



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ELABORACIÓN DE IMPLANTES HORMONALES A BASE DE  
HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH) Y POLIÉSTERES  
SINTÉTICOS PARA INCREMENTAR LA TASA DE OVULACIÓN EN  
HATOS BOVINOS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :**

**JOSÉ ANTONIO SANDOVAL ZÁRATE**

**TUTOR: DR. CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR**

**COMITÉ TUTORAL**

**DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD**

**DR. RAFAEL HERRERA NAJERA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DECLARACIÓN**

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

---

José Antonio Sandoval Zárate

## **DEDICATORIA**

### **FAMILIA**

#### *A MIS PADRES:*

Gracias por su apoyo, sin el cual no hubiera llegado hasta este punto, físicamente están lejos pero desde allá sé que me siguen apoyando y ojala estén orgullosos de mi como yo de ustedes aunque no lo demuestre.

#### *A MIS HERMANOS*

A cada uno de ustedes agradezco la comprensión, apoyo, cariño, que me han brindado tras años de vivir lejos de todos ustedes y perderme de su compañía, sé que no se puede regresar el tiempo para recuperar lo perdió pero créanme que a mi manera los quiero mucho.

#### *A MIS SOBRINOS*

Gracias por soportar mi mal carácter y ojala lleguen más lejos de lo que yo he llegado.

#### *A MIS CUÑADOS*

Como parte de mi familia, les agradezco su afecto mostrado hacia mí y al igual que a toda mi familia gracias por soportar mi carácter y mi ausencia.

## AMIGOS

*J. CARLOS A. B. y FEDERICO R. V.*

Gracias por todo su apoyo durante todos los años que llevamos de conocernos, por estar en las buenas, pero sobre todo por estar muchos de los momentos más amargos, en los que me demostraron que son mis hermanos. No tengo palabras para decirles cuantos los quiero ojala siempre sigan a mi lado (aunque a veces me hagan enojar).

*CARLOS, ANA, HÉCTOR, JANICE, MEMO y PIOLI:*

Solo puedo darles las gracias por estar a mi lado por más de 12 años, conviviendo y soportando mis locuras, que por cierto ya les demostré que no estoy tan loco, solo un poco incomprendido, jajaja...

*GONZ*

Lo único que te puedo decir es gracias por todo lo que me enseñaste, aprendí mucho de y por ti, ahora solo me queda fortalecer nuestra amistad, tal vez eso logre que yo pueda ir a tu boda. jajaja

*DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN ACTUAL:*

Adrian, Alejandro, Ana, Betty, Blanca, Bruno, Carlitos Tixi, Circe, Fernanda, Flavio, Gilbocho Kike, Lulis, Mariana, Mario, Paty, Silene, Stephanie, Susy y Yolis gracias por su amistad y apoyo durante la realización de este trabajo, así como durante mi estancia en esta institución, la cual supera 7 años, cabe aclarar que me incorpore cuando tenía 18 años.

*A LOS DOCTORES DEL DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN*

Arantza, Balcázar, Galina, Lucy, Myriam, Paramo, Porrás, Susy, Valencia, Zarco y en especial a los Drs. Gutiérrez y Joel por su confianza, el primero por contratarme (aunque no me conocía) y el segundo por mantenerme en nomina y por ende seguir conviviendo con todos y cada uno de los mencionados en primera instancia. Gracias a todos por el apoyo y confianza que desde hace muchos años y hasta la fecha han depositado en mí, no tengo como agradecerles todo lo que he recibido de ustedes.

*LOS QUE ALGUNA VEZ FORMARON PARTE DEL DEPARTAMENTO DE REPRODUCCIÓN:*

Agustín, Adriana S., Adrianita, Alejandro, Cecilia, Cesar, Christian, Debby, Dianita, Esperanza, Griselda, Heberth, Laura, Leslie, Liliana, Martin, Monika, Nico, Noé, Omar, Paulo, Ubaldo, Vero y muchos más que me brindaron su amistad y apoyo durante su paso por esta área.

*DTI de la DGZVS*

A mis jefes gracias por su apoyo y comprensión al dejarme salir temprano o llegar tarde, para que yo pudiera buscar a mis sinodales o realizar los trámites necesarios para la titulación. Así como a todo el equipo de trabajo con el cual me desenvuelvo, a los cuales no nombro para evitar omitir algún nombre.

Y a todos y cada uno de los que en algún momento formaron parte de mi vida y por lo tanto colaboraron con este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme dar un paso más en mi vida académica

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría

A los miembros de mi comité Tutoral, los doctores: Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar, Josefa Bernad Bernad y Rafael Herrera Nájera por la paciencia y confianza que me tuvieron durante la realización del proyecto.

A Ana D. Rodríguez y Clara Murcia por el apoyo en las determinaciones proteicas y hormonales en el laboratorio de Reproducción.

A Susana Rojas, Bruno y Mario Rodríguez, Adriana Segundo, Silene Ferraro y Adrian Guzmán por su apoyo durante las pruebas de liberación.

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
DECLARACIÓN.....	I
RESUMEN.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	V
ABSTRACT.....	VI
INDICE.....	VII
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	IX
1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
2.0 HIPÓTESIS.....	3
3.0 REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1 Hormonas Glicoproteicas.....	4
3.1.1 Subunidad alfa ( $\alpha$ ).....	4
3.1.2 Subunidad beta ( $\beta$ ).....	4
3.1.3 Estructura Tridimensional de las subunidades.....	5
3.1.4 Glicosilación de la FSH.....	5
3.1.5 Secreción de FSH.....	6
3.1.6 Vida media de la FSH.....	7
3.1.7 Función de la FSH.....	7
3.2 Superovulación.....	8
3.3 Generalidades de los polímeros.....	10
3.3.1 Métodos de polimerización.....	11
3.3.2 Ácido poli-láctico (PLA).....	11
3.3.3 Ácido poli-glicólico (PGA).....	12
3.3.4 Ácido poli-(láctico-co-glicólico) PLGA.....	13
3.3.5 Degradación del Polímero.....	13
3.3.6 Liberación del Fármaco.....	15
3.4 Otros biomateriales absorbibles para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos.....	15
3.4.1 Hidrogeles.....	16
3.4.2 Polímeros de origen natural.....	16

3.5 Determinación Hormonal.....	16
4.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 Elaboración del comprimido.....	18
4.1.1 Molienda.....	18
4.1.2 Tamizado.....	18
4.1.3 Mezclado.....	18
4.1.4 Compresión.....	19
4.2 Pruebas de la liberación de proteína.....	19
4.2.1 Método de liberación in vitro.....	19
4.2.2 Muestreo.....	19
4.3 Determinación hormonal de las muestras.....	19
4.4 Análisis Estadístico.....	20
5.0 RESULTADOS.....	21
5.1 Etapa 1.....	21
5.2 Etapa 2.....	22
5.3 Etapa 3.....	24
5.4 Etapa 4.....	25
5.5 Comprimidos de PLGA sin FSH.....	30
6.0 DISCUSIÓN.....	31
7 0 CONCLUSIONES.....	37
8.0 LITERATURA CITADA.....	38
9.0 ANEXOS.....	46

<b>DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA O CUADRO</b>		Página
Cuadro 1.1	Análisis comparativo entre protocolos de superovulación usando eCG Vs FSH. Basado en Foote y Ellington (1988)	9
Figura 1.1:	Esquema del Acido Lactida.	12
Figura 1.2	Esquema del Acido Glicolida,	12
Cuadro 5.1	Resumen de las proporciones y reactivos utilizados para cada uno de los comprimidos que conformaron cada a las diferentes etapas del presente trabajo.	21
Grafica 5.1	Concentraciones puntuales de proteína recuperada durante la fase de liberación de los implantes cuyas proporción de hormona-polímero 1:57 (n=4)	22
Grafica 5.2	Representación gráfica de las concentraciones de proteína liberada de los implantes de la etapa II, las líneas azul y roja representa al implante 2 (n=2) y 3(n=2) respectivamente, los cuales contienen FSH (10%), polímero (10%) y lactosa (80%). Mientras que las líneas verde y morada, representan a los implantes 4(n=2) y 5(n=2), que en su formulación contienen FSH (10%), polímero (10%), celulosa (5%) y lactosa (75%).	23
Figura 5.1	Implantes de la etapa II, A: FSH (10%), polímero (10%) y lactosa (80%), B: FSH (10%), polímero (10%), celulosa (5%) y lactosa (75%), la flecha señala el sitio de fractura.	23
Grafica 5.3	Se representa las concentraciones de proteína recuperadas durante la fase de liberación de los implantes de la etapa 3, la línea azul representa al implante 6(n=2) el cual contenía 14% de lactosa, 24% de FSH y 57% polímero; la línea roja representa al comprimido 7(n=2), cuyo contenido de lactosa era del 28%, 14% de FSH y 57% polímero y finalmente el implante 8(n=2) está representado por la línea verde, este comprimido contenía el 20% de FSH, 40% polímero y 40% de lactosa de inclusión	24
Grafica 5.4	Concentraciones de proteína determinada de los comprimidos de la etapa IV de la fase I, las líneas azul y roja representa a los implantes 9(n=2) y 9a(n=2) respectivamente, cuyas proporciones de inclusión eran de 1:20 (hormona:polímero). Las líneas verde y morada representan a los implantes 10(n=2) y 10 <sup>a</sup> (n=2), cuyas	25

proporciones eran de 1:40.

Grafica 5.5	Representación gráfica de los valores puntuales de proteína recuperada de los implantes de la etapa IV de la fase II, donde las líneas azul y roja representa a los implantes 11 y 11 <sup>a</sup> (n=2) respectivamente, cuyas proporciones de inclusión eran de 1:50 (hormona:polímero). Las líneas verde representan a los implantes 12(n=2), cuyas proporciones eran de 1:100	26
Grafica 5.6	Concentraciones de proteína recuperada de los implantes de la etapa IV de la fase III, la línea azul esquematiza el comportamiento del implante 13, cuyas proporciones de hormona-polímero eran de 1:140(n=2). Las líneas roja representan al implante 14(n=2), cuyas proporciones eran de 1:225.	27
Grafica 5.7	Esquema de las concentraciones liberación de proteína y FSH de los implantes cuyas proporciones de hormona-polímero fueron de 1:500(n=4), la línea roja representa las concentraciones puntuales de proteína recuperada medida con el reactivo de Bradford (BF). La línea azul muestra las concentraciones de FSH determinados mediante la técnica de radioinmuno análisis (RIA)	27
Grafica 5.8	Correlación entre Proteína y FSH en escala logarítmica base 10	28
Grafica 5.9	Se esquematiza la cantidad de proteína acumulada liberada en 96 horas. La línea azul representa las concentraciones acumuladas determinadas por RIA, mientras que roja los valores de proteína.	29
Cuadro 5.2:	Se resumen los miligramos y porcentajes de proteína y FSH incluidos y recuperados	29
Grafica 5.10:	Se esquematizan las concentraciones de proteína liberada de los comprimidos de PLGA que no contenían hormona n=4	30

## RESUMEN

La superovulación se ha utilizado para obtener un mayor desarrollo folicular, mas ovulaciones y mayor cantidad de embriones por ciclo. Los tratamientos para lograr superovulación se han desarrollado con base en la vida media de la hormona utilizada, de tal manera, los protocolos cuya base es la Hormona Folículo Estimulante (FSH) requieren de varias aplicaciones diarias a lo largo del tratamiento, ya que tiene una vida media entre 2 y 5 horas. La necesidad de múltiples aplicaciones hace su uso difícil en muchas especies y ocasiona una variación en la respuesta al procedimiento, asociada principalmente a la múltiple aplicación de la hormona. En el presente trabajo se desarrolló un sistema que permitirá la administración controlada de la FSH durante 96 horas. Se elaboraron comprimidos conteniendo FSH (Folltropin-V) y el copolímero ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) a distintas relaciones. La determinación de proteína liberada por el comprimido se realizó de forma indirecta, mediante la prueba de Bradford y posteriormente directamente por RIA. En la proporción (FSH/PLGA) 1:500 se observó una liberación de proteína durante más de 96 horas, pero de forma poco regular. La concentración de FSH fue paralela a la concentración de proteína. La poca regularidad presentada en liberación de la proteína y FSH, podría deberse al tipo de polímero usado o la hidrólisis del mismo, así como la interacción proteínas-polímero. Los comprimidos elaborados en el presente estudio podrían lograr la administración de FSH reduciendo el manejo en los animales, ocasionándoles menor estrés y con ello mejorando la eficiencia de los tratamientos.

## ABSTRACT

Superovulation technique has been used to obtain a larger follicular development, ovulation and embryos per-cycle. These superovulation treatments have been developed taking into account the half life of the used hormone, so this is that Follicle-stimulating Hormone (FSH) based protocols require of several daily doses to be taken daily through the whole treatment and this is due to the hormone's half life is just about between 2 and 5 hours. Several daily-taken doses make hard the usage of FSH treatments over some species and bring a variation on the procedure-response too, associated to the multiple hormone intakes mainly. The needle of multiple doses intake makes is to be hardly used over several animal species and provokes a variation on the answer to the procedure, associated to the hormone multiple intakes mainly. A 96 hours controlled administration system has been developed in this work. FSH contained (Folltropin-V) scaffolds and the Poly-Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) at different concentrations were made. The protein release determination was made by indirect measure with the Bradford taste and by direct measure with RIA test. In a 1:500 (FSH/PLGA) proportion, a longer 96 hours releasing period of time was registered but in a non-regular way. The FSH concentration was parallel to the proteins concentration. It was observed non regular protein release in 96 hours period of time on a 1:500 (FSH/PLGA) proportion. The FSH concentration got to be parallel to the protein concentration. The non regular release of the protein and the FSH could be caused due to the nature of the used polymer and / or its hydrolysis and also due to the protein-polymer interaction. The elaborated scaffolds in the present could lead us to a less animal manipulation by the FSH administration, reaching less stress levels on them hence, reaching a higher treatment efficiency.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Durante varias décadas se ha utilizado la superovulación para obtener una mayor cantidad de ovocitos por vaca, con diversos fines como por ejemplo fertilización *in vitro* o transferencia de embriones. Con el fin de lograr el aumento en la tasa de ovulación han sido diseñados diversos programas de suplementación hormonal, en los cuales se ven involucrados tratamientos hormonales con gonadotropinas tanto hipofisarias, Hormona Folículo Estimulante (FSH), y no hipofisarias, como la Gonadotropina Corionica Equina (eCG). (Jimo et al., 1995; Lucy, 2007; Mojtaba et al., 1997; Bo et al., 1994), y en algunos casos se ha recurrido al uso de la gonadotropina menopáusica humana (hMG) (Murphy et al., 1984).

