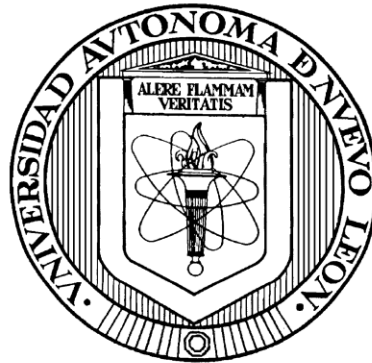


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“Evaluación de un sistema de liberación controlada de progesterona en cabras”

POR

MVZ. Janeth Tello Leal

Como requisito parcial para obtener el grado de

Maestría en Ciencia Animal

General Escobedo, N. L.

Noviembre 2023

“Evaluación de un sistema de liberación controlada de progesterona en cabras”

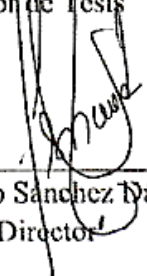
Aprobación de tesis de Maestría en Ciencia Animal por el comité particular de

MVZ. Janeth Tello Leal

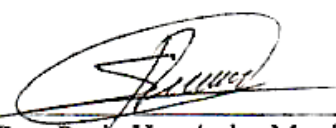
COMITÉ DE TESIS



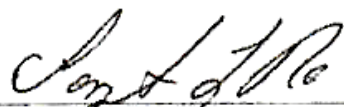
Dr. Rogelio Alejandro Ledezma Torres
Director de Tesis




Dr. Fernando Sanchez Dávila
Co-Director



Dra. Sara Paola Hernández Martínez
Co-Directora



Dr. Jorge Alejandro Lozano Rendón
Co-Director



Dr. José González Salinas
Co-Director

AGRADECIMIENTOS

A mi universidad que me vio crecer y formarme profesionalmente, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y Universidad Autónoma de Nuevo León quienes me brindaron esta oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Rogelio A. Ledezma por su esmero y paciencia durante estos dos años y su creatividad para seguir creando nuevos proyectos.

Al Dr. Fernando Sánchez por su apoyo al realizar las actividades en su Rancho y estar al pendiente de cada paso del proyecto.

A la Dra. Sara P. Hernández por toda esa dedicación y paciencia al trabajar en el laboratorio explicándome cada paso de los protocolos ya que sin esto no hubiera sido posible para la obtención de mi tesis.

DEDICATORIA

Es maravilloso reconocer y agradecer el apoyo de mis seres queridos en el desarrollo de mi proyecto. Agradezco el apoyo, la paciencia y la dedicación de mi esposo, padres y hermana a lo largo de estos dos años de maestría, ellos han sido una fuente constante de motivación para mí. Su presencia y su apoyo incondicional me han permitido superar obstáculos y alcanzar más metas día con día.

¡Agradecerles, demuestra mi gratitud y amor hacia ellos, el apoyo de mi familia siempre será una fuente de inspiración para seguir luchando por mis sueños para así llegar a ser un gran ejemplo para mi hija y siga mis pasos hacia un futuro lleno de éxitos!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE GRÁFICAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- JUSTIFICACIÓN	4
3.- HIPÓTESIS	4
4.- OBJETIVOS	5
4.1.- Objetivo General	5
4.2.- Objetivos Específicos	5
5.- LITERATURA REVISADA	6
5.1.- Síntesis de la progesterona	6
5.2.- Absorción bioquímica y fisiológica de la progesterona	7
5.3.- Presentaciones y suplementación de la progesterona	8
5.4.- Nuevos sistemas de liberación de la progesterona	11
5.5.- Su uso en la reproducción animal	12
5.6.- Espectroscopía	13
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1.- Lugar de realización del estudio	14
6.2.- Área y Tiempo de Muestreo	14
6.3.- Preparación de hidrogeles cargados con progesterona	14
6.4.- Caracterización de los hidrogeles	14
6.5.- Porcentaje de hinchamiento y degradación	15
6.6.- Porcentaje de liberación de la progesterona	16
6.7.- Análisis Estadístico	16

7.- RESULTADOS	17
7.1.- Caracterización del hidrogel	17
7.2.- Porcentaje de hinchamiento y degradación de los hidrogeles	18
7.3.- Liberación de la progesterona	20
8.- DISCUSIÓN	28
9.- CONCLUSIONES	31
10.- LITERATURA CITADA	32

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Caracterización de la progesterona	17
Gráfica 2: Caracterización hidrogel quitosano con y sin progesterona	17
Gráfica 3: Hinchamiento de gel de quitosano pH de 4	19
Gráfica 4: Hinchamiento de gel de quitosano pH de 5	19
Gráfica 5: Hinchamiento de gel de quitosano pH de 6	19
Gráfica 6: Hinchamiento de gel de quitosano pH de 7.....	19
Gráfica 7: Degradación de gel de quitosano pH de 4	20
Gráfica 8: Degradación de gel de quitosano pH de 5	20
Gráfica 9: Degradación de gel de quitosano pH de 6.....	20
Gráfica 10: Degradación de gel de quitosano pH de 7	20
Gráfica 11: Curva de progesterona cuantificación de su liberación	21
Gráfica 12: Liberación de gel de quitosano pH de 4 a través de 3 días	22
Gráfica 13: Liberación de gel de quitosano pH de 5 a través de 3 días	22
Gráfica 14: Liberación de gel de quitosano pH de 6 a través de 3 días	23
Gráfica 15: Liberación de gel de quitosano pH de 7 a través de 3 días	23
Gráfica 16: Liberación de gel de quitosano pH de 7 a través de 8 días	23
Gráfica 17: Liberación de gel de quitosano pH de 7 a través de 11 días	23
Gráfica 18: Liberación de gel de quitosano pH de 7 a través de 12 días	24
Gráfica 19: Liberación de gel de quitosano pH de 7 a través de 15 días	24
Gráfica 20: Liberación de gel de quitosano pH de 7 a través de 16 días	24
Gráfica 21: Liberación de gel de quitosano pH de 7 a través de 21 días	24
Gráfica 22: Liberación de gel de quitosano pH de 7 a través de 30 días	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos principales en hidrogeles conteniendo quitosano y progesterona en diferentes concentración de alcohol polivinílico a distintos valores de pH y su interacción	25
Tabla 2. Efectos principales en hidrogel 2 conteniendo quitosano y progesterona en diferentes concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 por 30 días	26

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA

Símbolo abreviatura	o
PVA	Alcohol polivinílico
QTS	Quitosano
CIDR	. Controlled internal drug release
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NPs	Nano partículas
ATR	Reflección total atenuada
FTIR	Técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
nm	Nanómetro
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences.
TM	Tipo de mezcla
NH	Número de hidrogel
[]	Concentración
HG	Hidrogel

RESUMEN

El presente estudio se condujo para evaluar un sistema de liberación controlado de progesterona *in vitro*, por medio de un encapsulado para uso vaginal, para esto se sintetizaron 4 hidrogeles (HG) con polímeros biodegradables, biocompatibles y mucoadhesivos como el quitosano (QTS) y el alcohol polivinílico (PVA) en diferentes concentraciones. Se formaron cuatro variantes de HG: HG1: 5ml QTS (2% p/v) + 5ml PVA (2% p/v) + 2ml PG (.25g) + 5ml NaOH; el HG2 es lo mismo que el HG1, la diferencia es el porcentaje de PVA al 1%, en cambio el HG3 y HG4 varían solamente en el volumen de 10ml para los dos y en el porcentaje de PVA al 2 y 1%, respectivamente. Se evaluaron las propiedades y el comportamiento de cada hidrogel, como hinchamiento, degradación y liberación de progesterona. Estos se evaluaron en una solución de fluido vaginal simulado a diferentes valores de pH (4, 5, 6 y 7), diferentes periodos de tiempo (0, 3, 7, 15, 30 y 60 minutos) para la determinación del porcentaje de hinchamiento, el porcentaje de degradación a 0, 3, 7, 15 y 30 días y la liberación de progesterona a las 0, 24, 48 y 72 horas. En un segundo experimento, la liberación constante de la hormona se evaluó a 8, 11, 12, 15, 16 y 21 días y en un tercer experimento se evaluaron hasta un intervalo de 30 días. Los resultados en cuanto a captación de agua, hinchamiento, degradación y liberación de progesterona a diferentes pH. La capacidad de captación de agua a pH de 4 fue mejor para los HG3 (65%) y HG4 (100%) en comparación con el resto (0%). La captación de agua de los HG1 y HG4 en pH 5 gradualmente aumentaron a 100%, mientras que el HG2 no mostró (35%) una captación significativa. En pH 6, la mayoría de los hidrogeles mostraron respuesta favorable, excepto HG1 y HG2 (0%). En cuanto al hinchamiento en pH de 7, el HG3 fue mejor (100%), mientras que el HG2 no presentó respuesta (0%). La degradación fue diferente de acuerdo a los hidrogeles y a los diferentes pH evaluados. En conclusión, el HG3 (5ml quitosano al 2% + 10ml alcohol polivinílico al 2% + 2ml PG (.25g) + 5ml NaOH, presento el mejor comportamiento en hinchamiento en un medio vaginal sintético con pH de 7 como es normal en la vagina de las cabras, con una degradación y liberación constante de progesterona del 100% durante 14 días. Por lo tanto, en futuros estudios el HG3 debe utilizarse como principal dispositivo en experimentos *in vivo*.

