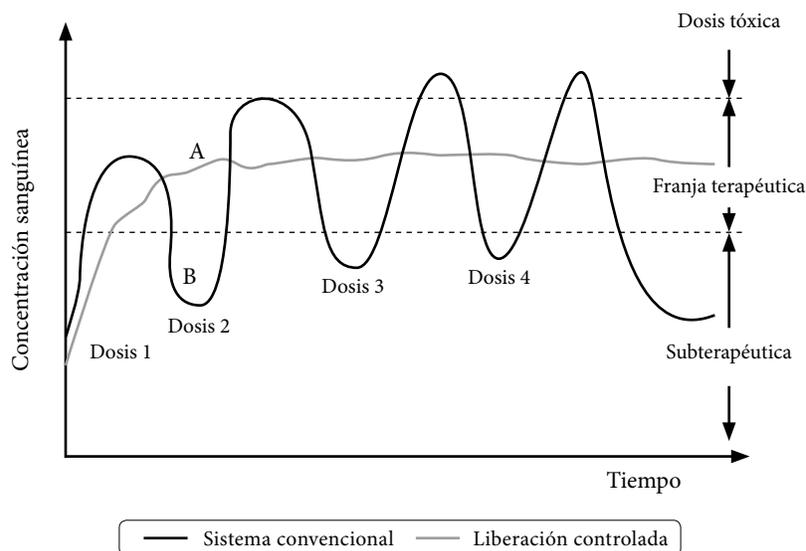


Figura 3. Perfiles de liberación de medicamentos en función del tiempo

Fuente: adaptado de Mantovani [54]

de la superficie, 11) presentación, 12) antigenicidad, 13) toxicidad del sistema de liberación, 14) fármaco y biocinética del sistema de liberación [53].

El uso de copolímeros en bloque para liberación de medicamentos fue propuesto en la década de los ochenta. Los copolímeros que poseen bloques hidrofílicos e hidrofóbicos (anfifílicos) tienden a formar micelas en el agua, para reducir la energía libre, principalmente desde sus interacciones hidrofóbicas; sus soluciones acuosas muestran gelificación termorreversible con los cambios de temperatura. Basados en la termosensibilidad y biodegradabilidad, el material polimérico ha sido utilizado para la formación in situ de depósitos de liberación de drogas, por inyección de soluciones intracorporales [59].

Polímeros transportadores de hormonas reproductivas

Una alternativa para conseguir que la hormona FSH sea liberada lentamente, partiendo de una única aplicación, es su transporte en polímeros que la liberen de forma lenta en la sangre y que, adicional a esto, sean inocuos o de muy baja toxicidad [59].

Algunos ensayos de vehicular hormonas y otras sustancias (proteínas, medicamentos, etcétera) han sido realizados con éxito, lo que demuestra la utilidad de los llamados "polímeros inteligentes" en la lenta y sustentada liberación de sustancias por tiempos controlados. Como ejemplo, se puede citar la administración de análogos de GnRH o testosterona, disueltos en polímeros termosensibles de lenta liberación, y el transporte de FSH en polivinilpirrolidona, ya realizado en vacas Holstein [3, 11, 60, 61].

El Pluronic F 127 (PF 127), también llamado Poloxamer 407, es un gel termorreversible, es decir que puede mudar de líquido para gel o volver para líquido, de acuerdo con la temperatura del medio. Esta característica permite su uso como vehículo de medicamentos por vía oral, tópica, intranasal, vaginal, rectal, ocular y parenteral [59].

El PF 127 presenta forma líquida en bajas temperaturas (4 a 5 °C) y se gelifica en temperatura ambiente; por eso puede mezclarse con la hormona a temperatura de refrigeración y mantenerse de esa forma hasta su inyección en el cuerpo del animal, donde se convierte en gel por el aumento de temperatura. Este tipo de polímero puede vehicular y liberar lentamente la hormona FSH en la sangre, permite su acción sobre los folículos

reclutados, evita la formación de un folículo dominante y presenta crecimiento y ovulaciones múltiples [62].

El PF 127 tiene una duración media dependiente de las cadenas que él forma con otros polímeros, como el alcohol polivinílico (PVA), lo cual puede mejorar la estabilidad y la duración dentro del cuerpo [62].