Los tratamientos de superovulación se han desarrollado con base en la vida media de la gonadotropina utilizada. Los métodos que implementan el uso de la eCG solo requieren de una aplicación gonadotrófica y reducen la manipulación de los animales, debido a que su vida media es de hasta 40 horas. Sin embargo, su tasa de eliminación es muy lenta, esto da como resultado un estímulo prolongado en los ovarios, de hasta 5 días y su utilización genera una alta producción de estrógenos con baja calidad de embriones (Foote, 1998). Los protocolos cuya base es la FSH requieren de varias aplicaciones diarias durante el tratamiento, dado a que tiene una vida media entre 2 (Ulloa-Aguirre et al., 1995) y 5 horas, lo que puede ocasionar una variación en la respuesta al tratamiento. (Demoustier et al., 1988). Entre los factores más comunes que afectan una adecuada respuesta a la superovulación están las ocasionadas por las múltiples aplicaciones, las variaciones en las dosis, así como la irregularidad en los horarios de aplicación. Aunado a ello está la presentación del estrés ocasionado en los animales tratados por el excesivo manejo. A pesar de estos inconvenientes, los embriones colectados de los tratamientos que utilizan a la FSH para estimular los ovarios son de mejor calidad en comparación con los embriones producidos con los protocolos que utilizan a la eCG para inducir el desarrollo folicular (Foote, 1988).

Por esta razón es deseable desarrollar nuevas tecnologías para la administración de la FSH. La administración de FSH en forma continua ha logrado el reclutamiento y ovulación de folículos reduciendo la dosis de gonadotropinas utilizadas. Una manera de lograr liberación continua es con el uso de las bombas osmóticas de liberación controlada,

algunas de las cuales tienen el inconveniente de ser consideradas invasivas, ya que es necesario realizar una incisión tanto para la colocación como para el retiro del producto. (Desaulniers et al., 1995; Echterkamp, 1992; Mapletoft et al., 2002; P.A. Fowler et al., 1997).

Con la aparición de los polímeros de ácido poli-láctico (PLA), el ácido poli-glicólico (PGA) y el copolímero de estos dos (PLGA), los cuales han demostrado buenas propiedades de biocompatibilidad y de biodegradación, (Albertsson et al., 2003), se han diseñado nuevas herramientas para la administración controlada de fármacos que presentan una vida media corta y una tasa de eliminación de orden cero (Menemşe et al., 1999; Santoveña et al., 2003). Las propiedades y características de los polímeros permiten realizar sistemas de liberación controlada que administran y mantienen niveles terapéuticos de la FSH, evitando con ello las múltiples aplicaciones de los protocolos establecidos. El objetivo de este trabajo es elaborar el copolímero de PLGA conteniendo FSH, en un implante para la liberación prolongada de la hormona.

## **2.0 HIPÓTESIS**

El comprimido de Hormona folículo estimulante (FSH) con Acido poly-lactico-co-glicolico (PLGA) libera al compuesto (FSH) de manera constante y prolongada.

### **3.0 Revisión de literatura**

#### **3.1 Hormonas Glicoproteicas**

La hipófisis está formada por la neurohipófisis (parte posterior), la adenohipófisis (parte anterior) y en algunas especies por la hipófisis intermedia. La neurohipófisis está constituida principalmente por terminaciones nerviosas provenientes del hipotálamo (núcleo paraventricular y núcleo supraóptico). En la adenohipófisis se encuentra los gonadotropos. Los gonadotropos son células basofilas (Cheung et al., 2007), que sintetizan a la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Fares, 2006; Cheung et al., 2007).

La FSH y LH pertenecen a la familia de las glicoproteínas al igual que la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) (Cheung et al., 2007), la Gonadotropina Coriónica equina (eCG) y la humana (hCG). La TSH, FSH y LH se sintetizan en la adenohipófisis, mientras que eCG y hCG son sintetizadas en la placenta (Fares, 2006). Estas glicoproteínas son termolábiles y están formadas por una subunidad  $\alpha$  (alfa) y una subunidad  $\beta$  (beta) unidas por enlaces no covalentes (Ulloa-Aguirre et al., 1995).

##### **3.1.1 Subunidad alfa ( $\alpha$ )**

Las gonadotropinas poseen la misma secuencia de aminoácidos en la subunidad  $\alpha$ , esto se debe a que la cadena primaria es codificada por un mismo gen (Green et al., 1985). En el caso de la FSH la subunidad alfa está compuesta de 92 aminoácidos (aa) en los humanos y de 96 aa para las otras especies de mamíferos (Ulloa-Aguirre, et al., 1998), teniendo una homología mínima del 80% entre especies (Knobil, 1998; Sairam et al., 1985). La subunidad alfa tiene una participación muy importante al momento de transmitir la señal biológica al receptor (Sairam et al., 1985).

##### **3.1.2 Subunidad beta ( $\beta$ )**

La subunidad  $\beta$  es producida por un gen específico para cada hormona, por ejemplo el gen que codifica la secuencia beta de la FSH humana reside en el cromosoma 11p13, el cual genera una secuencia de 111 aminoácidos en los mamíferos (Ulloa-Aguirre et al., 1998; Cheung et al., 2007). Esta diferencia en la secuencia de aminoácidos, aunada

a los diferentes patrones de glicosilación de cada hormona, proporcionan las propiedades biológicas que caracteriza a cada una de las hormonas glicoprotéicas (Samaddar et al., 1997).

### **3.1.3 Estructura Tridimensional de las subunidades**

Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  presentan dentro de su estructura la formación de puentes de disulfuro, lo que confiere la estructura tridimensional de las subunidades. La subunidad  $\alpha$  presenta 5 enlaces, mientras que en la subunidad  $\beta$  se han observado de 2 a 6 puentes de disulfuro (Fares, 2006), dependiendo de la glicoproteína. En el caso de la FSH la subunidad  $\beta$  de la FSH presenta 6 puentes de disulfuro (Ulloa-Aguirre et al., 1998).

### **3.1.4 Glicosilación de la FSH**

La Glicosilación es un proceso químico que consiste en adicionar una o varias cadenas de carbohidratos a otra molécula, en este caso a las proteínas. Este evento da inicio en el retículo endoplasmático rugoso con la transferencia de un oligosacárido unido a una asparginina (Ulloa-Aguirre et al., 2001).

Las cadenas de azúcar presentes en las glicoproteínas se pueden clasificar en dos grupos, N-acetilgalactosamina que está unido al grupo hidroxilo, de una serina o treonina, a los que se les conoce como O-oligosacáridos. El otro grupo de azúcares se llama N-oligosacáridos, los cuales contienen un N-acetilglucosamina y está unido a un grupo amida de una asparginina (ASN) de un polipéptido en su porción terminal (Green et al., 1985).

La subunidad alfa de la FSH presenta dos secuencias de oligosacáridos-ASN de ácido sialico ubicados en la posición 52 y 78 (Zion et al., 1998; Smith et al., 1988; Ulloa-Aguirre et al., 2001). La subunidad beta presenta variaciones según la especie, en el caso de la FSH humana presenta dos cadenas de N-oligosacáridos en la posición 7 y 24 (Zion et al., 1998; Ulloa-Aguirre et al., 2001; Fares, 2006) y no presenta cadenas de O-oligosacáridos, mientras que en la FSH bovina si están presentes ambas cadenas de oligosacáridos (Green et al., 1985).

Las estructuras de oligosacáridos en las hormonas glicoproteicas juegan un papel fundamental en muchas de las características funcionales de la molécula. Son importantes no sólo para el plegado, montaje y conformación de la molécula, sino también para la secreción heterodimérica, destino metabólico y la interacción con su receptor (Ulloa-Aguirre et al., 2001; Ulloa-Aguirre et al., 1988)

### **3.1.5 Secreción de FSH**

A diferencia de la secreción de LH, la cual está directamente controlada por la GnRH (LHRH), la secreción de FSH está regulada por un doble mecanismo, el primero de ellos se encarga de controlar la secreción basal (secreción constitutiva), mientras otro mecanismo estará encargado de controlar la secreción pulsátil. Una porción sustancial de la secreción de FSH es secretada de forma constitutiva, la cual parece ser dictada por la disponibilidad de RNAm para la porción beta de la FSH (FSH $\beta$ ), lo cual se traduce en FSH (Padmanabhan et al., 2002).

La liberación de FSH no asociada a GnRH es modulada por la activina, inhibina y follistatina. Originalmente se pensó estas hormonas que únicamente eran producidas en las gónadas (ovario y testículo), sin embargo hay evidencia de su síntesis a nivel de la hipófisis (Padmanabhan et al., 2001; Phillips, et al., 2005; Garverick et al., 2002).

La activina estimula la secreción de la hormona folículo estimulante, mientras que la inhibina y la follistatina la inhiben. Padmanabhan et al., (2001) menciona que la activina juega un papel importante en la regulación en síntesis de la FSH, aun más importante que el de la GnRH, ya que promueve la producción de RNAm para la FSH $\beta$ . Por otra parte, se ha observado que la follistatina suprime la secreción de FSH, hasta en un 48%. Los efectos de la follistatina están mediados a través de un mecanismo específico en la pituitaria, el cual reprime la de la activina de una forma directa, sin intervenir en la secreción de GnRH. La acción ejercida por la follistatina se ve reflejado en la poca disponibilidad de la activina a nivel periférico (Padmanabhan et al., 2002). La forma en que actúa la follistatina resulta de su alta afinidad por la activina, neutralizando por completo su acción, por lo tanto la activina sólo estará activa cuando no está unida o limitada por la acción de la follistatina. (De Kretzer et al., 2002)

Finalmente, la inhibina provoca un retraso en la secreción de FSH, por que la inhibina se una a receptores de la activina, actuando como antagonista, aunque con una menor afinidad (Padmanabhan et al., 2001b; Padmanabhan et al., 2002).

### **3.1.6 Vida media de la FSH**

A lo largo de la vida reproductiva de un individuo se van secretando diversas isoformas de FSH (Zaidi et al., 1981). Esta diversidad de la hormona se basa en la cantidad de ácido siálico presente en la molécula, cual estará regulada por las concentraciones de estradiol (E2) en sangre, posiblemente por los niveles de GnRH. Durante la etapa reproductiva, cuando las concentraciones de E2 son altas, la molécula de FSH es menos glicosilada, lo que dará origen a isoformas básicas (Castro-Fernández et. al, 2000). Niveles bajos de E2 permiten una mayor glicosilación, originando formas acidas de la FSH. (Zion et al., 1998; Padmanabhan et al., 2001b). La vida media de la FSH en plasma estará en función de su glicosilación. Las formas básicas tendrán una vida media más corta, pero con mayor afinidad al receptor, en cambio las formas acidas tendrán una vida media más prolongada y menor afinidad hacia el receptor (Zion et al., 1998; Padmanabhan et al., 2001b).

### **3.1.7 Función de la FSH**

La FSH está involucrada en diversos eventos esenciales para la reproducción. Su secreción y acción coordinada permite un control preciso de la función ovárica y testicular. La FSH actúa sobre las células de la granulosa y células de sertoli promoviendo la síntesis de estrógenos y varios factores no esteroideos que participan en la gametogénesis (Ulloa-Aguirre et al., 2001).

Durante el ciclo estral de bovinos y pequeños rumiantes, se presentan de dos a cuatro oleadas foliculares. Cada oleada se inicia por un aumento en la concentración plasmática de la FSH, este incremento estimula a un grupo de folículos, conocidos como antrales, para que continúen con su desarrollo hasta que cambian su dependencia a LH (Hampton et al., 2004). Durante este lapso de tiempo, la FSH tiene una participación importante dentro de los folículos induciendo la diferenciación y proliferación celular (Zion

et al., 1998,)), principalmente sobre las células de la granulosa, induce la síntesis de p540 aromatasa, para transformar la testosterona en estradiol, (Stocco, 2001). A su vez, los esteroides gonadales ejercen efecto de retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis, suprimiendo la liberación de FSH de la glándula pituitaria (Padmanabhan et al., 2001b; Holzer et al., 2006).

### **3.2 Superovulación**

El objetivo de la superovulación en el ganado es producir y obtener la mayor cantidad de ovocitos o embriones viables, que cuenten con las características necesarias para que logren sobrevivir y den origen a gestaciones que puedan llegar a término (Mapletoft et al., 2002; Bo et al., 1994). Para alcanzar este fin se han desarrollado diversos tratamientos, los cuales consisten en la administración de gonadotropinas (Son et al., 2007; Yamamoto et al., 1994) o sustancias que imiten su función (Yamamoto et al., 1994). Tradicionalmente, los esquemas de superovulación han utilizado la FSH o la eCG (Son et al., 2007).