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate a controlled release system of progesterone *in vitro*, by means of an encapsulation for vaginal use, for which 4 hydrogels (HG) were synthesized with biodegradable, biocompatible and mucoadhesive polymers such as chitosan (QTS) and polyvinyl alcohol (PVA) in different concentrations. Four variants of HG were prepared: HG1: 5ml QTS (2% w/v) + 5ml PVA (2% w/v) + 2ml PG (.25g) + 5ml NaOH; HG2 is the same as HG1, the difference being percentage of PVA at 1%, while HG3 and HG4 differ only in the volume of 10ml for each and the percentage of PVA at 2 and 1% respectively. The properties and behaviour of each hydrogel were evaluated, such as swelling, degradation and progesterone release. These were evaluated in a simulated vaginal fluid solution at different pH values (4, 5, 6 and 7), different time periods (0, 3, 7, 15, 30 and 60 minutes) for the determination of percent swelling, percent degradation at 0, 3, 7, 15 and 30 days and progesterone release at 0, 24, 48 and 72 hours. In a second experiment, the continuous release of the hormone was evaluated at 8, 11, 12, 15, 16 and 21 days and in a third experiment they were evaluated up to an interval of 30 days. The results in terms of water uptake, swelling, degradation, and progesterone release at different pH. The water uptake capacity at pH 4 was better for HG3 (65%) and HG4 (100%) compared to the rest (0%). The water uptake of HG1 and HG4 at pH 5 gradually increased to 100%, while HG2 showed no significant uptake (35%) at pH 6, most of the hydrogels showed a favourable response, except HG1 and HG2 (0%). As for the swelling at pH 7, HG3 was better (100%), while HG2 showed no response (0%). The degradation was different according to the hydrogels and the different pHs evaluated. In conclusion, HG3 (5ml 2% chitosan + 10ml 2% polyvinyl alcohol + 2ml PG (.25g) + 5ml NaOH), showed the best swelling behaviour in a synthetic vaginal medium at pH 7, as is normal in the goat vagina, with a degradation and constant release of progesterone of 100% during 14 days. Therefore, in future studies HG3 should be used as the main device in *in vivo* experiments.

1. INTRODUCCIÓN

La sincronización del estro es un paso importante para una producción animal eficiente y sostenible. Se administra una fuente externa de progesterona de manera adecuada, lo que permite mantener esta concentración plasmática durante un lapso de 5-8 días, induciendo a las hembras a estar en la misma etapa del ciclo. Posteriormente, se retira el dispositivo y la concentración plasmática de progesterona decae rápidamente induciendo un mecanismo regulado por hormonas que conduce a la ovulación (Helbling et al., 2018).

Actualmente se han desarrollado varios dispositivos intravaginales eficaces como sistemas de liberación de progesterona, basándose en polímeros no biodegradables tales como PRID-Delta y CIDR y disponibles comercialmente (van Werven et al., 2013).

La sincronización del estro es un método que se puede utilizar para obtener una producción uniforme de cabritos, para concentrar el trabajo y el coste de la mano de obra, y planificar el momento del parto. Para estimular el celo de las cabras y queden preñadas fuera de la época natural de cría, los productores pueden utilizar una combinación de métodos. Para la inducción del estro en cabras fuera de estación, el efecto macho en combinación con progesterona y gonadotropina debe ser usado para mejores resultados reproductivos (Helbling et al., 2018).

De manera que una de las formas de sincronizar el estro, es la suplementación de la progesterona dado que esta hormona desempeña un papel crítico en el crecimiento y desarrollo del embrión al mantener el revestimiento uterino, prevenir las contracciones uterinas prematuras y regular otros procesos esenciales para el mantenimiento de la gestación. La suplementación de progesterona materna al principio de la gestación aumentaría la progesterona fetal, un aumento de la progesterona fetal alteraría la función de los tejidos reproductores en desarrollo y el aumento de progesterona se metabolizaría en otros esteroides bioactivos en el producto (Siemienowicz et al., 2020).

La micronización es un término utilizado para describir la técnica de reducción donde la distribución del tamaño de progesterona resultante es inferior a 10 μ , (Vandana et al., 2014). En la actualidad se muestra como un nuevo método de innovación para la administración de

diversos tratamientos hormonales, ya que la estructura de estas partículas ha ido ganando gran importancia en la fabricación de diversos materiales de recubrimiento avanzados, tal es el caso de polímeros biodegradables, biocompatibles y muco-adhesivos como el quitosano (QTS) y el alcohol polivinílico PVA (Díaz et al., 2001).

El quitosano (QTS) es un biopolímero natural biodegradable, biocompatible de acción prolongada no tóxico de actividad antibacteriana y antioxidante, siendo una de sus características principales el de actuar como coadyuvante en la absorción de fármacos, es un derivado desacetilado de la quitina, que es susceptible a la biodegradación por la acción de la lisozima, son portadores de acción prolongada adecuados para la administración de fármacos (Pizano et al., 2018).

Por otro lado, el alcohol polivinílico (PVA) es un biopolímero lineal hidrófilo sintético biocompatible y biodegradable que no genera toxicidad y posee una actividad bacteriana. Por lo cual, las propiedades estructurales de los polímeros de PVA dependen principalmente del grado de polimerización y del grado de hidrólisis. Debido a los grupos funcionales reactivos en su estructura, el PVA sufre cambios químicos como la esterificación y eterificación, así como cambios físicos como la cristalización y el complejo ion-polímero (Suflet et al., 2021).

Es importante destacar que la síntesis de progesterona no se limita solo al cuerpo lúteo. En otras células y tejidos, como la placenta durante la gestación, también se produce progesterona a partir del colesterol para mantener el desarrollo y el mantenimiento de la gestación, una vez que se sintetiza es convertido en pregnenolona en la mitocondria de las células productoras de hormonas. La pregnenolona se convierte luego en progesterona a través de una serie de reacciones enzimáticas. Una vez sintetizada, la progesterona puede unirse a receptores específicos que se encuentran en el citoplasma de las células blanco. Esta unión provoca un cambio conformacional en los receptores y, a su vez, desencadena una respuesta biológica en las células. En el útero, los receptores de progesterona se encuentran en el epitelio, el estroma y el miometrio. La acción de la progesterona en el útero está influenciada por los estrógenos, que actúan a través de receptores en el citoplasma de las células blanco y desempeña un papel

crucial en la regulación de los tejidos reproductivos, especialmente en el útero, donde su acción está controlada en conjunto con los estrógenos, (Orizaba-Chavez et al., 2013).

El presente estudio tuvo como objetivo principal sintetizar un sistema de liberación controlada de progesterona, a base de QTS y PVA por medio de la micronización intravaginal, tomando en cuenta las características de la propia cavidad de la mucosa.

2. JUSTIFICACIÓN

El modelo de investigación de este trabajo es la cabra por las necesidades de producción de cabritos y leche, sin embargo, este modelo podría ser la base para aplicarse en otras especies domésticas, animales no convencionales inclusive en humanos.

El Estado de Nuevo León se conoce nacional e internacionalmente por el consumo de cabrito, la leche y sus derivados, sin embargo, los productores de cabras del Estado no alcanzan a satisfacer el mercado de consumo debido a diferentes problemáticas, entre ellas bajos porcentajes de preñeces y pariciones de las cabras mantenidas intensivamente, pero sobre todo de la producción extensiva donde están los productores más necesitados y vulnerables.

La creación de este dispositivo reducirá el manejo del ganado del retiro de dispositivos tanto para suplementar progesterona como para en llegar a sincronizar estros y ovulación en especies rumiantes como caprinos, además de cuidar el bienestar animal y reducir la contaminación del medio ambiente al reducir el uso de dispositivos de silicón.

3. HIPÓTESIS

El dispositivo intravaginal (gel) a base de QTS/PVA libera niveles de progesterona similares a otros dispositivos comerciales y podrá utilizarse para suplementar progesterona.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la liberación controlada de progesterona encapsulada en un dispositivo a base de QTS/PVA *in vitro*.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Sintetizar *in vitro* un dispositivo de quitosano y alcohol polivinílico (QTS/PVA) para la encapsulación y liberación de progesterona, de acuerdo a un medio vaginal simulado con características fisiológicas de la vagina de las cabras.
- 4.2.2. Determinar la liberación controlada de la progesterona en el dispositivo de QTS/PVA expuesto a un medio vaginal simulado de las cabras durante 7, 14, 21 o 28 días.

5. LITERATURA REVISADA

La progesterona es una hormona esteroide natural, lipofílica con un peso molecular bajo y escasa solubilidad en agua, debido a esto se administra en forma micronizada y/o en vehículos con requisitos específicos de disolventes. De esta manera, la PGT exógena se utiliza como medicamento en el apoyo en fase lútea para la fertilización (Velázquez et al., 2019).

Se ha utilizado en varias terapias, con fines de reemplazo hormonal, además, se ha utilizado en animales para la sincronización del celo como pasos previos para la inseminación artificial de tiempo fijo (Helbling et al., 2018).

Entre los dispositivos que se encuentran comercialmente podemos destacar dos de ellos PRID-Delta y CIDR, en cuanto a la dinámica de la progesterona circulante después de la inserción de los dispositivos, ambos dispositivos muestran un aumento rápido en los niveles de progesterona, alcanzando alrededor de 4-5 ng/ml en unas pocas horas después de la inserción. Sin embargo, se observa una diferencia significativa en los niveles de progesterona circulante entre el PRID-Delta y el CIDR. El PRID-Delta produce un pico de progesterona circulante significativamente mayor en comparación con el CIDR. Además, las concentraciones de progesterona son mayores para el PRID-Delta a partir del mismo día de inserción del dispositivo hasta el día 4 (van Werven et al., 2013).

5.1. Síntesis de la progesterona

La secreción de progesterona comienza antes de la ovulación y alcanza su pico máximo durante la fase lútea del ciclo estral. Durante esta fase, el cuerpo lúteo, que se forma a partir de las células granulosas del folículo ovárico después de la liberación del óvulo, es responsable de la producción y secreción de progesterona. Antes de que la progesterona pueda ejercer sus efectos en los tejidos blanco, los tejidos deben estar previamente sensibilizados por los estrógenos. Los estrógenos, principalmente el estradiol, actúan en sinergia con la progesterona para regular diversos procesos biológicos, como la proliferación y preparación del endometrio, el desarrollo de las glándulas mamarias y la regulación del ciclo estral (Orizaba-Chávez et al., 2013).