El PVA, asociado con PF 127, es utilizado básicamente para aumentar la tensión superficial de la matriz polimérica, aumentando su vida media y por tanto prolongando la degradación del polímero y la liberación del medicamento.

La biodegradación y la bioabsorción de estos polímeros es una sucesión de eventos. Expuesto a ambiente acuoso, el material sufre inicialmente hidratación. Con la presencia de moléculas de agua, el proceso de degradación ocurre por medio de la hidrólisis de las ligaciones ésteres, originando productos en forma de oligómeros (o monómeros) solubles y no tóxicos. La degradación prosigue por un proceso biológicamente activo (por enzimas) o por el clivaje hidrolítico pasivo, que se caracteriza por la pérdida de masa, disminución de masa molar ponderal media y por la pérdida de sus propiedades mecánicas [63].

Algunas investigaciones realizadas permiten presumir que la liberación de los medicamentos, dentro del cuerpo, realizada por los polímeros, hace que su acción sea más duradera o que su dosis pueda ser disminuida en función del transporte inteligente ejercido por el polímero.

En estudios realizados en vacas Holstein, que fueron superovuladas con una sola inyección subcutánea de FSH, transportada en polivinilpirrolidona (PVP), se observaron resultados similares a los de la superovulación tradicional de ocho inyecciones. En los grupos que fueron inyectados con FSH transportado en PVP (25-50%), se encontraron entre $6,3 \pm 2,6$ y $8,8 \pm 1,7$ estructuras con hasta $5,0 \pm 2,1$ embriones transferibles, mientras que, en el grupo en que fueron inyectados ocho veces, se obtuvieron $9,5 \pm 2,1$ estructuras y $6,0 \pm 2,5$ embriones transferibles [11, 62].

De la misma forma, Kimura et al. (2007) [12] consiguieron vehicular FSH en hidroxigel de aluminio, para la realización con éxito de superovulación en hembras bovinas de raza negra japonesa. Sin embargo, en trabajos realizados, en Argentina, transportando FSH en PVP, no se consiguió obtener el efecto superovulatorio, comparado con el tratamiento tradicional de ocho inyecciones en dosis decrecientes [3].

Para simplificar la superovulación, se ha diluido FSH en una fórmula de lenta liberación (SRF) y se

administró como inyección intramuscular única o dividida. Aunque una única inyección intramuscular de Folltropin-V en SRF fue altamente eficaz en la inducción de superovulación, se presentó dificultad para mezclar la FSH con SRF. Esta dificultad fue superada cuando se disminuyó la concentración inicial de SRF para 25% y se realizó la aplicación intramuscular con intervalos de 48 horas, presentando una respuesta superovulatoria que no difirió de los grupos control [64, 65].

En un estudio in vitro realizado por nuestro grupo de investigación, se probó el transporte de FSH en una matriz polimérica conformada por diferentes concentraciones de PF 127 PVA; se encontró que la curva de liberación hormonal presentó un pico en las primeras 24 horas, seguido por una disminución lenta que fue mantenida hasta por 120 horas, hecho que permitiría obtener estímulo superovulatorio similar a los protocolos tradicionales de inyección en dosis decrecientes cada 12 horas por cuatro días [66].

Los resultados expuestos muestran la vehiculización de FSH en matrices poliméricas como una alternativa viable para la disminución del número de inyecciones tradicionalmente aplicadas para la producción de superovulación en la especie bovina, lo que ciertamente redundará en disminución de costos de mano de obra, además de la evidente mejora en lo que se refiere al bienestar animal.

La utilización de estos nuevos enfoques tecnológicos unida al mejoramiento en manejo y buenas prácticas nutricionales en el ganado permitirán una masificación de la técnica de TE, lo que promueve un producto cada vez más deseable tanto en la producción de carne como de leche en la especie bovina.