La eCG es una gonadotropina, de origen placentario (Allen, 2001), con mayor cantidad de hidratos de carbono que la FSH, por lo que su vida media es de hasta de 40 horas (Jimo, 1995). Su larga vida media permite que una sola aplicación de eCG sea suficiente para lograr superovulación. No obstante, debido a su vida media tan larga, la utilización de eCG provoca una continua estimulación a nivel ovárico, ocasionando la producción de altos niveles de estradiol, generando que algunos folículos no sean ovulados o se liberen de forma prematura (Foote, 1988). Las alteraciones endocrinas causadas por la eCG, ocasionan que los embriones obtenidos generalmente sean de baja calidad. Los estrógenos promueven un acelerado transporte de los embriones, originando que sean expulsados al útero, en condiciones poco óptimas para el desarrollo (Son et al., 2007; Driancourt et al., 1991; Mejía et al., 2000). Para tratar de neutralizar o minimizar la constante estimulación por parte de la eCG al ovario, se ha implementado la administración de anticuerpos contra eCG 24 horas después del pico preovulatorio del LH. Sin embargo su limitante es que el momento en el que se dará la elevación de LH no es fácilmente predecible (Dieleman et al., 1993). Debido a los pobres resultados que se presentan con la administración de la eCG, se prefiere utilizar FSH de extracto pituitario para llevar a cabo los esquemas de superovulación (Driancourt et al., 1991).

El uso de la eCG causa activación prematura los ovocitos asociados con los perfiles anormales en la síntesis de proteínas en comparación con los tratamientos que utilizan FSH (Mejía et al., 2000).

Para realizar la estimulación ovárica con FSH se requieren de dos aplicaciones diarias con intervalos de 12 horas, (Jimo et al., 1995; Bo et al., 1994; Yamamoto et al., 1994), y durante un periodo de 3, 4 o 5 días, en dosis decrecientes. El uso diario de dos inyecciones resulta muy costoso e implica un manejo excesivo de los animales, y puede dar lugar a errores en la dosificación y estrés en las hembras que serán tratadas (Yamamoto et al., 1994; Bo et al., 1994).

La respuesta por parte del ovario a estos tratamientos estará mediada por diversos factores, entre los que se encuentran el día del ciclo estral en el que se inicio el tratamiento, la cantidad de gonadotropina administrada y la pureza de la hormona (Bo et al., 1994). El uso de dosis excesivas de FSH puede inducir problemas similares a los que se han visto con la eCG (Foote, 1988). Entre los principales problemas observados en tratamientos con dosis alta de FSH se encuentran la formación de cuerpos lúteos de vida media corta y la baja fertilidad, producto de las alteraciones del ambiente uterino que dificultan el transporte de gametos o embriones (Mejía et al., 2000). Todo esto se verá reflejado en la respuesta al estímulo ovárico el cual será medido en el número de ovocitos obtenidos

Cuadro 1.1, se hace un análisis de algunos efectos de la eCG en comparación con la FSH, en los tratamientos de superovulación (adaptado de Foote y Ellington 1988).

<b>Características</b>	<b>Tipo de tratamiento</b>	
	eCG	FSH
Folículos ovulados prematuramente	14%	9%
Folículo tamaño	Por arriba de lo normal	Por arriba de lo normal
Síntesis anormal de proteínas foliculares	30%	7%
Esteroides	Incrementado	Sin cambios
Porcentaje de suero fuera del rango normal	38%	53%
Disminución del pico normal de LH	26%	7%

Es importante considerar que la inducción de la ovulación puede dar lugar a una pobre tasa de gestación, debido a la asincronía entre el desarrollo embrionario y el ambiente uterino, lo que resulta de una secreción de estradiol por arriba de los niveles fisiológicos (Mejía et al., 2000; Turker, 1996).

### **3.3 Generalidades de los polímeros**

En la década de 1960 se inició la investigación y el uso de los polímeros y copolímeros para aplicaciones médicas, conocidos como biomateriales, que son productos que están en contacto con los sistemas biológicos. Dentro de los biomateriales podemos considerar los materiales que están presentes en aplicaciones como: marcapasos, suturas, grapas, etc. Los termoplásticos resultaron candidatos idóneos para su uso en la medicina ya que presentaban buenas características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y fuerza mecánica. Las materias primas como los poliésteres sintéticos fueron adoptados e implementados en la industria farmacéutica, donde se les han dado diversos usos dentro de los que se encuentran la elaboración de sistemas que permitan la administración modulada de fármacos (Albertsson et al., 2003), es decir, que al ser introducido este sistema a un organismo vivo inicie la liberación de un principio activo durante un determinado tiempo. La liberación del fármaco estará mediada por diversos factores entre los que se encuentran la forma física, las dimensiones, la consistencia del implante, el peso molecular del polímero o copolímeros, la cantidad del fármaco utilizado (Santoveña et al., 2003), así como la degradación del mismo. Tomando en cuenta estas consideraciones se han desarrollado diversos métodos para lograr una adecuada administración de los principios activos, entre los más importantes se cuentan los implantes a base de polímeros, tanto, biodegradables como no biodegradables. Dentro de los no biodegradables se encuentran el copolímeros de acetato de etilen-vinil y el silicón, con los cuales se construyen sistemas tipo matriz para la liberación de fármacos. Mientras que por parte de los biodegradables se encuentran los hidrogeles, los polímeros naturales, así como termoplásticos derivados de las lactonas, entre los que resaltan el ácido Láctico (PLA), ácido Glicólico (PLG) y la E poli-caprolactona (Sinha et al., 1998), así como los copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, el cual es conocido como poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (Tapia, 2007).

### 3.3.1 Métodos de polimerización

El poliéster inicia su formación cuando el monómero en su estructura cíclica, el cual el estado inicial del monómero, reacciona con compuestos organometálicos, los cuales actúan como catalizadores o iniciadores y producen la apertura del anillo (ROP) y ocasionan un reordenamiento de los electrones que conforman el monómero, insertando un radical. Esos radicales insertados son derivados de los metales pesados, que por su toxicidad deberán ser removidos antes de su uso, especialmente para polímeros con fines farmacéuticos y biomédicos. También existen enzimas naturales capaces de catalizar al poliéster que por su naturaleza no tóxica lo hacen un mejor candidato para la ROP de lactonas. El tipo de iniciador, así como el grupo final juegan un papel importante en la estabilidad térmica e hidrolítica del poliéster final. (Tapia, 2007; Albertsson et al., 2003).

El mecanismo de polimerización dependerá del tipo de iniciador. La coordinación-inserción, la reacción catiónica y aniónica son los tres mecanismos principales por el cual se puede dar inicio a la polimerización de ésteres. La reacción de lactonas se realiza generalmente en masa, en solución, en emulsión o dispersión. Se ha observado que los poliésteres de alto peso molecular sólo se han obtenido mediante el uso de reacciones aniónicas o por la polimerización por apertura del anillo coordinación-inserción (Albertsson et al., 2003; Tapia, 2007; Dove, 2008), ya que la polimerización por reacciones catiónicas son difíciles de controlar y por lo tanto de predecir su peso (Tapia, 2007).

### 3.3.2 Ácido poli-láctico (PLA)

El ácido láctico es una molécula quiral simple (Figura 1) que presenta dos enantiómeros, L-y D -ácido láctico lo que da origen a 3 formas isoméricas, la L-Lactida, D-Lactida y la combinación de ambos D,L- Lactida (Gupta et al., 2007).

El ácido Láctico se puede producir por dos vías, la primera es mediante la fermentación natural de la melaza, la fécula de papa o de dextrosa de maíz y la otra vía conocida es por medio de materias primas petroquímicas. La ruta petroquímica del ácido láctico es la mezcla racémica ópticamente inactivo de los isómeros de L y D. Actualmente, la ruta más popular es la fermentación, en la que el almidón de maíz se convierte en ácido láctico por acción de las bacterias, para lo cual se utiliza una cepa de

Lactobacillus (Gupta et al., 2007). Dentro de sus usos más comunes se emplea en ingeniería de tejidos como estructuras específicas para dirigir el crecimiento y diferenciación celular, así como transportador de fármacos (Chang-Sik et al., 2005).

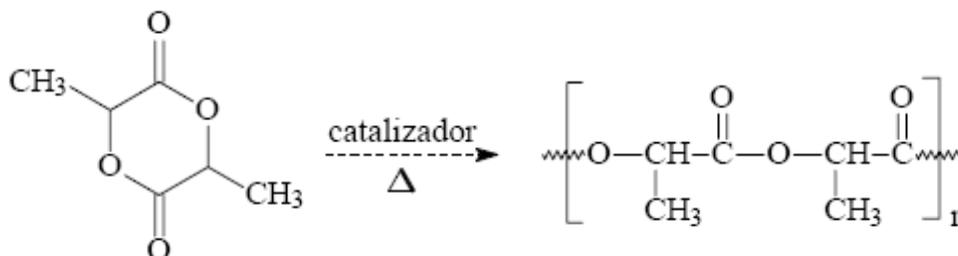


Figura 1: Esquema del Ácido Lactico. Lado Izquierdo se observa en su forma cíclica. Lado Derecho se observa en su forma lineal

### 3.3.3 Ácido poli-glicólico (PGA)

El ácido poli (glicólico) es una poliéster lineal alifático (Figura 2) altamente cristalino (45-55%) e hidrofílico de fácil degradación hidrolítica tanto *in vitro* como *in vivo*, presenta punto de fusión alto (220-225°C) y una baja solubilidad en disolventes orgánicos. Debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad este polímero y sus copolímeros se han estudiado para diversos fines entre los que destacan la liberación de fármacos y aplicaciones ortopédicas. El primer uso para aplicaciones médicas fue como suturas absorbibles, conocida comercialmente como Dexon y su degradación, generalmente, se realiza a través de un mecanismo heterogéneo. (Albertsson et al., 2003; Chang-Sik et al., 2005)

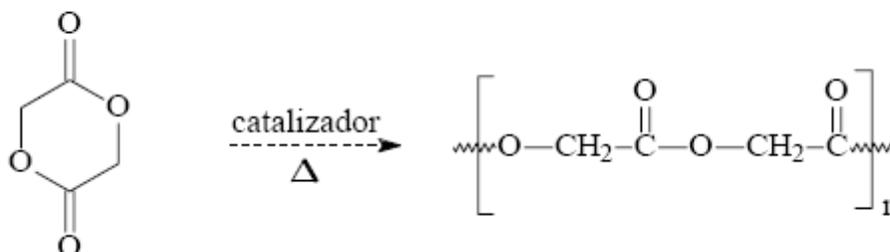


Figura 2: Esquema del Ácido Glicolico, Lado Izquierdo se observa en su forma cíclica. Lado Derecho se observa en su forma lineal

### **3.3.4 Ácido poli-(láctico-co-glicólico) PLGA**

La copolimerización es una técnica utilizada para modificar las propiedades de los polímeros iniciales dando como resultando polímeros que se ajustan a las necesidades previamente originadas (Tapia 2007). Entre los copolímeros más utilizados en la industria farmacéutica se encuentra el PLGA y por lo tanto es uno de los más estudiados (Chang-Sik et al., 2005).

Estos compuestos presentan variaciones en sus características, las cuales están directamente relacionadas con las proporciones de PLA y PGA presentes en el compuesto y el tipo de lactida utilizada. Es así, que un copolímero que contenga poly(L-Lactida) dará origen a un polímero cristalino, mientras que con una poly(DL-Lactida) dará origen a uno amorfo (Tapia 2007; Rodríguez 2007).

La morfología adquirida por los copolímeros es de gran importancia ya que determinará sus posibles usos. Entre los más comunes en la biomedicina están la elaboración de prótesis, piel artificial, implantes dentales, injertos vasculares, alfileres, tornillos de hueso, y placas de fijación de fractura interna temporal (Albertsson et al., 2003; Tapia 2007).

### **3.3.5 Degradación del Polímero**

La degradación de los polímeros o copolímeros es de gran importancia, ya que la cinética de la molécula encapsulada y la dosis liberada estará íntimamente relacionada con la erosión del comprimido. (Chang-Sik et al., 2007).

La degradación de los polímeros depende de muchos factores, entre los que se encuentran la superficie, el tamaño del comprimido, el peso molecular y la porosidad. También hay que considerar el tiempo de exposición al medio, la temperatura, el pH del medio donde se está llevando a cabo la degradación y los solventes residuales presentes (Huang et al., 2006; Frank, 2004; Pamula et al., 2008). Existen otras propiedades de gran importancia que intervienen en la degradación del polímero y consecuentemente en la liberación del fármaco, dichas propiedades son la temperatura de transición vítrea (Tg) y

la cristalinidad, sin embargo, la participación de la cristalinidad sobre la degradación de los polímeros no ha sido esclarecida en su totalidad (Frank 2004).

Existen dos tipos de degradación de manera natural de los poliésteres sintéticos, formas heterogénea u homogénea (Singh et al., 2007).

La degradación heterogénea, también llamada la erosión de superficie (Kotwal et al., 2007), se basa en la erosión de las superficies del comprimido provocado por las condiciones medioambientales en las cuales se encuentra. La degradación del núcleo del comprimido es relativamente baja (Anderson et al., 1997), o nula por lo que se mantiene la integridad química del polímero que no se encuentra en contacto con el medio (Singh et al., 2007). Este tipo de degradación es característica de los polímeros cuya morfología es altamente cristalina (Kotwal et al., 2007).

La degradación homogénea se produce de manera masiva, donde la erosión se lleva a cabo en todo el sistema de liberación y el agua penetra al comprimido, generando fragmentos de éste por la ruptura de los enlaces covalentes (Singh et al., 2007; Anderson et al., 1997)

El proceso de degradación *in vitro* de PLGA se divide en cuatro etapas, La fase I se caracteriza por la absorción de agua.

La fase II se observa un descenso brusco, pero constante, del peso molecular debido a la ruptura al azar de las cadenas, preferentemente de las uniones glicólico-glicólico en el centro de la matriz.