La primera etapa de esta síntesis implica la conversión del colesterol en pregnenolona. Esta conversión es catalizada por una enzima llamada citocromo P-450. Una vez que se ha sintetizado la pregnenolona, puede seguir dos rutas metabólicas diferentes a través de la acción de enzimas específicas: La 3β -HSD (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa): En esta ruta, la pregnenolona es transformada en progesterona. La enzima 3β -HSD cataliza la conversión de pregnenolona a progesterona, que es el paso clave en la síntesis de progesterona y la 17α -hidroxilasa (P450c17): En esta ruta, la pregnenolona es convertida en 17α -hidroxi-pregnenolona por la enzima 17α -hidroxilasa (P450c17). Esta ruta metabólica puede dar lugar a la síntesis de otras hormonas esteroideas, como los glucocorticoides y los mineralocorticoides (Orizaba-Chávez et al., 2013).

Los folículos primarios desempeñan un papel fundamental en la producción de estrógeno y progesterona, además de su función en la liberación del óvulo. Antes de la ovulación, los folículos en crecimiento contienen células granulosas que son responsables de la biosíntesis y secreción de estrógenos, principalmente estradiol. Los estrógenos desempeñan un papel crucial en la proliferación y preparación del endometrio (revestimiento uterino) para la implantación del óvulo fertilizado. La progesterona es esencial para preparar el endometrio para la implantación del óvulo fertilizado y para mantener la gestación en caso de que ocurra. Además, junto con los estrógenos, regula diversas funciones en el sistema reproductivo (Graham et al., 1997).

5.2. Absorción bioquímica y fisiológica de la progesterona

Cuando la hormona se une a su receptor, se produce un cambio conformacional en el receptor, lo que le permite formar un complejo hormona-receptor. Este complejo hormona-receptor puede translocarse al núcleo de la célula, donde se une a secuencias específicas de ADN llamadas elementos de respuesta hormonal, en el caso de la progesterona, una vez que se une a su receptor específico, el complejo hormona-receptor puede dimerizarse, lo que significa que dos receptores de progesterona se unen entre sí (Cable and Grider, 2021).

Como hormona esteroide, la progesterona funciona uniéndose a un receptor nuclear que se encuentra ubicado dentro del citoplasma de una célula. La progesterona se une a receptores nucleares de progesterona (principalmente PR-A y PR-B), lo que activa la regulación de la

expresión génica y desencadena respuestas celulares específicas en función de la isoforma del receptor y de los elementos de respuesta hormonal presentes (Cable and Grider, 2021).

La existencia de estas dos isoformas del receptor de progesterona, con funciones distintas pero relacionadas, permite una regulación más fina y compleja de los procesos biológicos mediados por la progesterona. La proporción relativa de PR-A y PR-B en una célula o tejido determinado puede influir en la respuesta global a la progesterona y en la especificidad de los efectos biológicos observados (Vegeto et al., 1993).

5.3. Presentaciones y suplementación de la progesterona

La progesterona se puede administrar por varias vías: oral, intramuscular y vaginal; teniendo muchas opciones para su formulación, las más disponibles comercialmente presentan tanto ventajas como desventajas. Las cápsulas para administración oral permiten lograr bajas concentraciones endometriales del medicamento debido al metabolismo de primer paso por el hígado, y las inyecciones intramusculares pueden causar dolor e irritación en el lugar de la inyección reduciendo de manera mínima la eficacia terapéutica. El uso de la vía vaginal puede causar secreción vaginal, irritación y reacciones leves en el lugar de aplicación. Sin embargo, exhibe una absorción preferencial, ya que el medicamento se transporta directamente al útero (Velázquez et al., 2019).

Se ha utilizado en varias terapias, con fines anticonceptivos y de reemplazo hormonal que se incorpora en ingesta oral, cremas tópicas, parches transdérmicos o anillos intravaginales. Además, se ha utilizado en animales para la sincronización del celo como pasos previos para la inseminación artificial a tiempo fijo. Todas estas aplicaciones requieren un sistema de liberación prolongado para liberar la hormona a un ritmo controlado para lograr niveles circulantes adecuados (Helbling et al., 2018).

La técnica de micronización representa una de las más importantes ya que actualmente los fármacos deben ser micronizados para que durante la extracción de este se asegure la obtención máxima de este principio activo para así poder lograr un producto final de buena calidad (Díaz et al., 2001).

La progesterona es esencial para el desarrollo temprano del embrión en el útero de la vaca, niveles bajos de progesterona pueden conducir al fracaso precoz de la gestación y al desarrollo deficiente del embrión, lo que podría resultar en la pérdida de la preñez, por lo cual una suplementación con progesterona en estudios que se han realizado en un intento de mejorar las tasas de gestación en vacas, demuestran resultados variables con o sin . Es importante destacar que la eficacia de la suplementación con progesterona depende del momento en que se inicia. Si la suplementación con progesterona iniciada en el momento del inicio de la subida post ovulatoria, que generalmente ocurre entre los días 4 y 5 después de la ovulación, ha producido aumentos consistentes en la tasa de preñez. Esto se debe a que, en este momento, la progesterona es crucial para el mantenimiento del embarazo temprano (Mann et al., 2006).

Además del momento de inicio de la suplementación, el patrón específico de secreción de progesterona materna también es importante para el desarrollo del embrión temprano. Se ha observado que un desarrollo embrionario deficiente se asocia con un aumento post ovulatorio retrasado de la progesterona y concentraciones bajas en la fase lútea posterior. Esto sugiere que no solo la cantidad de progesterona, sino también su patrón de liberación, desempeña un papel en el éxito de la gestación (Mann et al., 2006).

Con la finalidad de mejorar la situación reproductiva del ganado, se ha tratado de reducir la mortalidad embrionaria, para esto se ha utilizado la suplementación de progesterona durante la gestación temprana en el ganado bovino y ovino (Thatcher et al., 1994; Sreenan et al., 1996). La administración de progesterona durante el desarrollo del CL mejora el desarrollo embrionario y la producción de interferón-tau por el embrión (Mann et al., 2006), por lo que inhibe la síntesis de $PGF2\alpha$ (Mann and Lamming, 2001), en cambio bajas concentraciones circulantes de progesterona a principios del período post ovulatorio tienen un efecto negativo en el desarrollo del embrión (Mann and Lamming, 2001), y la elongación del mismo (Forde et al., 2011) y en el transcriptoma endometrial (Forde et al., 2012) en comparación con animales con concentraciones circulantes normales o elevadas de progesterona.

Dado lo mencionado, el momento de la administración de progesterona es muy importante (4 o 5 días post ovulación), debido a que esta hormona aumenta la actividad secretora del

endometrio, influyendo así en el crecimiento embrionario (Garret et al., 1998; Geisert et al., 1992).

La administración como suplemento de progesterona se ha usado en vacas lecheras (Stronge et al., 2005; McNeill et al., 2006), vaquillas lecheras (Parr et al., 2012) y vaquillas productoras de carne (Diskin et al., 2006), sobretodo en animales de alta producción debido a que las hormonas esteroidales (progestágenos y estrógenos) son rápidamente metabolizadas en el hígado en vacas altas productoras debido al flujo sanguíneo (1,600 a 2,000 Litros/h) que circula por el hígado (Bach et al., 2000) y por consiguiente bajos niveles en sangre.

Investigaciones de suplementación con progesterona llevados a cabo en una fase lútea temprana, han resultado variables en términos de tasa de gestación (Johnson et al., 1958; Robinson et al., 1989) y en algunos casos se han reportado resultados negativos. Los resultados diferentes pueden estar relacionadas con el tiempo y la duración del tratamiento de progesterona endógena, así como la forma de alcanzar altos niveles de progesterona.

Garrett et al. (1988) condujeron uno de los primeros trabajos y encontraron un aumento en el desarrollo del embrión en el día 14 con la administración de 100 mg de progesterona entre los días 1 y 4 después de la ovulación. Mann et al. (1999) analizaron estudios en donde se suplementa la progesterona durante la gestación temprana, y observaron significativamente un aumento de la tasa de concepción en un 5% cuando se administra antes del día 6 después de la inseminación artificial en vacas lecheras, por otro lado, la suplementación después del día 6 no tuvo efecto positivo. Se observó que los beneficios de suplementar progesterona fueron más evidentes cuando se utilizan en vacas lactantes de menor fertilidad, con tasas de concepción menores del 50%, también pudiera ser útil para reducir las anovulaciones postparto antes de la siguiente IA, debido a esto se sabe que reduce el rendimiento reproductivo debido a mayores pérdidas de gestaciones (Inskeep, 2002).

5.4. Nuevos sistemas de liberación de la progesterona

Actualmente se ha observado el uso de polímeros mucoadhesivos como bases de ácido poliacrílico y derivados de celulosa para mejorar la eficacia de la liberación y absorción de fármacos en la vagina (Endo et al., 2020). La desventaja de los insertos de polímero no degradables es requerir la eliminación de estas bandas después de su uso (Karuppanan et al., 2017). Actualmente, los estudios se centran en la preparación de micronización incorporada con progesterona para la sincronización del estro. El uso de geles de quitosano con complejos de inclusión basados en ciclodextrinas son una alternativa viable para la administración vaginal de progesterona (Velázquez et al., 2019).

Otros estudios han demostrado que la reticulación con aldehídos del quitosano reduce su biodegradabilidad y, por lo tanto, podría usarse como un vehículo de administración de acción prolongada, por medio de microesferas de quitosano cargadas con progesterona reticuladas con glutaraldehído y evaluando el comportamiento de liberación del fármaco *in vitro* e *in vivo*, se observó que las microesferas de quitosano reticuladas con glutaraldehído son capaces de mantener una concentración sérica más o menos uniforme del esteroide (Jameela et al., 1998).