Referencias

- [1] Varago F, Mendonça L, Lagares M. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev Bras Reprod Anim.* Abr-Jun 2008; 32(2): 100-9.
- [2] Stroud B, Bó GA. Estatísticas mundiais de 2009 para transferência embrionaria em animais domésticos de fazenda. Resumo do relatório da comissão de recuperação de dados da sociedade internacional para transferência de embriões (IETS). En: xxv Reunión Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE). Cambuco (Angola); 2011. p. 157-63.
- [3] Callejas S, Albeiro R, Cabodevila J, Dulout F, Aller JE, Teruel M. Efecto de la estimulación ovarica com FSH-P em dosis única disuelta em polivinilpirrolidona y la combinación de FSH-P y eCG em dosis reducidas. *Rev Arg Prod Anim.* 2002; 22(2): 141-51.
- [4] Esquerdo J, Rodrigues R, Toledo A et al. Efeito do método de sincronização da onda folicular na resposta superovulatória de bovinos. En: xxv Reunión Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE). Cambuco (Angola); 2011.
- [5] Amaral E, Grabe A, Nogueira H, Linz G, Barratt GE, Mosqueira V. Cardiotoxicity reduced by Halofantrine entrapped in nanocapsule devices. *Life Sci.* Mar 2007; 80(14): 1327-34.
- [6] Cabodevila JE, Torquatri S. Superovulação de Fêmeas bovinas. En: Palma GA. *Biotecnologia de la reproducción.* 1a ed. Argentina: Inta; 2001. p. 79-108.
- [7] Ereno R. Dinâmica folicular em bovinos. [Monografía de maestría]. São Paulo: Universidad Estatal Paulista. Botucatu-SP; 2002.
- [8] Eligio T. Síntese bacteriana e modificação de polihidroxicanoatos para liberação controlada de hormônios. [Tesis doctoral]. Rio de Janeiro: Universidad Estatal del Norte Fluminense; 1998.
- [9] Machado LF, Corrêa M, Pineschi LE. Alternativas hormonais para programas de transferência de embriões em bovinos. UFPEL; 2003. [Consultado: 14 de agosto del 2012]. Disponible en: www.ufpel.tche.br/hcv
- [10] Marquez M, Silva K, Max M, Gomes R, Seneda, M. Principais estratégias para o incremento da TE em bovinos. *Acta Sci Vet.* 2008; 36(2sup): 161-4.
- [11] Takedomi T, Aoyagi Y, Konishi M, Kishi H, Taya K, Watanabe G, Sasamoto S. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinilpirrolidone. *Theriogenology.* May 1995; 43(7): 1259-68.
- [12] Kimura K, Hirako M, Iwata H, Aoki M, Kawaguchi ME, Seki M. Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology.* Sep 2007; 68(4): 633-39.
- [13] Demostier M, Beckers J, Van Der Zwalmen P, Closset J, Gillard J, Ectors F. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology.* Ago 1998; 30(2): 379-86.
- [14] Fonseca JF, Silva Filho JM, Pinto A, Palhares MS. Superovulated zebu cows embryonic developmental stages. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001; 53(6): 671-76.
- [15] Goulding D, Williams D, Roche J, Boland M. Factors affecting superovulation in heifers treated whit PMSG. *Theriogenology.* 1996; 45(4): 765-73.
- [16] Gonzalez A, Lussier J, Carruthers T, Murphy BD, Mappletoft R. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose an anti