La fase III se caracteriza por la evidente pérdida de peso. La distancia entre las cadenas se incrementa originando poros que faciliten la salida de los grupos ácidos. La pérdida de peso junto con la difusión y la disolución es producto de la degradación del ácido en la solución.

La fase IV se caracteriza por la disminución en la cantidad de los poros o el colapso de estos, los cuales forman una especie de red. (Huang et al, 2006).

Huang et al. (2006) observaron que los copolímeros de PLGA, inician su hidrólisis en los segmentos ricos en ácido glicólico, es decir, tiene predilección por segmentos donde hay dos ácidos glicólicos unidos. (Huang et al, 2006), Esto se debe a que el ácido

glicólico es más hidrofílico con respecto al ácido láctico, razón por la cual los copolímeros que tienen una mayor proporción de ácido glicólico sufren una degradación más rápida, comparativamente con el ácido láctico. (Huang et al., 2006; Houchin et al., 2008)

### **3.3.6 Liberación del Fármaco**

La liberación del fármaco puede ocurrir de tres formas dependiendo del tipo de unión entre los polímeros y el principio activo, las cuales se describen a continuación:

- El principio activo que se adjunta covalentemente a la estructura central del polímero es liberado por una hidrólisis entre los enlaces que unen al fármaco con la estructura del polímero (Kotwal et al., 2007; Sinha et al., 1998).
- Cuando el fármaco está rodeado por una membrana biodegradable, la liberación del principio se da activo se da mediante la erosión de la membrana polimérica. Al mismo tiempo, el fármaco puede difundir hacia fuera del dispositivo (Kotwal et al., 2007; Sinha et al., 1998).
- Finalmente, cuando el principio activo está disperso de forma homogénea en un polímero biodegradable, la liberación se realiza por un mecanismo de difusión o por la erosión del polímero o por una combinación de ambas (Kotwal et al., 2007; Sinha et al., 1998).

### **3.4 Otros biomateriales absorbibles para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos**

El desarrollo de biomateriales ha sido un proceso en evolución. Muchos de los biomateriales en uso clínico originalmente no fueron diseñados para tales fines, sin embargo, los biomateriales fueron utilizados para resolver los problemas a los cuales se enfrentaban, es así que surgieron los materiales biodegradables para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos (Langer et al., 2003), entre los cuales se pueden destacar los siguientes:

### **3.4.1 Hidrogeles**

Los polímeros expandibles, que son insolubles en agua, se denominan comúnmente hidrogeles. (Sinha et al., 1998). Los Hidrogeles son estructuras hidrofílicas conformadas por enlaces cruzados de homopolímeros o copolímeros, los cuales son insolubles debido a la presencia de productos químicos (covalente o iónico), o la física de los enlaces cruzados, este último puede ser una mezcla de cristales o de la estructura de hidrógeno agregada que proporcionan una estructura de la red dando la integridad física del implante. Los hidrogeles han sido extremadamente útiles en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, principalmente por su alto contenido de agua, la similitud al tejido natural, así como su biocompatibilidad. Además han sido clasificados también como amorfo, semicristalino (Langer et al., 2003). Los hidrogeles más usados son la polivinil pirrolidona, los derivados de la celulosa y *polyethylene glycol diacrylate (PEGDA)*

### **3.4.2 Polímeros de origen natural**

Recientemente se han investigando los polímeros de origen natural para la elaboración de sistemas de liberación controlada de fármacos, tal es el caso del Chitosán [Chitosan,  $\beta$  (1,4) 2-amino-2-D-glucosa], es un biopolímero catiónico, el cual es el principal componente de las conchas de cangrejo y del camarón. El Chitosan ha sido usado en la biomedicina, ingeniería de tejidos y sistemas de liberación de fármacos, debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, y fácil degradación en el cuerpo por las enzimas como la lisozima y chitosan. Además de los geles y comprimidos, el chitosan ha sido utilizado para el tratamiento de las infecciones por hongos, mediante una aplicación por vía oral (Langer et al., 2003).

### **3.5 Determinación Hormonal**

Existen diversos métodos para definir la cantidad de hormonas presentes en una muestra. La confiabilidad con la que la prueba determina la concentración hormonal dependerá de la sensibilidad del método analítico implementado. Se han desarrollado diversas pruebas que permiten cuantificar la cantidad total de proteína de forma indirecta. Dentro de estos ensayos se encuentra la prueba de Bradford, el cual utiliza un colorante denominado azul coomasie como reactivo principal. El fundamento es la interacción del

reactivo con algunos aminoácidos, principalmente arginina y en menor medida con histidina, lisina, tirosina, triptófano y fenilalanina. Sin embargo, la medición de proteínas totales no se una indicación de la liberación de la proteína de interés. Por esta razón se emplearan métodos analíticos específicos, tales como radioinmunoensayo (RIA) y enzimoimunoensayo (EIA).

El método de RIA es altamente fiable y preciso, aunque tiene como inconveniente el uso de radioisótopos ( $I^{125}$ ), por tal motivo su uso queda restringido a laboratorios especializados. Entre los métodos no radiactivos se encuentran el EIA que incluso puede ser usado en pruebas de campo, sin embargo, ambas pruebas requieren la generación de anticuerpos específicos para cada proteína que se pueda medir (Prakash et al., 1999).

Estos métodos son de gran ayuda para la determinación de hormonas específicas de especie, tal es el caso de la FSH.

## **4.0 MATERIALES Y MÉTODOS**

Se desarrollaron 15 implantes de FSH y PLGA en 4 etapas, para lo cual se utilizó hormona folículo estimulante de extracto pituitario porcino (Folltropin-V; BIONICHE) y los copolímeros PLGA25G01 y PLGA35M05 con un peso molecular de 26 600, 39 600 Mn respectivamente y el copolímero P2191 con un peso molecular que oscila entre 40000 – 75000wt, celulosa 435244 y lactosa L3750 (Sigma-Aldrich)

### **4.1 Elaboración del comprimido**

El proceso para la elaboración de los comprimidos constó de 4 etapas: molienda, tamizado, mezclado y compresión

#### *4.1.1 Molienda*

Consistió en triturar cada uno de los reactivos que integran la formulación del comprimido, (polímero, celulosa, lactosa) con la ayuda de un molino analítico de cuchillas. Para el caso del polímero, éste se colocó dentro del contenedor del molino y se añadió un poco de nitrógeno líquido para endurecerlo y facilitar la molienda.

#### *4.1.2 Tamizado*

Se realizó un tamizado de los reactivos previamente molidos, para estandarizar el tamaño de partícula. Para la primera etapa se utilizó una malla con una abertura de 250 micras de diámetro, mientras que para las etapas posteriores (II a IV) fue utilizada una malla de 75 micras de diámetro, todo esto con la finalidad de que las partículas de los reactivos fueran las más semejantes a las partículas del liofilizado comercial de la FSH. (Anexo 1)

#### *4.1.3 Mezclado*

El mezclado de los componentes de los implantes, para el etapa I, se realizó en viales de plástico de 4ml, donde se introdujeron los reactivos, los cuales fueron incorporados de la siguiente forma: 20 vueltas al frente, 20 vueltas atrás, se colocó en el

vortex por 10 segundos, finalizando nuevamente con 20 vueltas al frente y 20 atrás, sobre su eje transversal. Para los implantes de los etapas II a IV el mezclado se hizo en viales de cristal, siguiendo la metodología antes descrita.

#### *4.1.4 Compresión*

La compresión se realizó en una prensa CARVER (Anexo2), teniendo variaciones en cada etapa, es así, que para el etapa I se aplicó una presión de 2 toneladas, utilizando punzones de acero inoxidable con un diámetro de 3mm. Para el etapa II, se usó una presión de 2 toneladas, usando punzones de 1.4 cm de diámetro, finalmente para los etapas III y IV se utilizaron los punzones de 3 mm de diámetro a una presión de 1 tonelada. En todas las etapas el tiempo de compresión fue de 10 segundos.

### **4.2 Pruebas de la liberación de proteína**

#### *4.2.1 Método de liberación in vitro*

Los implantes del etapa I fueron colocados en celdas horizontales de reflujo utilizando membranas de spetra/por de celulosa regenerada, las cuales contenían 3 ml de Solución Buffer de Fosfatos (PBS [NaCl1.5M,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>mM]) a un pH de 7.4 (Anexo 3, Foto1), mientras que para los implantes de la fase II a IV las liberaciones se realizaron en vasos termostatados (Anexo 3, Foto2), en un volumen de 15 ml de PBS 1N. Ambos tipos de celdas fueron alimentadas por un baño termostático de recirculación, con constante agitación magnética, que permitía mantener la temperatura de las celdas a 37.5°C

#### *4.2.2 Muestreo*

El muestreo inició en el momento de la colocación del implante en la celda de liberación (hora cero). Posteriormente se tomaron muestras cada 15 minutos durante las dos primeras horas, después se prolongó a cada 30 min por las dos horas subsecuentes, consecutivamente se tomaron muestras cada 60 min por dos horas más. Una vez concluido este periodo, se tomó una muestra cada dos horas hasta llegar a las 48 horas, y finalmente se tomó una muestra cada 12 horas hasta llegar a las 96 horas totales de muestreo.

### **4.3 Determinación hormonal de las muestras**

La cantidad de proteína contenida en las muestras fue determinada mediante el método de Bradford (Deutscher et al., 1990).

Para determinar el contenido real de FSH en las muestras obtenidas, se utilizó el método de RIA fase líquida, utilizando el kit comercial de la marca TUENRE, este kit contiene anticuerpo de conejo. El procedimiento de titulación se realizó bajo las condiciones descritas por el Tucker Endocrine Research Institute sin que se presentará un porcentaje de unión entre el anti-FSH.1 y la hormona radioyodada (tuenre.bFSH.ig). En función de estos resultados, se procedió a la titulación de acuerdo a las condiciones descritas en nuestro laboratorio (Perera et al., 2008).

### **4.4 Análisis estadístico**

La concentración proteínica de las muestras se estimó mediante una regresión lineal con efecto cuadrático de las absorbancias registradas durante la determinación de proteína total en la prueba de Bradford

Para estimar la correlación entre las concentraciones de proteína y FSH se realizó mediante el paquete estadístico SAS, donde se correlacionaron los miligramos de proteínas totales obtenidos con la prueba de Bradford y los nanogramos de FSH obtenidos con RIA

## 5.0 RESULTADOS

En el presente trabajo se desarrollaron 16 comprimidos con diferentes proporciones de Hormona Folículo Estimulante y Acido poli(láctico-co-glicólico), las cuales se resumen en el siguiente cuadro.

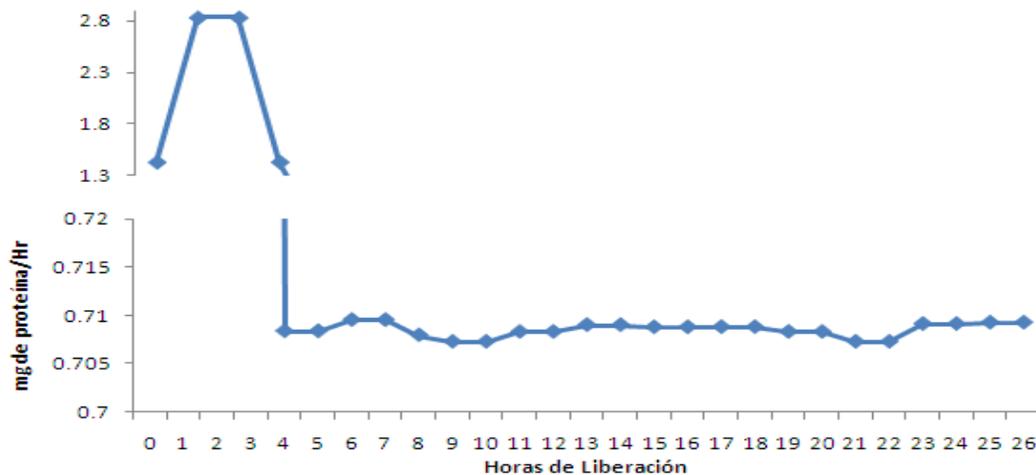
ETAPA	No de Comprimido	n	FSH (mg)	Polímero (mg)	Peso Molecular del polímero (Mn, *wt)	Celulosa (mg)	Lactosa (mg)
I	1	4	0.3	17.16	26 600	---	---
II	2	2	5	5	26 600	---	40
	3	2	5	5	39 600	---	40
	4	2	5	5	26 600	2.5	37.5
	5	2	5	5	39 600	2.5	37.5
III	6	2	5	10	26 600	---	2.5
	7	2	2.5	10	26 600	---	5
	8	2	5	10	26 600	---	10
IV	9	2	1	19	26 600	---	---
	9 <sup>a</sup>	2	1	19	39 600	---	---
	10	2	1	39	26 600	---	---
	10 <sup>a</sup>	2	1	39	39 600	---	---
	11	2	1	49	26 600	---	---
	11 <sup>a</sup>	2	1	49	39 600	---	---
	12	2	1	99	26 600	---	---
	13	2	0.5	139.8	26 600	---	---
14	2	0.5	224.7	39 600	---	---	
---	15	4	0.5	249.5	40-75 000*	---	---
---	16	4	---	20	26 y 39 000	---	---

Cuadro 5.1 Resumen de las proporciones y reactivos utilizados para cada uno de los comprimidos que conformaron cada a las diferentes etapas del presente trabajo.

### 5.1 Etapa 1

Durante esta etapa los comprimidos tenían una proporción hormona:polímero de 1:56, con el polímero con un tamaño de partícula de 250 micras de diámetro. El liofilizado de FSH fue difícil de estandarizar debido a que la presentación comercial presenta un tamaño de partícula muy pequeño que dificulta la medición del tamaño de partícula.