Los hidrogeles son polímeros hidrófilos reticulados tridimensionales con la capacidad de absorber agua o soluciones acuosas en su estructura. Dependiendo del grado de reticulación química o física, la cantidad de agua absorbida puede variar (Sierra et al., 2017).

Por lo que estos pueden clasificarse como hidrogeles de bajo, medio y alto hinchamiento, de manera que los hidrogeles de alcohol polivinílico debido a su susceptibilidad a los enlaces de hidrógeno y la cristalización excesiva, generalmente ofrecen una capacidad de hinchamiento muy baja, por lo que los hace muy deseables para su aplicación farmacéuticas específicas (Muppalaneni and Omidian, 2013).

Por otro lado, el quitosano (QTS) es un polisacárido catiónico ampliamente utilizado en formulaciones farmacéuticas o para otras aplicaciones biomédicas. Muchos investigadores han destacado sus atractivas propiedades, como la biodegradabilidad, la biocompatibilidad, la capacidad de unión celular, las propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes,

antitumorales y de cicatrización de heridas. Estas y otras características positivas, como las cargas hidrofílicas y catiónicas, hacen del quitosano un polímero adecuado para la administración de ingredientes activos como fármacos, factores de crecimiento, células madre y péptidos (Pizano et al., 2018).

En cuanto a los polímeros sintéticos, el alcohol polivinílico e (PVA) es el más utilizado para la síntesis de hidrogeles con aplicaciones biomédicas y farmacéuticas debido a su alta biocompatibilidad, no toxicidad y no carcinogenicidad. Los estudios sobre el uso de hidrogeles a base de PVA o mezclas con polímeros naturales/sintéticos se reportan con frecuencia en la literatura con aplicaciones tales como apósitos para heridas, cartílago articular artificial, y sistemas de administración de fármacos. Los hidrogeles a base de PVA pueden prepararse mediante reticulación química o física. Los hidrogeles reticulados físicamente han atraído una mayor atención en la investigación (Suflet et al., 2021).

Además, los hidrogeles basados en PVA poseen una elasticidad insuficiente y una hidrofilia limitada, lo que restringe su uso para aplicaciones biomédicas. Por lo tanto, la combinación de PVA con polímeros naturales es una solución para inducir propiedades mecánicas específicas, aumentar la biocompatibilidad y la bioactividad de los materiales (Suflet et al., 2021).

5.5. Su uso en la reproducción animal

La aparición de aplicaciones de nanotecnología en los sistemas de ganadería puede presentar algunas soluciones innovadoras y nuevas para superar los desafíos de la reproducción. Muchos fármacos, moléculas biológicas y nutrientes pueden adquirir nuevas propiedades fisicoquímicas utilizando la nanotecnología, como una mejor biodisponibilidad, mayor absorción celular, una liberación controlada y una menor toxicidad en comparación con las formas ordinarias (Hashem and Gonzalez-Bulnes, 2021).

El uso de dispositivos nanotecnológicos para el diagnóstico de enfermedades animales o como modelos animales para el diagnóstico de enfermedades humanas es un gran logro. Algunos informes sugieren el uso de puntos cuánticos para la obtención de imágenes *in vivo* en modelos de animales pequeños. De igual manera, se han utilizado NPs (nano partículas) funcionalizadas

conjugadas con anticuerpos monoclonales para detectar rápida y específicamente el virus respiratorio sincitial tanto *in vitro* como *in vivo*. Este método puede proporcionar una detección directa, rápida y sensible de los virus y, en contraste con los métodos actuales (Mukhtar et al., 2015).

5.6. Espectroscopía

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier es una técnica analítica utilizada para identificar y cuantificar la composición de una muestra en función de la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas presentes en la muestra. El FTIR utiliza un interferómetro para obtener el espectro infrarrojo completo de la muestra, que luego se utiliza para identificar grupos funcionales y compuestos químicos en la muestra (Wang et al., 2022).

Cuando el tamaño de las células de la muestra es similar al número de onda utilizado en la espectroscopía FTIR, pueden surgir desafíos en la interpretación de los datos, ya que la superposición de bandas de absorción puede dificultar la identificación de los componentes individuales. En tales casos, se recurre al análisis de datos multivariantes. Este tipo de análisis implica el uso de técnicas estadísticas y matemáticas avanzadas para descomponer y analizar los espectros infrarrojos en busca de patrones o información relevante. Algunas técnicas comunes de análisis multivariable incluyen el análisis de componentes principales (PCA) y la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), que ayudan a extraer información significativa de los datos infrarrojos y facilitan la identificación de componentes en muestras complejas (Garza et al., 2013).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Lugar de realización del estudio

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León ubicada en Av. Francisco Villa s/n. Col. Ex Hacienda el Canadá, Gral. Escobedo, N.L. México. CP. 66050.

6.2. Área y tiempo de muestreo

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Reproducción en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. El muestreo de temperatura y pH vaginal de cabras de 2 años se realizó en el Rancho Mary ubicado en Higuera, Nuevo León.

6.3. Preparación de hidrogeles cargados con progesterona

Se sintetizaron 4 hidrogeles cargados con progesterona 0.25 gr/8 ml (4-Pregne-3,20-dione, P0130-100 G, Lote SLBK4894V $\geq 99\%$ de la marca SIGMA Life Science a partir de una solución de quitosano (Sigma Aldrich, catalogo: 419419, alto peso molecular con un grado de desacetilación $\geq 75\%$), al 2% en ácido acético (Acetic acid glacial, ACS reagent, $\geq 99.7\%$ marca Sigma-Aldrich), y una solución de PVA (Sigma Aldrich, catalogo: 341584, PM=89,000-98,000,) al 0.5% y 1% en agua tridestilada Tabla 1.

H1: 5ml QTS (2% p/v) + 5ml PVA (2% p/v) + 2ml PG (.25g) + 5ml NaOH

H2: 5ml QTS (2% p/v) + 5ml PVA (1% p/v) + 2ml PG (.25g) + 5ml NaOH

H3: 5ml QTS (2% p/v) + 10ml PVA (2% p/v) + 2ml PG (.25g) + 5ml NaOH

H4: 5ml QTS (2% p/v) + 10ml PVA (1% p/v) + 2ml PG (.25g) + 5ml NaOH

6.4. Caracterización de los hidrogeles

El análisis de muestra se realiza por medio de luz infrarroja sobre la muestra, de manera que los resultados de estos experimentos presentan algunas variaciones dependiendo del tipo de fuente infrarroja utilizada y la relación obtenida de esta.

Para la preparación de la muestra vario en función a la capacidad del paso de la energía, y se llevó a cabo mediante reflectancia total atenuada (ATR), la cual es utilizada junto con la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Y por último para su interpretación y análisis de resultados, por lo que se requiere de un análisis de datos multivariantes, principalmente cuando el tamaño de las células es similar al número de onda que se utiliza.

6.5. Porcentaje de hinchamiento y degradación

Una vez obtenidos los diferentes hidrogeles, estos se incubaron a 39°C en una solución de fluido vaginal simulado con diferentes valores de pH (4, 5, 6 y 7). El porcentaje de hinchamiento se determinó usando el peso seco hidrogeles y el peso a diferentes tiempos 3, 7, 15, 30 y 60 minutos de incubación, mediante la fórmula (1) para hinchamiento, este porcentaje tiene la función de captar las moléculas de agua que son las que se encuentran presentes en el medio del pH que se utiliza simulando el fluido vaginal. Y para el de degradación se realizó a diferentes tiempos de 0, 3, 7, 15 y 30 días de incubación mediante la fórmula (2), en este porcentaje, la función principal es el captar un porcentaje de agua que a su vez está perdiendo masa por lo cual nos indica que se va degradando.

Este porcentaje de hinchamiento y degradación (W) se determinó mediante la siguiente fórmula:

Donde M_0 corresponde al peso del hidrogel en tiempo cero y M al peso del hidrogel a los diferentes tiempos de evaluación.

Para hinchamiento: 1

Peso tiempo 3, 7, 15, 30 y 60 minutos- peso tiempo cero/peso tiempo cero x 100

$$W = \frac{M - M_0}{M_0} \times 100 (\%)$$

Para degradación: 2

Peso día cero (W_0) - Peso día 3, 7, 15 y 30/Peso tiempo cero x 100

$$W = \frac{M_0 - M}{M_0} \times 100 (\%)$$

6.6. Porcentaje de liberación de la progesterona

Para determinar la liberación de la progesterona de los diferentes hidrogeles formulados estos se pusieron en contacto con una solución de fluido vaginal simulado con valores de pH = 4, 5, 6 y 7. Estos se mantuvieron a 38.9 °C y a diferentes intervalos de tiempo 0, 24, 48 y 72 horas y se tomaron 200 µl de la solución. La solución se centrifugó (Thermo Scientific™ Serie de centrifugas SL 16, 230 V, 50/60Hz) a 1500 revoluciones por minuto y el contenido de progesterona en el sobrenadante se midió en un espectrofotómetro UV-visible a una longitud de onda de 244 nm. La concentración de progesterona se calculó empleando una curva de calibración de progesterona en metanol con una R²= 0.91, y el porcentaje de liberación se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ liberación} = \frac{\text{concentración de progesterona en sobrenadante}}{\text{concentración total de progesterona}} \times 100$$

6.7. Análisis estadístico

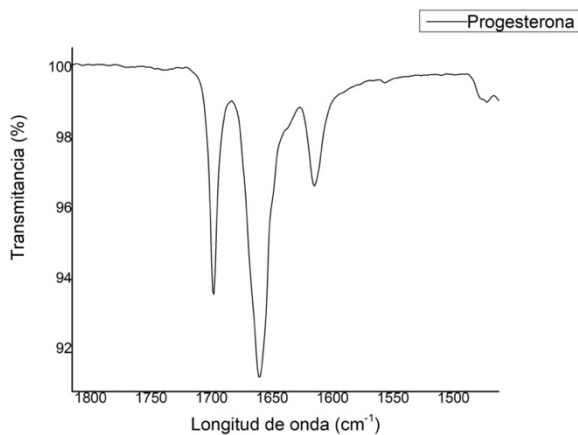
La cinética de liberación *in vitro* se usó como un posible enfoque de la tasa de liberación *in vivo*, dado que el gradiente de concentración de la progesterona es el factor principal que determina la velocidad de liberación. Por lo tanto, la técnica *in vitro* puede usarse como una aproximación de la administración *in vivo*. Se utilizó un modelo mixto que incluye el número de hidrogel, pH, y tipo de mezcla, con sus interacciones respectivas. La probabilidad fue de p<0.05. Se utilizó el paquete estadístico SPSS por sus siglas en inglés Statistical Package for the Social Sciences.