- pregnan mare serum gonadotropin. *Can Vet J.* Mar 1994; 35(3): 158-62.
- [17] Saunders J, Wilmott N, Palasz A, Mapletoft, R. Dose titration of follitropin in the cow. *Theriogenology.* 1990; 33: 319.
- [18] Hockley D, Bó G, Palasz A, Del Campo M, Mapletoft R. Superovulation with a single subcutaneous injection of Follitropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology.* 1992; 37: 224.
- [19] Tribulo H, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Tribulo R, Bó G. Superovulation in *Bos indicus* with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. *Theriogenology.* 1993; 39: 331.
- [20] Donaldson LE. A comparison of FSH products. En: *International workshops of embryo transfer, biotechnology and advanced technologies.* Montevideo: Universidad de la República. 1; 1995: 1-8.
- [21] Donaldson LE. Embryo production by super-ov and FSH-p. *Theriogenology.* 1990; 33: 214.
- [22] Braileanu G, Albanese C, Card C, Chedrese P. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. *Theriogenology.* Abr 1998; 49(5): 1031-7.
- [23] Barros C, Nogueira M. Superovulação em zebuínos de corte. En: *Biotecnologia da reprodução em bovinos. I Simpósio Internacional da reprodução animal aplicada.* Londrina, PR; 2004.
- [24] Stock A, Ellington J, Fortune JE. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by super ovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology.* 1996; 45: 1091-102.
- [25] Vos P et al. Does postponement of preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo yield in super ovulated Holstein heifers. *Theriogenology.* 1995; 43(1): 344.
- [26] Van de Leemput E, Vos P, Hyttel P, Van den Hurk R, Bevers M, Ven der Weijden G, Dielemam S. Effect of bried postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/ prostaglandin- treated heifers. *Theriogenology.* 2001; 55: 573.
- [27] Barros C et al. Tratamentos superestimulatórios utilizados em protocolos para transferência de embriões bovinos. *Acta Sci Veterinariae,* 2007; 35 Suppl 3.
- [28] Baruselli P, Gimenes L, Sales J. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Rev Bras Reprod Anim.* 2007; 31(2): 205-11.
- [29] Baruselli P, Sá Filho M, Martins C, Nasser L, Nogueira M, Barros C, Bó G. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology.* Ene 2006; 65(1): 77-88.
- [30] Chesta P, Tribulo L, Tribulo H, Balla E, Baruselli PS, Bó GA. Effect of time of ovulation induction by gonadotropin-releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time [abstract]. *Reprod Fertil Dev.* 2007; 307.
- [31] Martins CM, Santos ICC, Valentim R, Sales JNS, Reis, PO, Crepaldi GA, Baruselli OS, D'Occhio MJ. Efeito da redução do número de administrações de FSH na resposta superovulatória e na produção de embriões de doadoras nelore. *Acta Sci Vet.* 2008; s.d.
- [32] Baruselli P, Martins C, Sales J, Ferreira R. Novos avanços na super ovulação de bovinos. *Acta Sci Vet.* 2008; 36 Suppl 2: 433-48.
- [33] Bó G, Hockley D, Nasser L, Mapletoft R. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Follitropin-V in beef cattle. *Theriogenology.* Nov 1994; 42(6): 963-75.
- [34] Lovie M, Garcia A, Hackett A, Mapletoft RJ. The effect of dose schedule and route of administration on superovulation on superovulatory response to follitropin in Holstein cows. *Theriogenology.* 1994; 41: 241.
- [35] Rathbone M, Kinder J, Fike K, Kojima F, Clopton D, Ogle C, Bunt C. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system desing for the control of the esturs in cattle. *Adv Drug Deliv Rev.* Sep 2001; 50(3): 277-320.
- [36] Martinez A, Alvarez R, Pires R, Nogueira G. Resposta ovariana e perfil de desenvolvimento folicular de novilhas tratadas com injeção subcutânea de FSH e reforço intramuscular após 48 horas. *B Industr Anim. Ene-Mar 2008;* 65(1): 15-19.
- [37] Kelly P, Duffy P, Roche J, Boland P. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim Reprod Sci.* Mar 1997; 46(1-2); 1-14.
- [38] Buratini J, Price C, Visintin JE, Bó G. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology.* Ago 2000; 54(3): 421-31.
- [39] Bó G, Colazo M, Martinez M, Kastelic J, Mapletoft R. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestágenos y diferentes esteres de estradiol. Em: *II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Biotecnologia da reprodução em bovinos;* 2007.
- [40] Bó G, Guerrero DE, Adams G. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology,* Ene 2008; 69(1): 81-7.
- [41] Bó G, Guerrero DE, Mapletoft R. Novas abordagens para a manipulação da dinâmica folicular para