En la incubación de los comprimidos se observó liberación de proteína desde el inicio, los valores obtenidos oscilaban alrededor de los  $1.41 \pm 0.02$  mg que se mantuvieron hasta por 26 horas.



Grafica 5.1 Concentraciones puntuales de proteína recuperada durante la fase de liberación de los implantes cuyas proporción de hormona-polímero 1:57 (n=4).

Al finalizar el proceso de liberación, a las 26 horas se observó que el comprimido prácticamente conservo su forma original, mostrando una ligera erosión en las paredes.

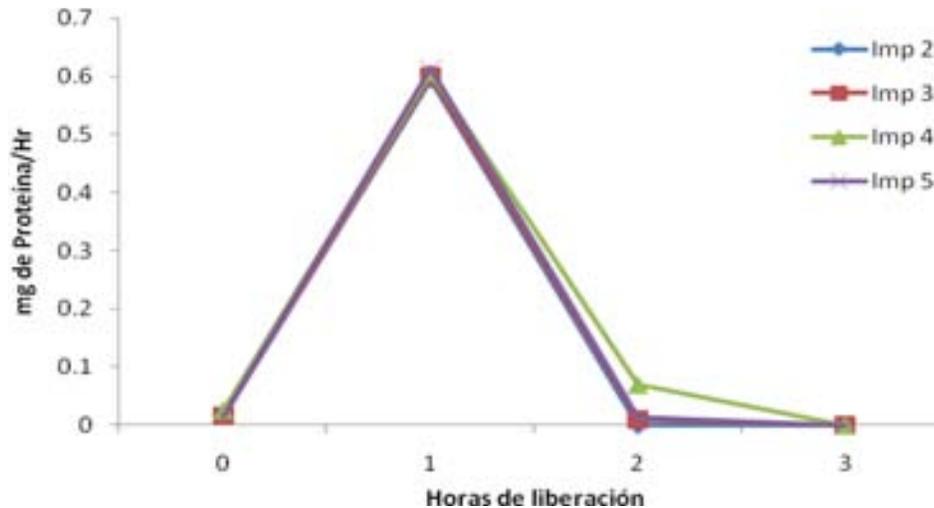
## 5.2 Etapa 2

Con base en los resultados obtenidos anteriormente se decidió modificar algunos factores, tales como el tamaño de partícula de los componentes, la presión utilizada en los comprimidos, el tipo de celdas de liberación utilizadas, la relación hormona:polímero, así como las características físico-químicas del polímero pudieron haber influido en la liberación de proteína de la etapa I.

Se observó una rápida desintegración de los comprimidos, posiblemente como resultado del uso de punzones de mayor diámetro, lo que dio origen a comprimidos con una mayor superficie de contacto al buffer. Además, la integración de la celulosa y lactosa como parte de la formulación permitió una mayor apertura de canales para la rápida

hidrolización del implante, apresurando su desintegración. Todo lo anterior pudo provocar que la proteína incluida en el comprimido fuera liberada durante los primeros 15 minutos.

Las concentraciones de proteína durante la primer hora alcanzaron un nivel promedio 0.645 mg, para posteriormente descender a concentraciones de 0 mg, lo cual se esquematiza en la gráfica 5.2.



Grafica 5.2: Representación grafica de las concentraciones de proteína liberada de los implantes de la etapa II, las líneas azul y roja representa al implante 2 (n=2) y 3(n=2) respectivamente, los cuales contienen FSH (10%), polímero (10%) y lactosa (80%). Mientras que las líneas verde y morada, representan a los implantes 4(n=2) y 5(n=2), que en su formulación contienen FSH (10%), polímero (10%), celulosa (5%) y lactosa (75%).

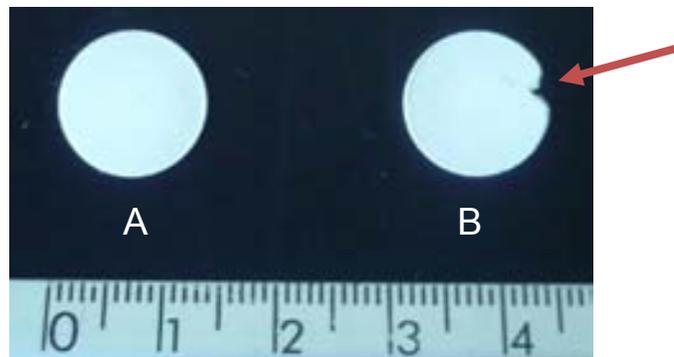


Figura 5.1. Implantes de la etapa II, A: FSH (10%), polímero (10%) y lactosa (80%), B: FSH (10%), polímero (10%), celulosa (5%) y lactosa (75%), la flecha señala el sitio de fractura.

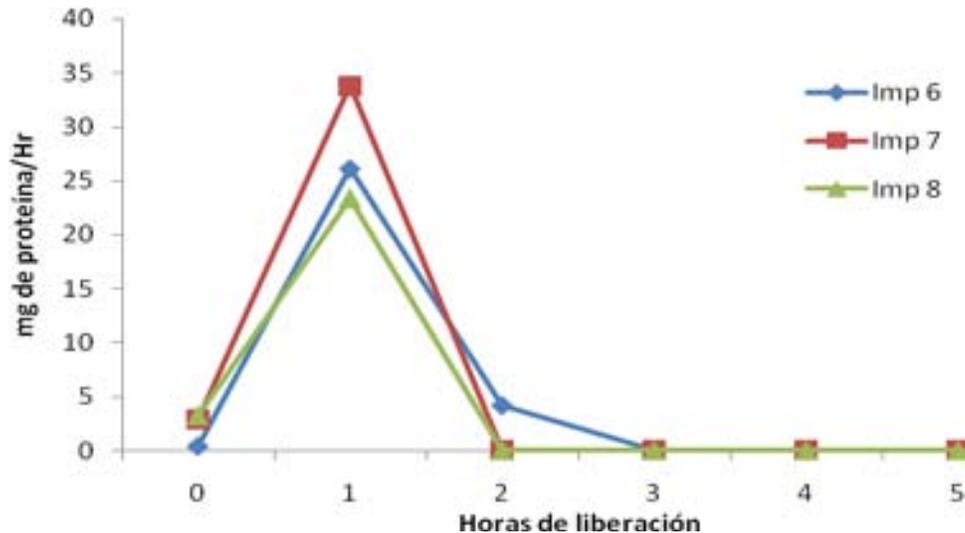
Dado que la inclusión de celulosa no resulto satisfactoria se decidió excluirla de la formulación, dando paso a la etapa 3 del desarrollo.

### 5.3 Etapa 3

La formulación de la etapa 3 estuvo conformada por la FSH, PLGA y Lactosa en 3 diferentes porcentaje de inclusión ( 14, 28 y 40 %). Para la compresión se utilizaron los punzones de 0.3cm de diámetro, para reducir la superficie de contacto con el medio y disminuir la velocidad de desintegración y usando una presión de 1 tonelada.

La concentración de proteica inicial fue de 2.16 mg para el tiempo cero, alcanzando niveles promedio de 27.76 mg en la primera hora, el implante 6 mostró concentraciones proteicas de 4.1mg para la segunda hora, descendiendo a niveles de 0 mg en la hora 3, en tanto, en los implantes 7 y 8 dejaron de liberar proteína en la segunda hora. La inclusión de Lactosa aceleró el proceso de desintegración del implante. Los comprimidos que contenían mayor cantidad de lactosa (implante 8) se desintegraron en 45 minutos, mientras que los comprimidos que contenían una cantidad menor de lactosa (implante 6), tardaron 75 minutos en desintegrarse (Grafica 5.3).

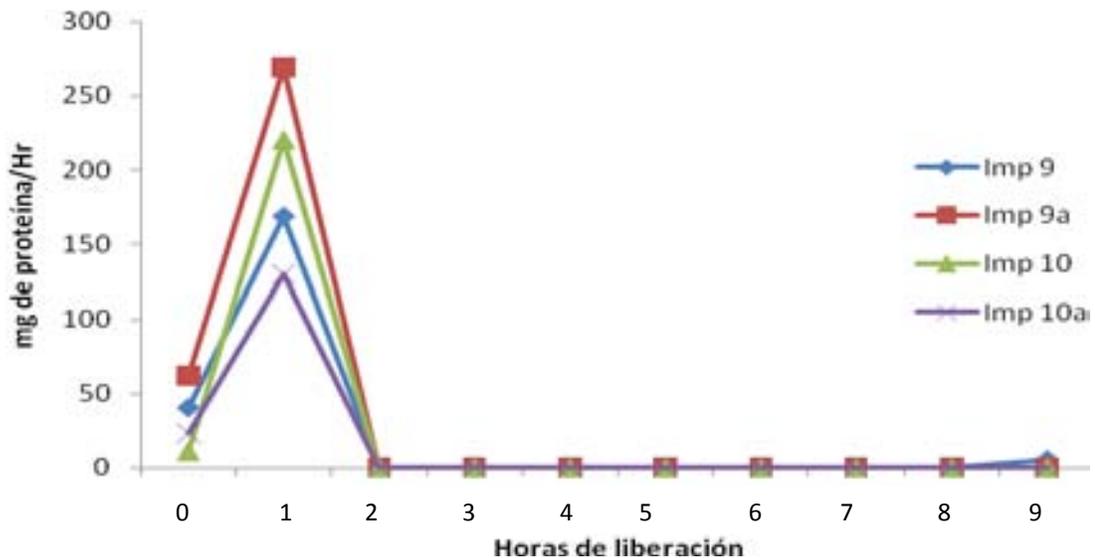
Con los resultados obtenidos se decidió reformular una vez más la composición de los implantes, dando lugar a la etapa 4.



Grafica 5.3 Se representa las concentraciones de proteína recuperadas durante la fase de liberación de los implantes de la etapa 3, la línea azul representa al implante 6(n=2) el cual contenía 14% de lactosa, 24% de FSH y 57% polímero; la línea roja representa al comprimido 7(n=2), cuyo contenido de lactosa era del 28%, 14% de FSH y 57% polímero y finalmente el implante 8(n=2) está representado por la línea verde, este comprimido contenía el 20% de FSH, 40% polímero y 40% de lactosa de inclusión

## 5.4 Etapa 4

En esta etapa se excluyeron adyuvantes por lo que los comprimidos estaban conformados únicamente por el copolímero y FSH. Esta etapa estuvo dividida en 4 fases, la división se hizo con base en las proporciones de hormona-polímero y facilitar su análisis. En la fase 1 de la etapa IV, los comprimidos contenían una proporción 1:20 (implantes 9), 1:40(implantes 10) de FSH : polímero. Para el primer caso, la concentración de proteína inicial se encontraba en los 51.30 mg, logrando la máxima liberación en la hora 1 con un nivel de de 218.83 mg para una de recuperación de 272.4 mg, mientras que en el segundo caso, los niveles iniciales eran de 17 mg en la hora 0, liberando toda la proteína en el transcurso de la primer hora, con concentraciones de 174.97 mg, logrando una recuperación total de 192.13 mg. (Grafica 5.4).



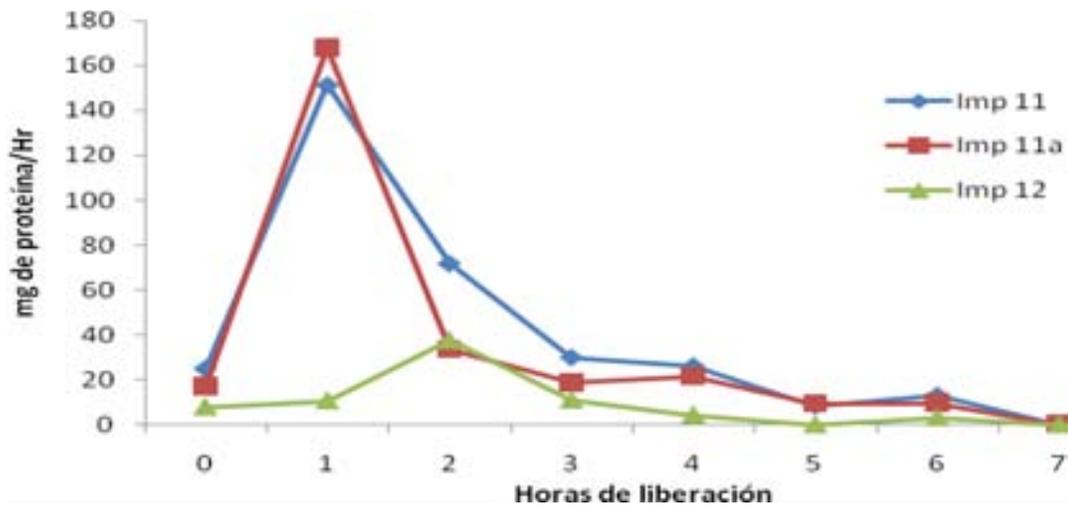
Grafica 5.4: Concentraciones de proteína determinada de los comprimidos de la etapa IV de la fase I, las líneas azul y roja representa a los implantes 9(n=2) y 9a(n=2) respectivamente, cuyas proporciones de inclusión eran de 1:20 (hormona:polímero). Las líneas verde y morada representan a los implantes 10(n=2) y 10a(n=2), cuyas proporciones eran de 1:40.

Dado el corto tiempo de liberación, se incrementó la cantidad de PLGA para retrasar la salida de la hormona.

En la segunda fase de esta etapa se diseñaron comprimidos con una proporción de 1:50 y 1:100.