7. RESULTADOS

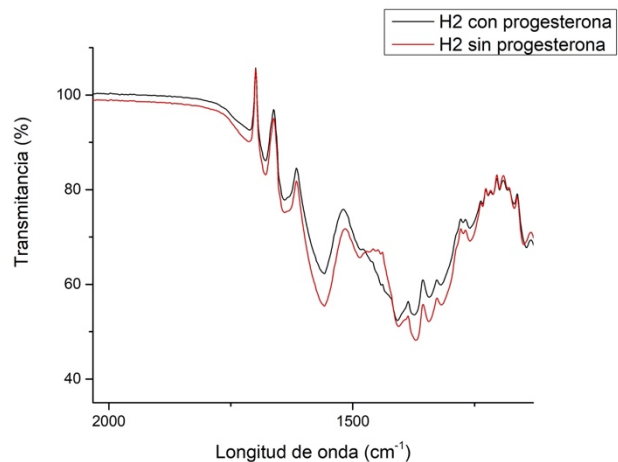
7.1. Caracterización del hidrogel

El espectro IR de la progesterona muestra (Gráfica 1) bandas de absorción y representa un grupo funcional o un tipo de enlace que está presente en las moléculas, de 1500 cm^{-1} - 500 cm^{-1} son enlaces sencillos entre carbono-carbono, carbono-oxígeno, y estos no se toman en cuenta si no que se toman de 1500 cm^{-1} hacia arriba.

Se caracterizó el hidrogel 2 con y sin progesterona (Gráfica 2) la banda en color negro indica que presenta progesterona y la banda color rojo sin progesterona, las bandas de absorción se van recorriendo, lo que se observa es un corrimiento lo que nos indica es que a las moléculas se les está uniendo otra molécula la cual es la progesterona, y el quitosano, con esto se puede inferir que si se está uniendo los grupos funcionales de la hormona al hidrogel.



Gráfica 1: Caracterización de la progesterona



Gráfica 2: Caracterización de hidrogel quitosano con y sin progesterona.

7.2. Porcentaje de hinchamiento y degradación de los hidrogeles

Captación de Agua

La capacidad de captación de agua fue mejor en los hidrogeles 3 y 4 con un pH de 4 (Gráfica 3), en comparación con el resto de los hidrogeles. En la Gráfica 4, en un pH de 5, los hidrogeles 1 y 4 inicialmente tienen una captación mínima de agua, que luego aumenta, mientras que los otros hidrogeles no muestran una captación significativa. En la Gráfica 5, en un pH de 6, la mayoría de los hidrogeles muestran una respuesta favorable en la captación de agua, con excepción del hidrogel 2.

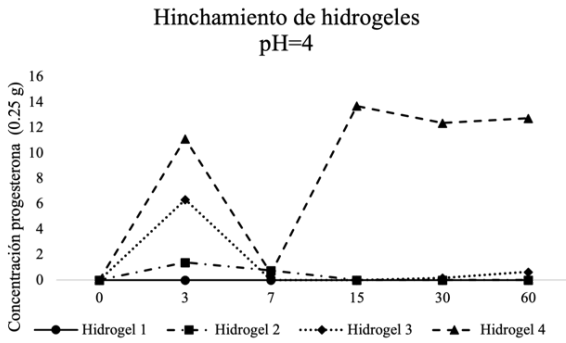
Hinchamiento

La Gráfica 6 muestra el hidrogel 3 con la mejor respuesta en un pH de 7 en términos de hinchamiento, mientras que el hidrogel 2 también muestra una respuesta positiva, pero solo hasta el minuto 7. Esto sugiere que el hidrogel 3 tiene una mayor capacidad de hinchamiento en un pH de 7 en comparación con los otros hidrogeles.

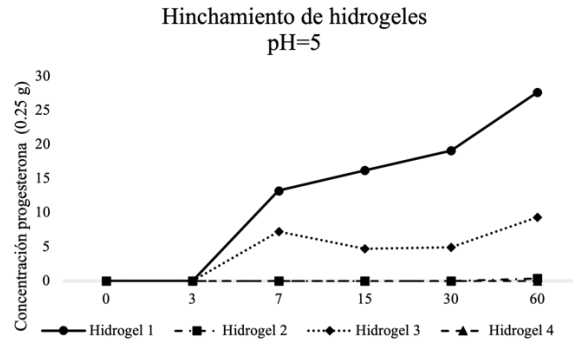
Degradación

Las degradaciones de los hidrogeles en diferentes condiciones de pH se muestran en las Gráficas 7, 8, 9 y 10. Los resultados muestran que la degradación varía según el pH y el hidrogel específico. En general, el hidrogel 3 presenta una buena respuesta a la degradación en pH 7, alcanzando una degradación del 100% para el día 15 (Gráfica 10).

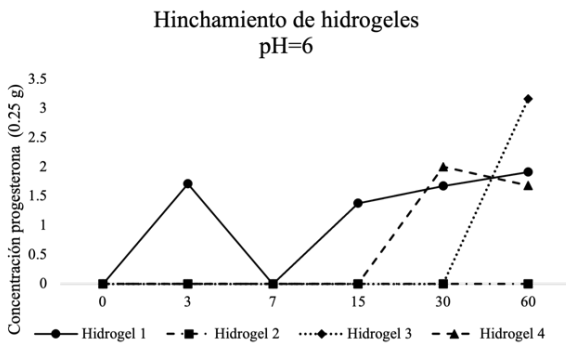
Estos resultados indican que el hidrogel 3 tiene un buen desempeño en términos de hinchamiento y degradación, especialmente en un entorno de pH 7. Estos hallazgos pueden ser útiles en aplicaciones donde se requieran propiedades específicas de los hidrogeles en función del pH.



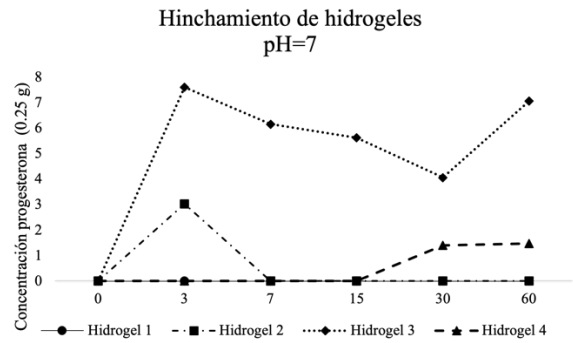
Gráfica 3. Hinchamiento de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 4 a través de 60 minutos a una temperatura de 38.9 °C.



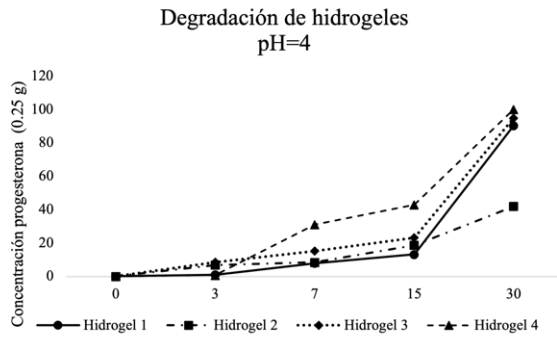
Gráfica 4. Hinchamiento de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 5 a través de 60 minutos a una temperatura de 38.9 °C.



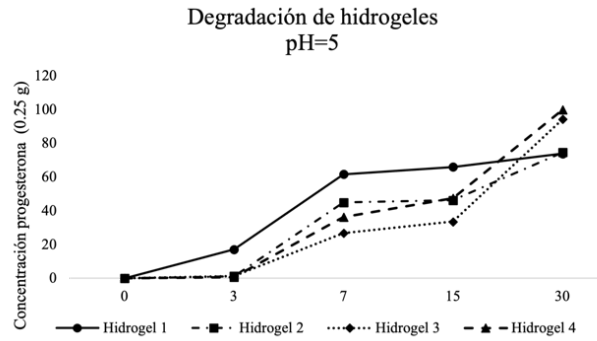
Gráfica 5. Hinchamiento de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 6 a través de 60 minutos a una temperatura de 38.9 °C.



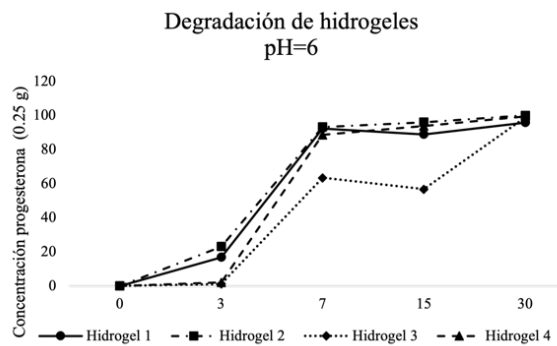
Gráfica 6. Hinchamiento de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 a través de 60 minutos a una temperatura de 38.9 °C.