- superestimulação em bovinos. *Acta Sci Vet.* 2008; 36 Suppl 2: 397-402.
- [42] Bó G. Dinámica Folicular y Tratamientos Hormonales para sincronizar la ovulación en el ganado vacuno. Trujillo. 2002. [Consultado: 14 de agosto del 2012]. Disponible en: http://www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/grabielfbofr.PDF
- [43] Barros C, Nogueira M. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. *Embryo Transfer Newsletter.* 2005; 23: 5-9.
- [44] Silva, J. Fatores que influenciam a produção de embriões de vacas Nelore (*B. taurus indicus*) superovuladas. [Dissertação de maestría]. Jaboticabal: UNESP. 2002.
- [45] Maziero RRD, Mattos MCC, Martin I, Oba E, Sartori R, Ferreira JCP. Concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (*bos taurus indicus*) submetidas a manejo diário ou manejo semanal. *Acta Sci Vet.* 2007; 35 Suppl 3.
- [46] Stoebel D, Moberg G. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. *J Dairy Sci.* Ene 1982; 65(1): 92-6.
- [47] Ribadu A, Nakada K, Moriyoshi M, Zhang W, Tanaka Y, Nakao T. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. *Anim Reprod Sci.* Dec 2000; 64(1-2): 21-31.
- [48] Torres-Júnior JRS, Pires MFA, Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM, Camargo LSA et al. Efeito do estresse calórico na ciclicidade ovariana de doadoras *Bos indicus* sob regime de opu-piv. *Acta Sci Vet.* 2007; 35 Suppl 3.
- [49] Monnlaux D, Chupin D, Saumande J. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology.* 1983; 19: 55-79.
- [50] Castro, ML. Copolímeros estatísticos biodegradáveis de E caprolactona e L, L-dilactideo-síntese, caracterização e propriedades. [Tesis doctoral]. Escuela Politécnica de la Universidad de São Paulo; 2006.
- [51] Yu LE, Ding J. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chem Soc Rev.* Ago 2008; 37(8): 1473-81.
- [52] IUPAC. Nomenclature of Regular Single-Strand Organic Polymers. *Pure Appl. Chem.* 2002; 74: 1921-1956. [Consultado: 20 de agosto del 2012]. Disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/rssop>
- [53] Sáez V, Hernández E, Sanz LE, Katime I. Liberación controlada de fármacos. *Micropartículas. Rev Iberoam Polim.* 2004; 5(2): 87-101.
- [54] Mantovani M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Monografía. Universidad de Campinas Unicamp. Instituto de Química. Laboratório de Química de Estado Solido; 2002.
- [55] Ghandehari H. Materials advanced drug delivery in the 21st century: a focus area for advanced drug delivery reviews. *Adv Drug Deliv Rev.* Jun 2008; 60(9): 956.
- [56] Sodergard AE, Stolt M. Properties of lactid acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science.* Jul 2002; 27(41): 1123-63.
- [57] Chaoliang H, Sung W, Doo S. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. *J Control Release.* May 2008; 127(3): 189-207.
- [58] Chung H, Lee Y, Park T. Thermo-sensitive and biodegradable hydrogels based on stereocomplexed Pluronic multi-block copolymers for controlled protein delivery. *Journal of controlled release.* Abr 2008; 127(1): 22-30.
- [59] Escobar J, López M, Naik A, Kalia N, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermoreversible pluronic f-127 gels in pharmaceutical formulations. *J. Pharm Pharmaceut Sci.* 2006; 9(3): 339-58.
- [60] Wenzel JW, Sree Balaji KS, Koushik K, Navarre C, Duran S, Rahe C, Kompella U. Pluronic F127 gel formulations of deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. *J Controlled Release.* Dic 2002; 85(1-3): 51-9.
- [61] Chen S, Singh J. Controlled delivery of testosterone from smart polymer solution based systems: In vitro evaluation. *Int J Pharm.* May 2005; 295(1-2): 183-90.
- [62] Cohn D, Lando G, Sosnik A, Garty S, Levi A. PEO-PPO-PEO based Poly (ether ester urethane)s as degradable reverse thermo-responsive multiblock copolymers. *Biomaterials.* Mar 2006; 27(9): 1718-27.
- [63] Zhao L. Síntese e caracterização do copolímero tri bloco anfílico biodegradável poli (L,L-lactideo-stat- ϵ -caprolactona)-bloco-poli (óxido de etileno)-bloco-poli-(L,L-lactideo-stat- ϵ -caprolactona). [Tesis de maestría en Ingeniería Metalúrgica]. Universidad de São Paulo; 2007.
- [64] Bó G, Tribulo A, Ramos M et al. Simplificação dos protocolos de superovulação em bovinos. En: xxv Reunión Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE). Cambuco (Angola); 2011.
- [65] Looney C, Pryor J. Novel bovine embryo transfer technologies in the United States. *Anim Reprod.* Jul-Sep 2012; 9(3): 404-13.
- [66] Mogollon-Waltero E, Narvaez H, Da Costa R, Quirino C, Silva Fontes R. Superovulação de novilhas Nelore utilizando injeção única de hormônio foliculo estimulante veiculado em uma matriz polimérica. En: xxv Reunión Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE). Cambuco (Angola); 2011.