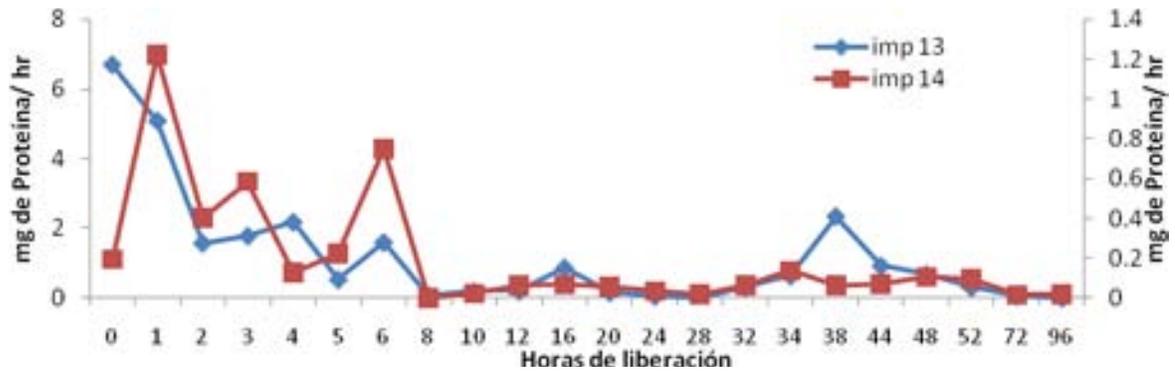
Los comprimidos con una proporción de FSH:PLGA de 1:50 liberaron proteína en concentraciones de 20 ug en la hora cero y observando un pico en la hora uno con una concentración promedio de 159.83 ug, para posteriormente descender de forma paulatina, manteniéndose en niveles promedios de 17 ug hasta las 6 horas.

Por otra parte, los comprimidos cuya proporción Hormona:PLGA fue de 1:100, tuvieron un comportamiento irregular, observándose proteína durante los primeros 15 min, descendiendo a niveles de 0 del minuto 30 al 60 y elevándose a partir del minuto 75 hasta mostrando proteína hasta las 6 horas para finalmente descender a 0 mg/ml. (grafica 5.5).



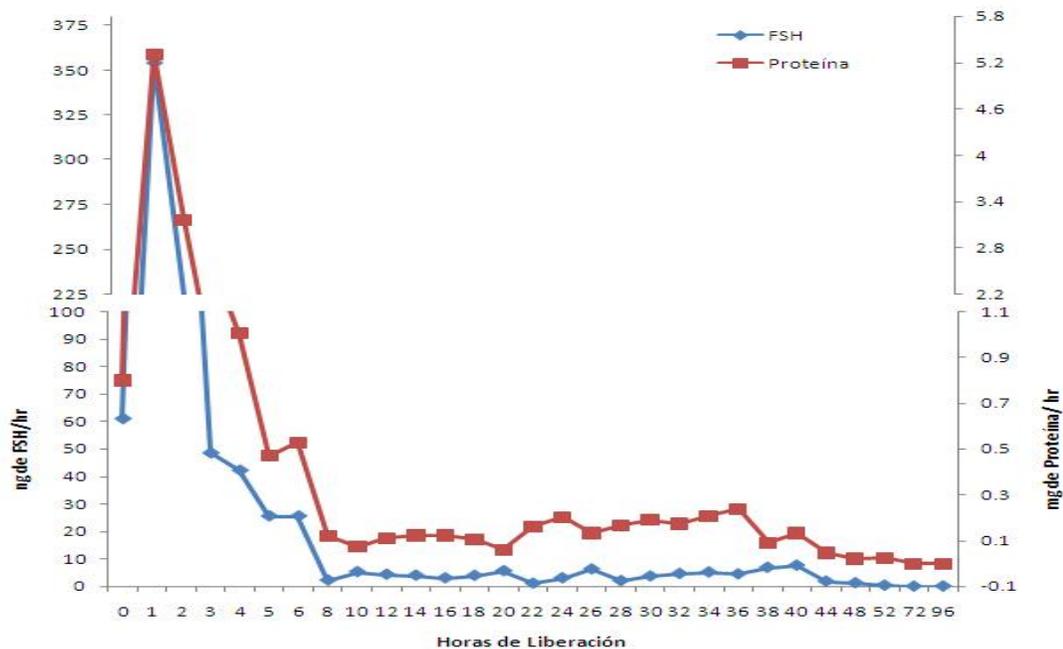
Grafica 5.5 Representación grafica de los valores puntuales de proteína recuperada de los implantes de la etapa IV de la fase II, donde las líneas azul y roja representa a los implantes 11 y 11<sup>a</sup>(n=2) respectivamente, cuyas proporciones de inclusión eran de 1:50 (hormona:polímero). Las líneas verde representan a los implantes 12(n=2), cuyas proporciones eran de 1:100.

En la fase III de la etapa IV (implantes 13 y 14), Se realizaron comprimidos cuyas composiciones de hormona:polímero son: 1:280 y 1:449, respectivamente. Se detectaron niveles bajos de de proteína, entre 0.5 y 0.2 mg, de forma irregular durante 96 horas. Las cantidades de pro teína de r ecuperada fueron 5 veces más de lo i ncluido para l os implantes numero 13 y 3 veces más para los comprimidos número 14 como se aprecia en el cuadro 2. (grafica 5.6).



Grafica 5.6 Concentraciones de proteína recuperada de los implantes de la etapa IV de la fase III, la línea azul esquematiza el comportamiento del implante 13, cuyas proporción de hormona-polímero eran de 1:140(n=2). Las líneas roja representan al implante 14(n=2), cuyas proporciones eran de 1:225.

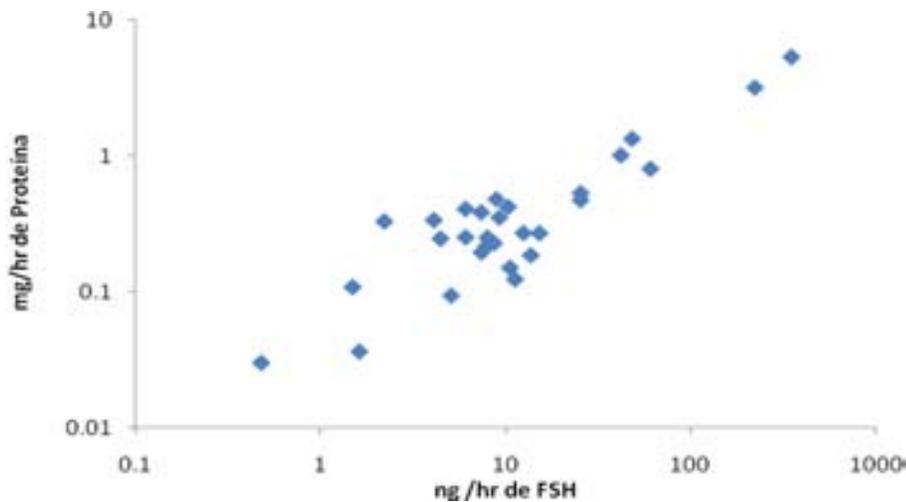
Finalmente, tras los resultados obtenidos en las etapas anteriores, así como en las diferentes fases de esta etapa, se desarrollaron comprimidos con una proporción de 1:500, los cuales mostraron liberación de proteína durante 96 horas, que oscilaban entre 5.25 y 0.15 mg/hr, siendo hasta este momento la mejor opción para la liberación de FSH a dosis bajas.



Grafica 5.7 Esquema de las concentraciones liberación de proteína y FSH de los implantes cuyas proporción de hormona-polímero fueron de 1:500(n=4), la línea roja representa las concentraciones puntuales de proteína recuperada medida con el reactivo de Bradford (BF). La línea azul muestra las concentraciones de FSH determinados mediante la técnica de radioinmuno análisis (RIA).

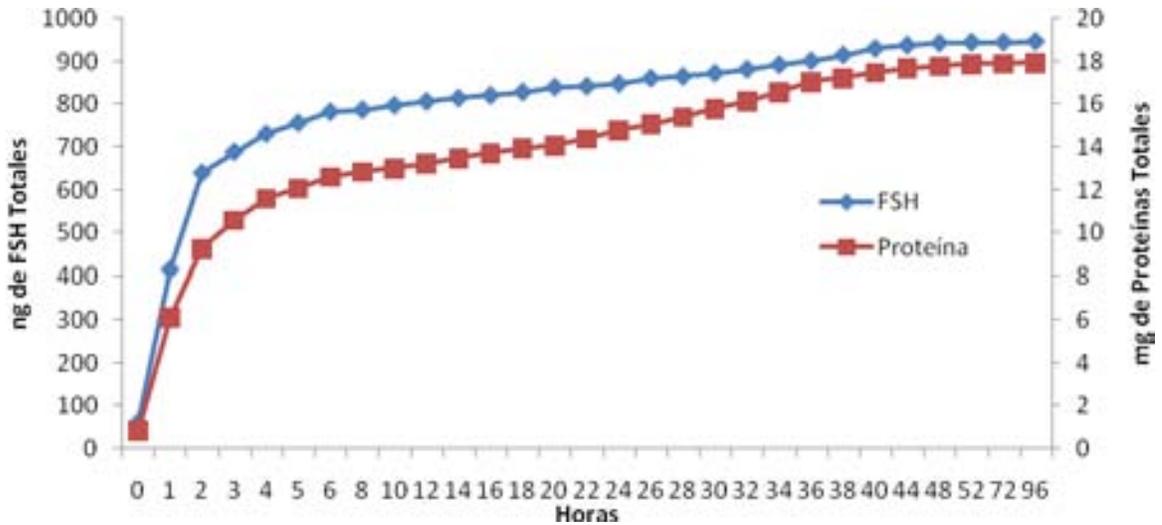
Para confirmar el resultado obtenido mediante la técnica de Bradford se midió FSH por RIA.

Los resultados aportados por el radioinmunoanálisis muestran la presencia de FSH, con una variación muy amplia a lo largo de las 96 horas. Las cuales inicialmente mostraron niveles de 61 ng/hr, alcanzando niveles de 354.20 ng/hr durante la primer hora de liberación para posteriormente iniciar un descenso de FSH a partir de la segunda hora donde se detectaron niveles de 224.5 ng/hr, llegando a los 48 ng/hr a la hora 3. Finalmente los valores de FSH determinados a partir de la hora 4 y hasta la hora 96 oscilaron entre 2.8 y 0.29 ng/ml (grafica 5.7). Las concentraciones promedio de FSH obtenidas al finalizar las 96 horas de liberación fueron de 32 ng/hr. Tanto las concentraciones de FSH como las concentraciones de proteína mostraron un paralelismo con una correlación de 0.98 ( $P < 0.05$ ) gráfica 5.8.



5.8 Grafica de Correlación entre Proteína y FSH en escala logarítmica base 10

Las concentraciones acumuladas de proteína y FSH se representan en la grafica 5.9. La cantidad acumulada promedio liberada por los implantes a lo largo de las 96 horas, tuvo un valor inicial de 61.15 ng durante en la hora cero de liberación, llegando a total de 1182.26 ng al final de las 96 horas, En tanto que las cantidades de proteína iniciaron con niveles de 0.799 mg llegando a un total de de 25.41 mg totales a las 96 horas.



Grafica 5.9: Se esquematiza la cantidad de proteína acumulada liberada en 96 horas. La línea azul representa las concentraciones acumuladas de FSH determinadas por RIA, mientras que roja los valores de proteína determinados por Bradford.

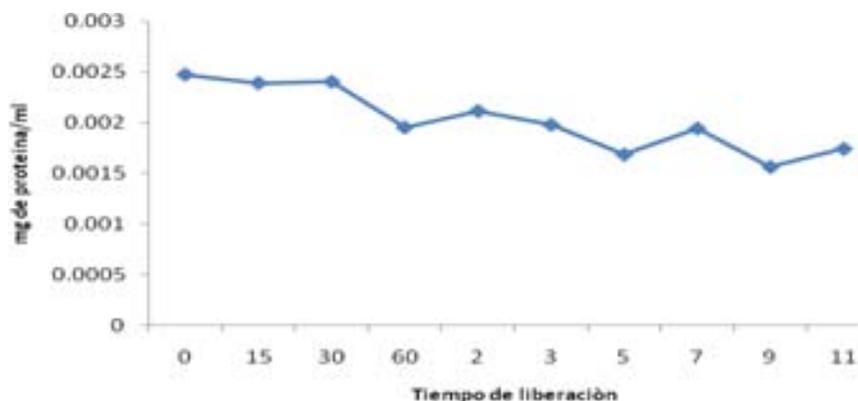
En el cuadro 2 se presenta los valores de proteína total recuperada de los implantes sometidos a la prueba de liberación.

Cuadro 5.2: Se resumen los miligramos y porcentajes de proteína y FSH incluidos y recuperados

Etapa	Comprimido	Proporción FSH:PLGA:	n	mg incluidos	mg de proteína recuperados	microg de FSH recuperados	% de proteína recuperada	% de FSH recuperada
I	1	1:57	4	0.3	7.08 ± 2.91		2360	
II	2	1:1:8	2	5	1.11		22	
	3	1:1:8	2	5	3.81		76	
	4	2:2:1:15	2	5	4.35		87	
	5	2:2:1:15	2	5	3.27		65	
	6	2:4:1	2	5	2.04		41	
III	7	1:4:2	2	5	2.44		49	
	8	1:2:2	2	2.5	1.76		70	
IV	9	1:20	2	1	14.29		1429	
	9	1:20	2	1	22.09		2209	
	10	1:40	2	1	15.41		1541	
	10	1:40	2	1	10.20		1020	
	11	1:50	2	1	21.65		2165	
	11 <sup>a</sup>	1:50	2	1	18.51		1851	
	12	1:100	2	1	4.96		496	
	13	1:140	2	0.5	2.75		550	
14	1:225	2	0.5	1.59		318		
15	1:500	4	0.5	25.41 ± 0.0001	1.18 ± 0.07	300		

## 5.5 Comprimidos de PLGA sin FSH

Durante la de terminación de proteínas se obtuvieron valores de recuperación totales por arriba de los añadidos a la formulación, por esta razón se realizaron comprimidos sin FSH. Las pruebas de liberación detectó la de terminación de proteína. (Grafica 5.10).