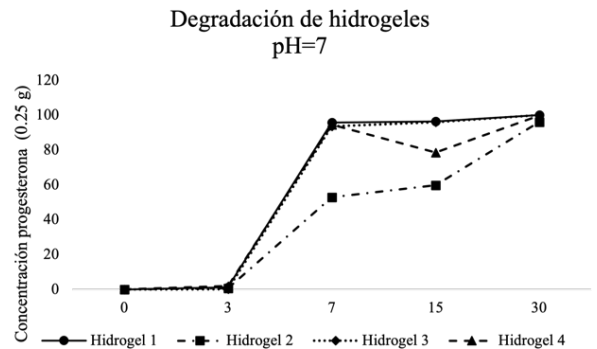
Gráfica 7. Degradación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 4 a través de 30 días a una temperatura de 38.9 °C.



Gráfica 8. Degradación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 5 a través de 30 días a una temperatura de 38.9 °C.



Gráfica 9. Degradación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 6 a través de 30 días a una temperatura de 38.9 °C.

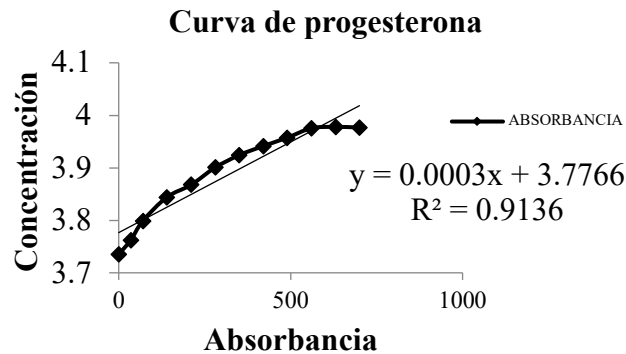


Gráfica 10. Degradación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 a través de 30 días a una temperatura de 38.9 °C.

7.3. Liberación de la progesterona

Los resultados mostrados por el hidrogel 3 a un pH de 7 en términos de captación de agua, hinchamiento y degradación fueron los mejores, debido a esto, se evaluó en diferentes intervalos de tiempo para llegar a obtener la liberación constante de la hormona progesterona a 8, 11, 12, 15, 16 y 21 días (Gráficas 16 – 21), y en un tercer experimento, se tomó el hidrogel 2 a un

intervalo de 30 días (Gráfica 22), el cual fue el único que presentó efecto significativo como se muestra en la Tabla 2.



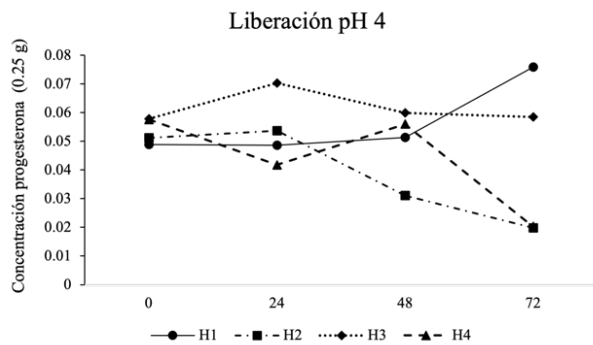
Gráfica 11. Curva de progesterona cuantificación de su liberación a través de 12 diluciones en metanol.

La Gráfica 11 muestra que la curva de progesterona tiene una alta correlación ($R^2=0.9163$), lo que indica que el modelo de predicción se ajusta bien a los valores observados. En la Gráfica 12, se observa la liberación variada de la hormona, en los hidrogeles 1 y 3 mostrando una liberación constante, lo que sugiere que estos hidrogeles son efectivos para mantener una liberación controlada de la hormona en pH 4. En cambio, a pH 5, solo el hidrogel 1 muestra una liberación constante de la hormona en comparación con los otros hidrogeles (Gráfica 13). Cuando los hidrogeles se expusieron a pH de 6, el hidrogel 3 mostró una liberación inicial, seguida de un descenso a las 24 horas y después un descenso adicional a las 72 horas la (Gráfica 14). El resto de los hidrogeles no mostraron una liberación constante. La Gráfica 15, muestra que los hidrogeles 2 y 3 a pH de 7, son los que liberan la hormona de manera constante y alcanzan una liberación total a las 72 horas.

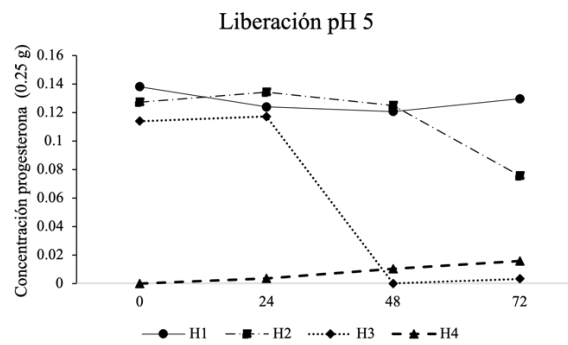
En las Gráficas 16 a 21, se observa un experimento adicional con el hidrogel 3 a pH 7, que muestra una liberación constante de la hormona durante varios días, lo que sugiere que este lapso puede ser adecuado para aplicaciones in vivo.

La evaluación del hidrogel 2 a un pH de 7 se muestra en la Gráfica 22, donde se observa una liberación variada, con un descenso de la hormona a los 8 días y un aumento posterior hasta la liberación total a los 30 días.

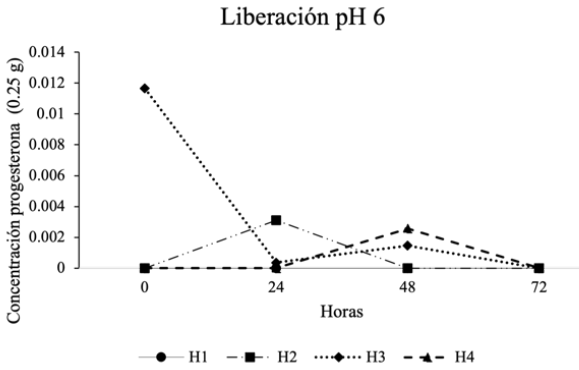
En resumen, los resultados indican que los diferentes hidrogeles tienen un impacto significativo en la liberación de la hormona progesterona a diferentes pH. El hidrogel 3 a un pH 7 fue el mejor con una liberación constante y controlada de la progesterona, mientras que otros hidrogeles y condiciones de pH muestran variabilidad en la liberación.



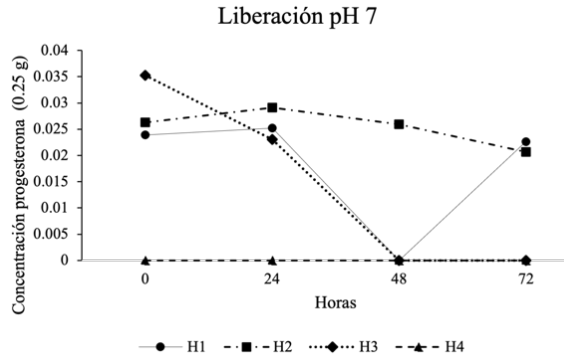
Gráfica 12. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 4 a través de 3 días a una temperatura de 38.9 °C.



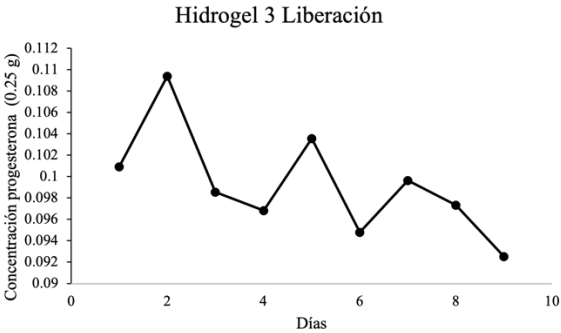
Gráfica 13. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 5 a través de 3 días a una temperatura de 38.9 °C.



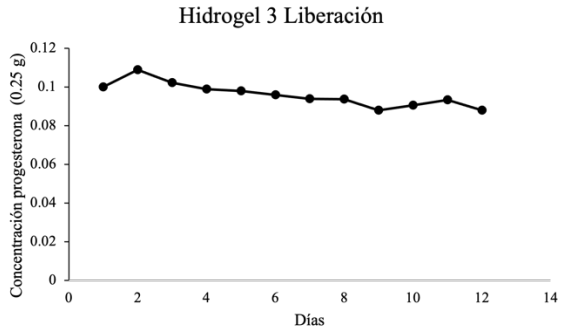
Gráfica 14. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 6 a través de 3 días a una temperatura de 38.9 °C.



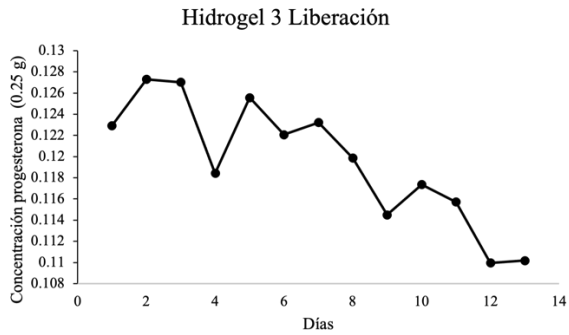
Gráfica 15. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 a través de 3 días a una temperatura de 38.9 °C.



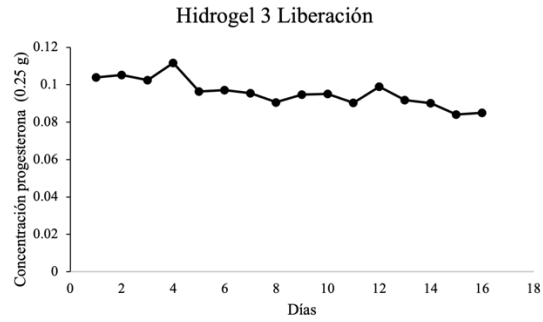
Gráfica 16. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 a través de 8 días a una temperatura de 38.9 °C.