Grafica 5.10: Se esquematiza las concentraciones de proteína liberada de los comprimidos de PLGA que no contenían hormona n=4.

## 6.0 DISCUSION

En el presente trabajo se desarrollaron comprimidos PLGA, los cuales contenían y liberaron FSH por 96 horas. Las concentraciones de FSH liberada fueron de 32 ng/hr. Esta cantidad en un bovino de 500kg aportarían 0.064 ng/ml, considerando que tuviera una vida media de 1 hora, sin embargo la vida media de la FSH es de 2.5 horas (Ulloa-Aguirre et al., 1995) por lo que hay que considerar el acumulado, lo cual da una concentración de 0.13ng/ml de FSH a nivel sanguíneo, esta concentración sería insuficiente para lograr una estimulación ovárica, dado que para que se de un desarrollo folicular se necesitan concentraciones de 50 microgramos de FSH en hora, lo que representaría una concentración sanguínea aproximada de 1ng/ml. El fundamento para determinar que la administración de 50 microgramos para lograr una estimulación ovárica se basa en el trabajo realizado por Garverick et al., (2002), quienes observaron que al administrar 50 microgramos/hr de FSH en vacas de carne con la pituitaria inhibida por la administración crónica de un agonista de GnRH presentaba concentraciones de FSH similares a los del grupo control, logrando estimulación ovárica muy parecida a lo que ocurriría de forma natural. Por lo que se infiere que las concentraciones de FSH que producen estimulación ovárica con niveles fisiológicos oscilan alrededor de 1 ng/ml (Garverick et al 2002) Esto no concuerda con lo presentado por Rathbone et al., (2001), quienes al realizar una revisión bibliográfica encontró que los niveles de FSH oscilan entre 1.3 y 2 ng/ml en bovinos durante la fase lútea, reportando los niveles más altos en el día 9, lo cual se acerca mucho a los días en que se presentan la emergencia en la oleada folicular. Sin embargo, tanto las concentraciones reportados por Garverick et al., como los niveles presentados por Rathbone et al., están por arriba de las concentraciones liberados en implantes del presente trabajo. Por lo tanto, se infiere que las concentraciones de FSH aportadas por el implante no tendrán efecto sobre la estimulación ovárica, dado que niveles liberados en una hora estarían por debajo de los considerados como fisiológicos.

En el presente estudio se utilizo PLGA como base para controlar la liberación de la FSH. Con base en lo anterior y tomando en consideración las características físico-químicas de la FSH, así como las características del polímero, se prepararon comprimidos por medio de la técnica de compresión directa. La razón por la cual se utilizó la técnica de compresión directa para la elaboración de los comprimidos radicó en que la FSH es una

glicoproteína fácilmente desnaturizable (Ulloa-Aguirre et al., 1998), por lo que el realizar algún procedimiento que implique el uso de calor por tiempos prologados o de solventes podría inactivar la proteína, haciendo que la hormona disminuya o pierda su actividad biológica, tal como lo comenta Santoveña et al., (2009), quien observó que al formular una pastilla por el método de compresión directa, el péptido que se deseaba administrar no comprometió la estabilidad de la hormona. Por lo que, los comprimidos elaborados por compresión directa permitirá que las hormonas no sufran alteración en su estructura y función.

En el transcurso del presente trabajo se usaron dos presiones y dos punzones diferentes. En la etapa I se utilizaron punzones de 0.3cm de diámetro a una presión de 2 toneladas, esta presión resulto muy alta para el diámetro de estos punzones, ya que la presión máxima que resiste este diámetro es de 0.8 toneladas, razón por la cual los punzones sufrieron fracturas (Hibbeerler, 2006). En la etapa II se utilizó la misma presión pero con punzones de mayor tamaño (1.4cm), sin embargo, los comprimidos obtenidos se desintegraron rápidamente por tener una mayor superficie de contacto con el PBS, además del excesivo contenido de lactosa. La rápida desintegración del comprimido y por ende la rápida liberación de proteína dio pauta para realizar cambios en la compresión, por tal motivo se regresó al uso de los punzones de 0.3cm pero a una presión de 1 tonelada. Los comprimidos producto de esta etapa tuvieron la dureza suficiente para resistir el manejo, previo a la liberación, sin embargo como se puede apreciar en las graficas correspondientes a la etapa III, la liberación de proteína fue en un tiempo muy corto, posiblemente por la alta concentración de lactosa incluida en los implantes, la cual ayudo a una rápida desintegración de la pastilla. Por lo descrito anteriormente aunando a el trabajo presentado por Santoveña et al, (2009) se puede inferir que la presión ejercida para la compresión de los implantes, así como el diámetro de los punzones a utilizar es de gran importancia. Un exceso en la presión genera comprimidos muy compactos, lo cual interfiere en liberación del fármaco, mientras que comprimidos elaborados con una presión baja dan lugar a implantes frágiles que liberan el principio activo de forma rápida por su rápida desintegración, además de un manejo muy delicado.

Además de la compresión existen otros factores a considerar como la adición de adyuvantes que actúen como “disgregantes” o “secuestrantes”, los cuales contribuyen a

dosificar la liberación del fármaco. En este estudio se incluyeron diluyentes en la formulación para solucionar la falta de liberación del fármaco y desintegración de implantes observado en la etapa I. La inclusión de “disgregantes” tuvo la finalidad de abrir canales dentro del comprimido, los cuales ayudarían a la hidrolización y fragmentación de los comprimidos. La inclusión de lactosa y celulosa a concentraciones de los diluyentes iban desde el 10% de la formulación total hasta el 200% del peso total de los reactivos base (polímero-hormona) aumento la fragilidad de los comprimidos e hizo su manejo delicado (Aulton 2004).

Estas concentraciones están muy por arriba de las reportadas en la literatura, la cual indica que las cantidades de disgregantes dentro de una forma farmacéutica no deberán exceder del 5% del volumen total del comprimido (Aulton 2004). Por lo tanto, Los comprimidos que contenían Lactosa dentro de la formulación dieron como resultado comprimidos altamente hidrosolubles que liberaron el total de la proteína en 15 minutos, posiblemente por las altas concentraciones de la lactosa. Las concentraciones de lactosa estaban por arriba niveles reportados como máximos en la literatura. Las altas concentraciones de lactosa en conjunto con su solubilidad dio lugar a que los comprimidos se desintegraran de manera casi inmediata al contacto con el medio acuoso. Por esta razón se decidió retirar a la lactosa y celulosa de la formulación.

Considerando la alta solubilidad de la lactosa, se integro celulosa a la formulación, con la finalidad de que esta última retrasara el proceso de liberación de la hormona. La celulosa al hidrolizarse sufre un proceso por el cual el agua queda atrapado en las redes del polímero por lo que este compuesto al humectarse se hinchara. Este fenómeno podría ayudar a la desintegración del implante, pero al mismo tiempo encapsularía al fármaco retrasando su salida. Por otra parte el hinchamiento ayudará a abrir canales para fracturar el implante ayudando a la desintegración del comprimido (Sinha, et al., 1998). Por lo tanto, la celulosa se añadió para que cumpliera con dos funciones, la primera ayudar a la desintegración del comprimido y la segunda a retrasar la liberación del fármaco. Por lo anterior se infiere que los implantes que contenían celulosa presentarían una degradación más lenta que los que contenían lactosa. Lo anterior no ocurrió así, ya que los comprimidos que contenían celulosa presentaron una desintegración más rápida, lo cual puede deberse a la pobre interacción del polímero con la celulosa dando como resultados

comprimidos frágiles y poco manejables, los cuales se rompían con facilidad durante su almacenamiento.

Otro factor a considerar durante la elaboración de una forma farmacéutica es el tamaño de partícula que presentan los reactivos, en este caso, que conformaran el comprimido. Las formulaciones donde los reactivos presentan un tamaño de partícula diferente, las partículas pequeñas llegan a presentar una mala interacción con las partículas grandes (Aulton, 2004), por lo cual los reactivos de menor tamaño llegan a precipitarse dentro del contenedor donde se estará realizando el mezclado, dando origen a un mezclado heterogéneo, lo cual contribuye, en este caso, a una mala interacción entre la FSH y el PLGA. Lo anterior fue el fundamento para determinar que la PLGA fuera tamizado con una malla de 75 micras de diámetro y poder llevar el tamaño del polímero lo más cercano a tamaño de la FSH. Por lo descrito anteriormente, es importante realizar pruebas reológicas que permitan conocer el tipo de interacción que existe entre el polímero y la hormona. La determinación del tipo de interacción existente entre la PLGA y la FSH ayudara a determinar la metodología más adecuada para realizar formulaciones farmacéuticas que permitan la liberación controlada del fármaco y comprender el tipo de liberación que se está llevando a cabo, esto permitirá realizar los ajustes necesarios en la formulación para obtener una liberación constante en dosis terapéuticas de la hormona foliculo estimulante.

Por lo anterior, es importante conocer el tipo de interacción entre la hormona y el polímero para poder determinar el porqué de la variabilidad en las concentraciones de FSH presentes en las muestras. Las interacciones hormona-polímero pueden darse de dos formas: la interacción por enlaces covalentes o que el principio activo este disperso por todo el polímero (Sinha et al., 1998). El tipo de unión entre la hormona y el polímero determinaran la forma de liberación. Para el caso de las uniones covalentes la liberación se dará por la hidrólisis de los puentes que unen al fármaco con el polímero, mientras que en los casos donde el principio activo está disperso entre el polímero la liberación se puede dar de tres formas, la primera es por un mecanismo de difusión, la segunda se dará por la erosión del polímero y finalmente la tercera será una combinación de ambas (Kotwal. et al., 2007, Sinha et al., 1998)

Dado que la interacción entre el polímero y la hormona se desconoce se infiere que el tipo de interacción entre estos dos componentes se da mediante la dispersión de la hormona en el polímero. Por esta razón se requieren grandes cantidades de polímero en relación con la hormona, para que la hormona quede atrapada entre el polímero y ello de lugar a una liberación lenta de la misma. Sin embargo, un trabajo publicado por Santoveña et al., (2009) quien utilizó PLGA como vehículo para la administración controlada de la hormona de crecimiento Humana (hGH), revelo que la estructura microporosa de la PLGA producto de la compresión, así como la degradación inicial del termoplástico, son los parámetros clave que deberán de tomarse en cuenta al momento de diseñar comprimidos que mezclen a un péptido y PLGA para la administración de controlada. Por esta razón, es importante conocer los diferentes procesos para la elaboración de un sistema de liberación controlada. Ya que la técnica utilizada deberá de considerar las características físico-químicas de los reactivo que integran el compuesto y principalmente la vida media del fármaco, quienes serán el indicador para establecer las limitantes que podrían presentarse en el desarrollo del producto y por ende determinarán el proceso a seguir para la obtención de un sistema de liberación controlada (Aulton 2004).

Finalmente, para determinar las concentraciones de proteínas totales presentes en las muestras obtenidas durante la fase de liberación se uso la prueba de Bradford. El uso de la prueba de Bradford se justifica en el hecho de que es un método barato y practico que permite conocer de manera rápida las concentraciones de proteínas totales contenidas en una muestra (Deutscher, 1990). Sin embargo, dado que la presentación comercial de la FSH (extracto pituitario) contiene otras proteínas además de la FSH (Armstrong 1986), es necesario utilizar una prueba específica para la determinación de la FSH (Prakash et al., 1999). Por esta razón se utilizo la prueba de radioinmunoanálisis para determinar las concentraciones reales de FSH, encontrando una tendencia similar entre la metodología de Bradford y el RIA, ambas pruebas mostraron una correlación de 0.98 ( $P < 0.05$ ). Este comportamiento muestra que el método de Bradford es una prueba confiable y barata que puede ser utilizada para determinar las concentraciones de FSH en pruebas de liberación preliminares in vitro, sin embargo, estos datos deberán ser tomados con reserva ya que en las muestras tomadas durante la fase de liberación de los comprimidos que no contenían FSH, el reactivo de Bradford reacciono dando valores

correspondientes a niveles de proteínas totales, este hecho podría ser la explicación a los niveles de recuperación tan altos de proteína totales por encima de los niveles de incluidos

Para conocer si las cantidades liberadas de la FSH son adecuadas para lograr una superovulación, es prioritario la aplicación de los comprimidos en individuos que permita realizar una evaluación *in vivo* del implante, para de ser necesario realizar las modificaciones requeridas para lograr una liberación en dosis terapéuticas que permitan la estimulación ovárica.

## **7.0 CONCLUSION**

El comprimido de FSH con PLGA en una proporción de 1:500, mostró una liberación de FSH por un tiempo mayor a 96 horas. Sin embargo las cantidades liberadas registradas son menores a las necesarias para lograr niveles fisiológicos necesarios para lograr el desarrollo folicular. Por tal motivo es importante hacer una nueva formulación que permitan la liberación de una concentración mayor de FSH con la cual se logre la estimulación ovárica para lograr una superovulación.

## 8.0 LITERATURA CITADA

- Albertsson A-C, Varma IK. Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications *Biomacromolecules* 2003, 4, 1466-1486
- Allen W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction* 2001 121, 513–527
- Anderson James M, Shive Matthew S. Biodegradation and Biocompatibility of PLA And PLGA Microspheres, *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997 28 5–24
- Armstrong DT, Opavsky MA. Biological characterization of a pituitary FSH preparation with reduced LH activity. *Theriogenology*, 1986, 25:1, 135
- Aulton ME, *Farmacía la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*, Madrid, España 2004
- Biondi M, Ungaro F, Quaglia F, Netti, P A. controlled drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008, 60 229–242
- Bo G.A., Hockley D.K., Nasser L.F., Mapletoft R.J. Superovulatory response to a single subcutaneous ejection of follitropin-v in beef cattle. *Theriogenology* 1994, 42:963-975.
- Castro-Fernández C, Olivares A, Söderlund D., López-Alvarenga J. C., Zambrano E., Veldhuis J. D., Ulloa-Aguirre A., Méndez J. P. A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin- releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. 2000 85,. 12
- Chang-Sik Ha, J. A., Gardella, Jr. Surface Chemistry Of Biodegradable Polymers For Drug Delivery Systems *Chem. Rev.* 2005, 105, 4205-4232
- Cheung C. C, Lustig R. H., Pituitary development and physiology, *Pituitary* 2007 10:335–350

- De Kretser D.M., Hedger M.P., Loveland K.L., Phillips Inhibins D.J., Activins and follistatin in reproduction human *Reproduction Update*,. 2002, 8,.6, 529-541,
- Demoustier M.M., Beckers J-Fr., Van Der Zwalmen P., Closset J., Gillard J-L., Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment cows. *Theriogenology* 1988 Vol. 30 No. 2
- Desaulniers D.M., Lussier J.G., Goff A.K., Bousquet D., And Guilbault L.A., Follicular development and reproductive endocrinology during a synchronized estrous cycle in heifers and mature cows displaying contrasting superovulatory responses, *Domestic Animal Endocrinology* 1995, 12, 117-131,
- Deutscher M.P. *Methods in enzymology*. Vol. 182, Guide to protein purification New York, United States of America. 1990
- Dieleman Steph J., Bevers M.M., Vos P.L.A.M.,. De Loos F.A.M PMSG/Anti-PMSG In cattle: a simple and efficient superovulatory treatment? *Theriogenology*1993 39:25-41.
- Dove A. P., Controlled ring-opening polymerisation of cyclic esters: polymer blocks in self-assembled nanostructures *Chem. Commun.*, 2008, 6446–6470
- Driancourt M.A., Fry R.C., Effect of superovulation with pfsh or pmsg on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. *Animal Reproduction Science*, 1992 27 279-292
- Echtenkamp S. E. Fetal Development In Cattle With Multiple Ovulations *J. Anim. Sci.* 1992. 70:2309-2321
- Foote R.H. Ellingtm J.E. Is a superovulated oocyte normal?. *Theriogenology* 1988. 29. 1.
- Fowler P.A., Price C.A., Follicle-Stimulating Hormone stimulates circulating gonadotropin surge-attenuating/inhibiting factor bioactivity in cows. *Biology of Reproduction* 1997: 57, 278-285

- Frank A. Factors Affecting The Degradation And Drug-Release Mechanism Of Poly(Lactic Acid) And Poly[(Lactic Acid)-Co-(Glycolic Acid)] Polym Int 2005 54:36–46.
- Fuad F. The role of o-linked and n-linked oligosaccharides on the structure–function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists Biochimica Et Biophysica Acta, 2006, 1760, 560–567
- Garverick H. A., Baxter G., Gong J., Armstrong D. G., Campbell B. K., Gutierrez C. G. and Webb R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. Reproduction 2002 123, 651–661
- Green E. D., Baenziger J. U., Boime I. Cell-free sulfation of human and bovine pituitary hormone comparison of the sulfated oligosaccharides of lutropin, follitropin, and thyrotropin J. Biol. Chem. 1985. 260, No. 29, 15631-15638,
- Gupta B, Revagade N, Hilborn J. Poly(Lactic Acid) Fiber: An overview Prog. Polym. Sci. 2007: 32 455–482
- Hampton J H, Bader J F, Lamberson W R, Smith M F, Youngquist R S, Garverick H A, Gonadotropin requirements for dominant follicle selection in GNRH agonist-treated cows, Reproduction 2004, 127, 695–703
- Hibbeler, R.C., Mecánica de materiales. Ed. Pearson Educación, México D.F., 2006
- Holzer H, Casper R, Tulandi T, A new era in ovulation induction Fertility and Sterility. 2006 85, 2.
- Houchin, Ml., Houchin M.L., Topp E.M., Chemical Degradation Of Peptides And Proteins In Plga: A Review Of Reactions And Mechanisms Journal Of Pharmaceutical Sciences, July 2008: 97, 7.
- Huang YY Qi, M, Liu HZ, Zhao H, Degradation of porous poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid) films based on water diffusion Journal of biomedical materials Research 2006 Part A 80a 4, 909-915

- Jimo H G., Wise D. L., Gresser J. D., Foote R. H., Rhodes R. C., Underhill L. H. Trantolo D. J., Pulsatile release of FSH for superovulation in cattle *Theriogenology* 1995, 43: 645 656.
- Knobil E. Neil JD *Encyclopedia of reproduction*. Academic Press., San Diego California 1998; 2 29 36
- Kotwal V. B. Saifee M, Inamdar N, Bhise K. Biodegradable polymers: which, when and why? *Indian Journal of pharmaceutical Sciences* 2007, 69 5 616-625.
- Langer R. Peppas N A. *Advances in biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology* 2003: 49,.12, 2990 – 3006
- Loureiro RF, De Oliveira JE, Torjesen PA, Bartolini P. Ribela Maria Teresa C.P. Analysis of intact human follicle-stimulating hormone preparations by reversed-phase high-performance liquid chromatography , *Journal of Chromatography A*, 2006:1136 10–18
- Lucy M. C. The bovine dominant ovarian follicle. *J. Anim. Sci.* 2007. 85(E. Suppl.):E89–E99
- Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP, Recent advances in the superovulation in cattle, *Reprod. Nutr. Dev.* 2002, 42 601–611
- Mejía V. O., Murcia M. C., Valencia M. J., Aviña E. F., Administración posmonta de acetato de fluorogestona en ovejas donadoras de embriones. *Veterinaria México*, Abril-Junio 2000, 31, 2 129-135
- Menemşe Kiremitçi-Gümüşderelioğlu, Günday Deniz , Synthesis, Characterization And In Vitro Degradation Of Poly(DI-Lactide)/Poly(DI-Lactide-Co-Glycolide) Films *Turk J Chem* 1999:23, 153 161.
- Mojtaba K., Mcgowan Michael R., Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle *Animal Reproduction Science* 1997:48 137- 157

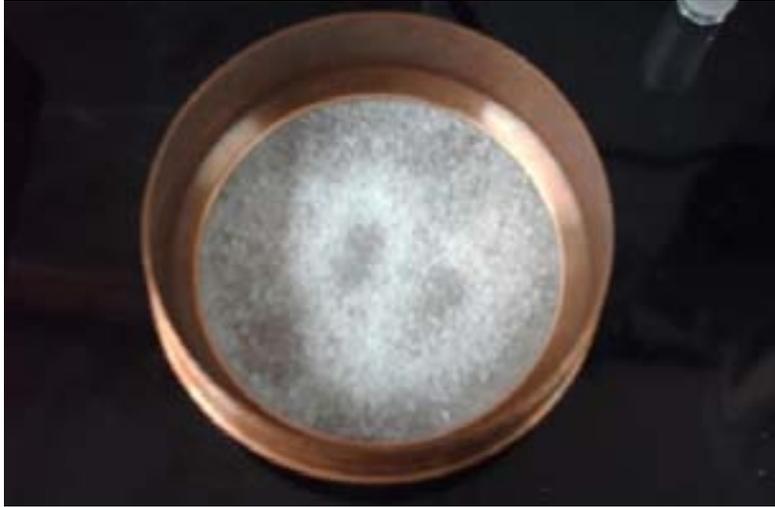
- Murphy B. D., Mapletoft R. J., William Jack Harms Variability D.Humphre, In gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. Theriogenology 1984 Vol. 21 No. 1
- Padmanabhan V, Mcfadden K, Mauger DT., Karsch FJ., Midgley AR, Jr, Neuroendocrine control of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) secretion. I. direct evidence for separate episodic and basal components of fsh secretion Endocrinology 1997. 138, 1, 424-432
- Padmanabhan V, Mcneilly AS., Is there an FSH-releasing factor? Reproduction 2001 121, 21–30
- Padmanabhan V, Sharma T P. Neuroendocrine vs. paracrine control of follicle-stimulating hormone, Archives Of Medical Research 2001 32 533–543
- Padmanabhan V., Battaglia D., Brown M., Karsch FJ, Lee JS, Pan W., Phillips DJ, and Van Cleeff J. Neuroendocrine control of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) secretion: II. is follistatin-induced suppression of fsh secretion mediated via changes in activin availability and does it involve changes in gonadotropin-releasing hormone secretion? Biology of Reproduction 2002:66, 1395-1402
- Padmanabhan V., Brown, MB. Dahl GE., Evans NP., Karsch FJ., Mauger DT., Neill JD, Van Cleeff J, Neuroendocrine control of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) secretion: III. is there a gonadotropin-releasing hormone-independent component of episodic FSH secretion in ovariectomized and luteal phase ewes? Endocrinology, April 2003, 144(4):1380–1392
- Pamula E., Menaszek E., In Vitro And In Vivo Degradation Of Poly(L-Lactide-Co-Glycolide) Films And Scaffolds J Mater Sci: Mater Med 2008 19:2063–2070.
- Phillips David J. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species domestic animal Endocrinology 2005, 28, 1–16

- Prakash B.S., Wallenhorst S., Metten M., Holtz W., Wuttke W. Development of a sensitive Enzymeimmunoassay (EIA) for FSH determination in bovine plasma animal Reproduction Science 1999: 55. 183–192
- Rathbone M J, Kinder J E., Fike K, Kojima F., Clopton D., Ogle CR, Bunt CR. 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 2001, 50, 277–320
- Rodriguez Bores Ramírez Mariano. Síntesis y caracterización reológica de Poli(DL-Lactida) Tesis de Maestría de la Facultad de Química de la UNAM 2007
- Sairam M. R. Bhargavi G.N. Role for glycosylation of the c subunit in transduction of biological signal in glycoprotein hormones. Science, 1985. 229
- Samaddar M, Catterall JF., Dighe RR. Expression of biologically active b subunit of bovine follicle-stimulating hormone in the methylotrophic yeast pichia pastoris Protein Expression and Purification 1997:10, 345–355
- Santoveña A, Alvarez-Lorenzo C, Llabrés, Concheiro A., Fariña JB. hGH release from directly compressed hGH-PLGA biodegradable implantable tablets: Influence of physicomechanical factors European Polymer Journal 2009, 45, 2830–2838
- Santoveña A., Álvarez-Lorenzo C., Concheiro A., Llabrés M, Fariña J.B., Evaluación de las propiedades viscoelásticas de implantes. laminares biodegradables de poli(D,L-Lactida-co-Glicolida). Memorias de VI Congreso SEFIG y Terceras Jornadas de Tecnología Farmacéutica, España 2003, pp 193
- Singh Rajesh, Singh Shailesh, Lillard James W. Past, present, and future technologies for oral delivery of therapeutic proteins Journal Of Pharmaceutical Sciences July 2008, 97, 2497-2523
- Sinha, V R. and Khosla, L. Bioabsorbable polymers for implantable therapeutic systems', drug. Development and Industrial Pharmacy, 1998. 24:12, 1129 -1138.

- Smith P.L., Baenziger J.U. A Pituitary N-Acetylgalactosamine Transferase That Specifically Recognizes Glycoprotein Hormones. *Science* 1988. 242 pp 930 – 933.
- Son DS, Chang-Yong C, Sang Rae-Cho, Sun-Ho Choi, Hyun-Jong Kim, Ill-Hwa Kim  
The effect of reduced dose and number of treatments of fsh on superovulatory response in cidr-treated korean native cows *Journal Of Reproduction And Development* 2007, 53 1299-1303.
- Stocco Douglas M.. Tracking the role of a star in the sky of the new millennium *molecular endocrinology* 2001 15(8):1245–1254.
- Tapia Morales Graciela, Sintesis y caracterización de polímeros de ácido láctico co glicólico como soporte para sistemas farmacéuticos de larga duración Tesis de Maestría de la Facultad de Química de la UNAM 2007
- Turker, KE. Reproductive toxicity of ovulation induction, *Seminars in reproductive endocrinology* 1996,14, 4, 345-353
- Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P, Timossi C Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation *Archives Of Medical Research* 2001:32 520–532
- Ulloa-Aguirre A. Midgley A.R Jr. Beitins I Z and Padmanabhan V., Follicle-Stimulating Isohormone: characterization and physiological relevance., *Endocrine Reviews* 1995 16 6 765:
- Ulloa-Aguirre A., Timossi C, Structure-function relationships of follicle-stimulating hormone and its receptor, *Human Reproduction* 1998 4,3 260-283
- Yamamoto M. Ooe M. Kawaguchi M. and Suzuki T. Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone *Theriogenology* 1994, 41:747-755,

- Zaidi A.A, Robertson D.M. and Diczfalusy E., Studies on the biological and immunological properties of human follitropin: profiles of two international reference preparations and of an aqueous extract of pituitary glands after electrofocusing. *Acta Endocrinologica* 1981, 97:157-165
- Zion B-R M.D., Tally Levy, M.D., and Joop Schoemaker, M.D. Pharmacokinetics of folliclestimulating hormone: clinical significance *Fertility and Sterility*. March 1998 6, 3 (SUPPL. 2).

## ANEXO 1



Tamiz utilizado para estandarizar el polímero a 75 micras de diámetro

ANEXO 2



Prensa CARVER

### ANEXO 3



**FOTO 1:** Celdas de Franz utilizadas para la prueba de liberación sobre platina de agitación magnetica



**FOTO 2:** Vaso termostatado sobre platina de agitación magnetica.