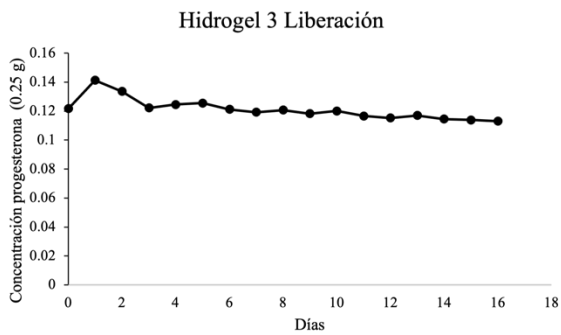
Gráfica 17. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 a través de 11 días a una temperatura de 38.9 °C.



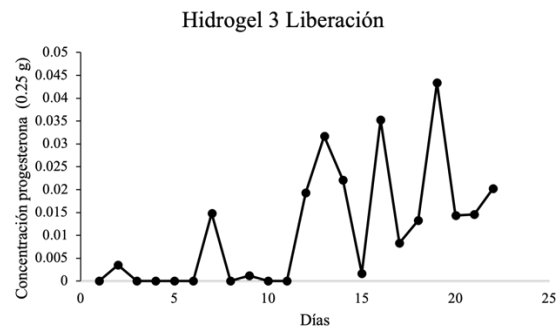
Gráfica 18. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 a través de 12 días a una temperatura de 38.9 °C.



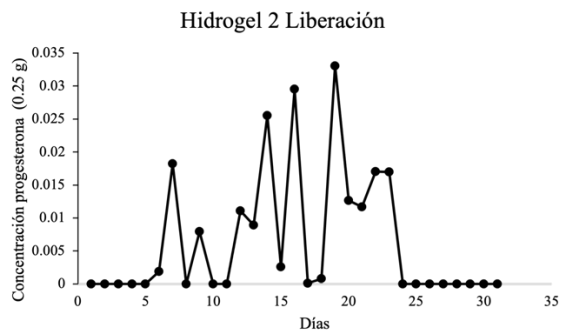
Gráfica 19. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 a través de 15 días a una temperatura de 38.9 °C.



Gráfica 20. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 a través de 16 días a una temperatura de 38.9 °C.



Gráfica 21. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 a través de 21 días a una temperatura de 38.9 °C.



Gráfica 22. Liberación de gel de quitosano en función de la concentración de alcohol polivinílico a un pH de 7 a través de 30 días a una temperatura de 38.9 °C.

Los resultados presentados en la Tabla 1 muestran las variables dependientes de la hormona progesterona indicando que solo el pH y el tipo de mezcla tuvo efecto significativo sobre las interacciones.

Tabla1. Efectos principales en hidrogeles conteniendo quitosano y progesterona en diferentes concentración de alcohol polivinílico a distintos valores de pH y su interacción.

	Factores						
	Nr hidrogel (NH)	pH	Tipo mezcla (TM)	NH×pH	NH×TM	pH×TM	NH×pH×TM
Valor P	<0.0001	<0.0001	0.03	<0.0001	ns	<0.0001	ns

Fuente variación	Concentración de progesterona μ l	Fuente variación	Concentración de progesterona μ l
Número Hidrogel		NH×TM	
I	0.038 ± 0.005	I	0.046 ± 0.007
II	0.039 ± 0.005	II	0.044 ± 0.007
III	0.009 ± 0.005	III	0.021 ± 0.007

IV	0.0 ± 0.005	IV	0.0 ± 0.007
pH		Fuente variación	Concentración de progesterona µl
4	0.036 ± 0.005	pH×TM	
5	0.054 ± 0.005	I	0.050 ± 0.007
6	0.000 ± 0.005	II	0.075 ± 0.007
7	0.0 ± 0.005	III	0.0 ± 0.007
		IV	0.0 ± 0.007

Tipo mezcla

Sobrenadante	0.024 ± 0.003
--------------	---------------

En la tabla 2 se muestran las interacciones del hidrogel de las cuales solamente el tiempo de incubación presento efecto significativo.

Tabla 2. Efectos principales en hidrogel 2 conteniendo quitosano y progesterona en diferentes concentraciones de alcohol polivinílico a un pH de 7 por 30 días.

Factores			
	Tiempo incubación (TI)	Tipo mezcla (TM)	TI×TM
Valor P	0.003	0.038	0.999

Fuente variación	Concentración de progesterona µl
Tiempo	
0	0.048 ± 0.013
1	0.059 ± 0.013
2	0.058 ± 0.013
3	0.053 ± 0.013
4	0.061 ± 0.013
5	0.061 ± 0.013

6	0.067 ± 0.013
7	0.066 ± 0.013
8	0.060 ± 0.013
9	0.061 ± 0.014
10	0.058 ± 0.014
11	0.069 ± 0.014
12	0.066 ± 0.015
13	0.060 ± 0.017
14	0.049 ± 0.017
15	0.058 ± 0.017
16	0.041 ± 0.019
17	0.010 ± 0.024
18	0.029 ± 0.024
19	0.033 ± 0.024
20	0.006 ± 0.024
21	0.016 ± 0.024
22	0.010 ± 0.033
23	0.0 ± 0.033
24	0.0 ± 0.033
25	0.0 ± 0.033
26	0.0 ± 0.033
27	0.0 ± 0.033
28	0.0 ± 0.033
29	0.0 ± 0.033
30	0.0 ± 0.033

Tipo mezcla

Sobrenadante	0.026 ± 0.006
--------------	-------------------

8. DISCUSIÓN

La creación, transformación y aplicación de nuevas tecnologías, desarrollo de métodos o técnicas en las diferentes especies buscan tener un impacto significativo en la mejoría de índices reproductivos, productivos, salud y bienestar animal tanto en especies de producción como de compañía y no convencionales.

Van Werven et al. (2013) compararon dos dispositivos intravaginales liberadores de progesterona, el PRID-Delta (Progesterone-releasing intravaginal device) y el CIDR (Controlled internal drug release) en vacas lecheras. Observaron que una mayor área de contacto de los dispositivos intravaginales con la pared vaginal puede influir en la tasa de liberación de progesterona. Cuando hay más superficie de contacto, la absorción y liberación de la hormona pueden ser más efectivas. Por lo tanto, en el presente estudio, la creación in vitro de un hidrogel intravaginal libera progesterona constantemente por el contacto permanente, además, el hidrogel es reabsorbido por la mucosa vaginal, sin la necesidad de retirar un dispositivo (que en la actualidad son utilizados) debe ser retirado después de días de haber sido colocado, y por lo tanto se crea la necesidad de eliminar el material.

El presente estudio demuestra que se pudo obtener hidrogeles con liberación controlada de progesterona en el laboratorio (in vitro), utilizando polímeros biodegradables, biocompatibles y mucoadhesivos como el quitosano (QTS) y el alcohol polivinílico (PVA). Esto, marca el desarrollo de un nuevo dispositivo biocompatible y que tiene buenas características que le permiten ser implementado en el futuro como un medio de liberación del fármaco Endo et al. (2020). Helbling et al. (2018) consideraron el uso de la progesterona a base de hidrogel, con la finalidad de su uso en la sincronización del celo y control del ciclo reproductivo para inseminación artificial a tiempo fijo, lo cual marcaría el desarrollo de nuevos dispositivos biocompatibles.

Los hidrogeles obtenidos con las mezclas de PVA y quitosano tienen propiedades mecánicas diferentes a los hidrogeles de PVA puro, este último es muy flexible y tiene una baja capacidad de absorción de acuerdo a Escobar-Sierra y Perea-Mesa (2017). En cambio, los hidrogeles realizados con PVA, quitosano y progesterona tienen una buena liberación y capacidad de absorción.

En cambio, los hidrogeles realizados con PVA, quitosano y progesterona tienen una buena liberación y capacidad de absorción como lo mencionan Velazquez et al. (2019) los geles de quitosano con complejos de inclusión permiten una liberación controlada de la progesterona en la mucosa vaginal. Esto puede ser beneficioso en situaciones en las que se requiere una dosis constante de progesterona durante un período prolongado, usándolos como un vehículo de administración de acción prolongada como lo observamos en la investigación de Jameela et al. (1998), el uso de microesferas de quitosano reticuladas con glutaraldehído para mantener una concentración sérica más uniforme de la progesterona, esta es una estrategia común en la formulación de sistemas de liberación controlada de progesterona. Muppalaneni y Omidian (2013) consideraron de bajo, medio y alto hinchamiento, de manera que para este presente estudio la baja capacidad de hinchamiento de los hidrogeles de PVA fue beneficiosa, esto debido a que son sensibles a la humedad o que pueden degradarse en un entorno acuoso (como el medio normal de la vagina). Los hidrogeles de PVA proporcionan una barrera protectora que ayudo a preservar la estabilidad de la hormona, sin embargo, es importante destacar que la elección del hidrogel adecuado depende de las necesidades específicas de la aplicación farmacéutica y de las propiedades deseadas del producto final.

Los resultados de Mann et al. (2006), donde se observaron que la suplementación de progesterona al inicio de la fase lútea (días 5-9) mejoraba el desarrollo embrionario y la secreción de interferones anti luteolíticos en vacas, mientras que no se encontró este efecto cuando la suplementación se realizaba después del día 12, es razonable esperar resultados similares en cabras. Dado que las cabras también tienen ciclos reproductivos similares a las vacas, con fases lúteas y ovulatorias, es posible que los efectos de la suplementación de progesterona en las cabras sigan un patrón similar al observado en las vacas en términos de mejora en el desarrollo embrionario. Sin embargo, es importante recordar que cada especie puede tener particularidades en su ciclo reproductivo y respuestas hormonales específicas. Por lo tanto, aunque sea razonable esperar resultados similares en las cabras basados en el estudio en vacas, se procederá a realizar la investigación *in vivo*.

La creación, transformación y aplicación de nuevas tecnologías, desarrollo de métodos o técnicas en las diferentes especies tienen un impacto significativo en la mejora de características genéticas, rendimiento reproductivo, calidad de la descendencia y la salud general de los animales.

Es importante destacar que la realización de experimentos en animales debe llevarse a cabo con el debido cuidado y consideración ética, asegurando el bienestar y la integridad de los animales involucrados. Además, cualquier aplicación a gran escala en diferentes especies debe ser evaluada cuidadosamente en términos de seguridad, efectividad y beneficios tanto para los animales como para los seres humanos.

El éxito de este experimento aplicándolo *in vivo* podría tener un impacto significativo en mayor obtención de crías, productos y alimentos en el futuro.

9. CONCLUSIONES

En conclusión, el hidrogel 3 (HG3, 5ml quitosano al 2% + 10ml alcohol polivinílico al 2% + 2ml PG (0.25g) + 5ml NaOH, presento el mejor comportamiento en términos de hinchamiento, degradación controlada y liberación de progesterona en un medio vaginal sintético *in vitro* a un pH de 7 y de acuerdo a la temperatura (38.9°C) vaginal monitoreada durante el ciclo estral de cabras.

De acuerdo a lo anterior, se sugiere que este gel o dispositivo intravaginal libera en forma constante el 100% de progesterona durante 14 días. Por lo tanto, en futuros estudios el HG3 debe utilizarse como principal dispositivo en experimentos *in vivo*.

10. LITERATURA CITADA

1. Bach, A., Huntington, G.B., Calsamiglia, S., Stern, M.D., 2000. Nitrogen metabolism of early lactation cows fed diets with two different levels of protein and different amino acid profiles. *Journal of Dairy Science*. 83, 2585-2595.
2. Barraza-Garza, Guillermo, de la Rosa, Laura A., Martínez-Martínez, Alejandro, Castillo-Michel, Hiram, Cotte, Marine, and Alvarez-Parrilla, Emilio. 2013. La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista latinoamericana de química*, 41(3), 125-148.
3. Cable JK and Grider MH. 2021. *Physiology, Progesterone*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
4. Díaz, Iverlis, Mastromarco, Antonio, and Mastromarco, Luigi. 2001. Micronización: Su aplicación tecnológica en la elaboración de formas farmacéuticas terminadas. *Revista Cubana de Farmacia*, 35(3), 159-164.
5. Diskin, M.G., Murphy, J.J., and Sreenan, J.M., 2006. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 297-311.
6. Endo, N., Rahayu, L. P., Yamamura, T., Tanaka, H., and Tanaka, T. 2020. Intravaginal administration of progesterone using a new technique for sustained drug release in goats. *The Journal of reproduction and development*, 66(5), 489–492.
7. Escobar-Sierra, D. M., Perea-Mesa, Y. P. (2017). Manufacturing and evaluation of Chitosan, PVA and Aloe Vera hydrogels for skin applications. *DYNA*, 84(203), 134-142.
8. Figueroa-Pizano, M.D., I. Vélaz, F.J. Peñas, P. Zavala-Rivera, A.J. Rosas-Durazo, A.D. Maldonado-Arce, M.E. Martínez-Barbosa. Effect of freeze-thawing conditions for preparation of chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogels and drug release studies, *Carbohydrate Polymers Volume 195*, 2018, Pages 476-485.
9. Forde, N., Beltman, M. E., Duffy, G. B., Duffy, P., Mehta, J. P., O’Gaora, P., Roche, J. F., Lonergan, P., Crowe, M. A., 2011. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol. Reprod.* 84, 266–278.

10. Forde, N., Duffy, G.B., McGettigan, P.A., Browne, J.A., Mehta, J.P., 2012. Evidence for an early endometrial response to pregnancy in cattle: Both dependent upon and independent of interferon tau. *Physiol. Genomics*.44, 799-810.
11. Garret, J.E., Geisert, R.D., Zavy, M.T., Gries, L.K., Wettemann, R.P., Buchanan, D.S., 1998. Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F2a release and the interestrous interval in the bovine. *Prostaglandins*. 36, 85–96.
12. Geisert, R.D., Morgan, G.L., Short Jr., E.C., Zavy, M.T., 1992. Endocrine events associated with endometrial function and concepts development in cattle. *Reprod. Fertl. Dev.* 4, 301-305.
13. Graham, J.D., Christine L. Clarke, *Physiological Action of Progesterone in Target Tissues*, *Endocrine Reviews*, Volume 18, Issue 4, 1 August 1997, Pages 502–519.
14. Haomin Wang, Qing Xie, and Xiaoji G. Xu., (2022). Super resolution midinfrared spectromicroscopy of biological applications through tapping mode and peak force tapping mode atomic force microscope, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 180, 2022.
15. Hashem, N. M., and Gonzalez-Bulnes, A. (2021). Nanotechnology and Reproductive Management of Farm Animals: Challenges and Advances. *Animals*, 11(7), 1932. MDPI AG.
16. Helbling, I.M., Busatto, C.A., Fioramonti, S.A. et al. Preparation of TPP-crosslinked chitosan microparticles by spray drying for the controlled delivery of progesterone intended for estrus synchronization in cattle. *Pharm Res* 35, 66 (2018).
17. Inskeep, E. K., 2002. Factors that affect embryonic survival in the cow: Application of technology to improve calf crop. In *Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction*, Michael J. Fields, Robert S. Sand, Joel V. Yelich, Eds. CRC Press, Boca Raton FL 2000.19, 255-279.
18. Jameela, S.R., T.V. Kumary, A.V. Lal, A. Jayakrishnan, Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long-acting biodegradable-controlled delivery system, *Journal of Controlled Release*, Volume 52, Issues 1–2, 1998, Pages 17-24, ISSN 0168-3659.
19. Johnson, K.R., Ross, R.H., Fourth, D.L., 1958. Effect of progesterone administration on reproductive efficiency. *J. Anim. Sci.* 17, 386-390.

20. Mann, G.E., Fray, M.D., Lamming, G.E., 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon tau production in the cow. *Vet. J.* 171, 500-503.
21. Mann, G.E., Lamming, G.E., Robinson, R.S., Wathes, D. C., 1999. The regulation of interferon- production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 317-328.
22. McNeill, R.E., Diskin, M.G., Sreenan, J.M., Morris, D.G., 2006. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology.*65, 1435-1441.
23. Muppalaneni, S., Omidian, H. (2013). Polyvinyl alcohol in medicine and pharmacy: a perspective. *J. Dev. Drugs*, 2(3), 1-5.
24. Natalia S. Velázquez, Ludmila N. Turino, Julio A. Luna, Luciano N. Mengatto, Progesterone loaded thermosensitive hydrogel for vaginal application: Formulation and in vitro comparison with commercial product, *Saudi Pharmaceutical Journal*, Volume 27, Issue 8, 2019, Pages 1096-1106, ISSN 1319-0164.
25. Orizaba-Chávez B., Alba-Jasso G., Ocharan Hernández M., (2013) Farmacocinética de la progesterona. Artículo de revisión, México.
26. Parr, M. H., Mullen, M. P., Crowe, M. A., Roche, J. F., Lonergan, P., Evans, A. C. O., Diskin, M. G., 2012. Relationship between pregnancy per artificial insemination and early luteal concentrations of progesterone and establishment of repeatability estimates for these traits in Holstein-Friesian heifers. *J. Dairy Sci.* 95, 2390–2396.
27. Robinson, N. A., Leslie, E. K., Watson, J. S., 1989. Effect of Treatment with Progesterone on Pregnancy Rate and Plasma Concentration of Progesterone in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 72, 202.
28. Siemienowicz, K.J., Wang, Y., Marečková, M. et al. Early pregnancy maternal progesterone administration alters pituitary and testis function and steroid profile in male fetuses. *Sci Rep* 10, 21920 (2020).
29. Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Dunne, L.D., 1996. Embryo mortality: the major cause of reproductive wastage in cattle. In: *Proceedings of the 47th Annual Meeting of the European Association of Animal Production*, Lillhammer.

30. Stronge, A.J., Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Mee, J.F., Kenny, D.A., Morris, D.G., 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 64, 1212-1224.
31. Suflet DM, Popescu I, Pelin IM, Ichim DL, Daraba OM, Constantin M, Fundueanu G. Dual Cross-Linked Chitosan/PVA Hydrogels Containing Silver Nanoparticles with Antimicrobial Properties. *Pharmaceutics*. 2021 Sep 13;13(9):1461. doi: 10.3390/pharmaceutics13091461. PMID: 34575536; PMCID: PMC8465188.
32. Thatcher, W.W., Staples, C.R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B., Schmitt, E.P., 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl. 3), 16–30.
33. Van Werven, F. Waldeck, A.H. Souza, S. Floch, M. Englebienne, Comparison of two intravaginal progesterone releasing devices (PRID-Delta vs CIDR) in dairy cows: Blood progesterone profile and field fertility *Animal Reproduction Science*, Volume 138, Issues 3–4, 2013, Pages 143-149, ISSN 0378-4320.
34. Vandana, K. R., Prasanna Raju, Y., Harini Chowdary, V., Sushma, M., and Vijay Kumar, N. (2014). An overview on in situ micronization technique - An emerging novel concept in advanced drug delivery. *Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 22(4), 283–289.
35. Vegeto E, Shahbaz M, Wen X, Golman M, O'Malley B, McDonnell D. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell -and promoter- specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 1993 7: 1244-55.
36. Muktar, Yimer., and Bikila, Teshome and Bezabih, Migbaru. (2015). Application of Nanotechnology for Animal Health and Production Improvement: A Review.