



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANTICOAGULANTES SOBRE  
A RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA DE ÉGUAS  
SUPEROVULADAS**

LUCAS TRONCARELLI RODRIGUES

Botucatu, São Paulo  
Outubro/2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANTICOAGULANTES SOBRE  
A RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA DE ÉGUAS  
SUPEROVULADAS**

LUCAS TRONCARELLI RODRIGUES

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu, São Paulo  
Outubro/2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rodrigues, Lucas Troncarelli.

Efeito da administração de anticoagulantes sobre a recuperação embrionária de éguas superovuladas / Lucas Troncarelli Rodrigues. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504002

1. Embriões. 2. Fertilização. 3. Oócitos. 4. Ovulação.

Palavras-chave: embrião; extrato de pituitária equina; fertilização; oócito; ovulação múltipla.

Nome do autor: Lucas Troncarelli Rodrigues

Data da Defesa da Dissertação: 01 de outubro de 2019.

Título: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANTICOAGULANTES SOBRE A RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA DE ÉGUAS SUPEROVULADAS.

### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP -  
Botucatu / SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP -  
Botucatu / SP

Profa. Dra. Priscilla Nascimento Guasti

Membro

Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF – Garça / SP

*“Faço tudo o que posso, tento fazer o possível e lá na frente quando olhar pra trás vou ver que fiz o impossível.”*

*São Francisco de Assis*

#### *DEDICATÓRIA*

*Aos meus pais João Miguel e Regina Célia, minha irmã Isabella, por todo amor, carinho e apoio durante esses anos todos.*

*Aos meus avós Edmundo (in memoriam) e Odila, que são meu alicerce e percussores de mais este sonho em minha vida que se realiza.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar presente em minha vida, pela proteção, saúde e por guiar-me sempre no caminho certo em mais esta etapa que estou concluindo.

Aos meus pais e toda minha família que estiveram sempre ao meu lado e deram todo apoio.

A minha namorada Mariana Frasson pelo intenso apoio e companheirismo.

Ao meu orientador, Professor Doutor Frederico Ozanam Papa, pela amizade, confiança, incentivo e pelos conhecimentos e ensinamentos transmitidos nestes dois anos, que me proporcionaram a conquista deste título de mestre. Muito obrigado!

Aos demais professores do Departamento de Reprodução Animal, o meu agradecimento e respeito pela contribuição, conhecimento e experiência transmitida.

Aos meus grandes amigos Luiz Roberto e Sidnei Nunes.

Aos colegas e amigos do CERAN: Lucas Canuto, Lorenzo, Guilherme, Rafael, Erick, Felipe, Mariana, Thaís, Verônica, Patricia e Priscilla.

Ao José Dell'Aqua e Márcio Teoro pela grande amizade, ensinamentos e intensa disponibilidade e colaboração para ajuda na execução e concretização deste trabalho.

Ao Prof. Marco pela colaboração e contribuição para realização deste trabalho.

Ao Prof. Nereu e Prof. João pela amizade e conhecimentos transmitidos.

A Profa. Regina K. Takahira e ao Maurício Wilmsen do Laboratório Clínico Veterinário, que foram fundamentais para concretização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Hemostasia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – UNESP/Botucatu, principalmente a Cristina pela ajuda para realização das provas de coagulação.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução: Edivaldo, Felipe, Edilson, Raquel e Paulo.

A todos os residentes e estagiários que auxiliaram durante esta pesquisa.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu/SP pelo meu crescimento profissional.

À Botupharma e a Eurofarma que auxiliou no desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## LISTA DE ABREVIATURAS

mL: Mililitro  
mm: Milímetro  
cm: Centímetro  
µc: Micras  
UI: Unidades Internacionais  
Kg: Quilograma  
µg: Microgramas  
ADH: Hormônio Antidiurético  
AT III: Antitrombina III  
CASA: Análise Computadorizada do Movimento Espermático  
eCG: Gonadotrofina Coriônica Equina  
EPE: Extrato de Pituitária Equina  
FSH: Hormônio Folículo Estimulante  
LH: Hormônio Luteinizante  
FIV: Fertilização *in vitro*  
FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
FSHe: Hormônio Folículo Estimulante Equino  
FSH-P: Hormônio Folículo Estimulante Suíno  
GIFT: Transferência intra-falopiana de gametas  
GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas  
hCG: Gonadotrofina Coriônica Humana  
HNF: Heparina não fracionada  
HPBM: Heparina de baixo peso molecular  
ICSI: Injeção intracitoplasmática de espermatozoide  
IM: Intramuscular  
IV: Intravenoso  
NaCl: Cloreto de Sódio  
P4: Progesterona  
PGF2 $\alpha$ : Prostaglandina F2 $\alpha$   
TE: Transferência de Embriões



TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

TP: Tempo de Protrombina

UNESP: Universidade Estadual Paulista

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Média $\pm$ desvio padrão dos valores do tempo de tromboplastina parcial ativada e do tempo de protrombina, em segundos, nos diferentes tempos avaliados nos grupos com aplicação do anticoagulante heparina sódica.....	51
TABELA 2 – Média e desvio padrão das variáveis para cada tratamento.....	52
TABELA 3 – Descrição das variáveis de éguas que ovularam no mínimo três folículos em um ovário.....	53
TABELA 4 – Média e desvio padrão em relação aos valores hematológicos de referências nos grupos que receberam anticoagulante nos diferentes tempos avaliados.....	53
TABELA 5 – Média e desvio padrão dos valores do tempo de tromboplastina parcial ativado e do tempo de protrombina, em segundos, nos diferentes tempos avaliados no grupo superovulado com aplicação do anticoagulante heparina sódica.....	54
TABELA 6 – Média $\pm$ desvio padrão dos valores da dosagem do fator anti-Xa em UI/mL, nos diferentes tempos avaliados no grupo superovulado com aplicação do anticoagulante enoxaparina sódica.....	54

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Representação esquemática do protocolo utilizado no grupo 1 (controle)...45
- FIGURA 2 - Representação esquemática do protocolo utilizado no grupo 2 (superovulado com EPE e administrado solução fisiológica NaCL 0,9%) .....46
- FIGURA 3 - Representação esquemática do protocolo utilizado nos grupos 3 e 4 (superovulado com EPE e administrado um dos anticoagulantes) .....47

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	2
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1. Aspectos anatômicos e endocrinológicos da égua.....	4
2.2. Fisiologia do ciclo estral.....	7
2.2.1. Dinâmica folicular.....	8
2.2.2. Processo ovulatório.....	9
2.3. Transferência de embriões.....	10
2.4. Superovulação.....	12
2.4.1. Hormônios utilizados na superovulação.....	13
2.4.1.1. Extrato de Pituitária Equina (EPE).....	14
2.4.1.2. Hormônio Folículo Estimulante Equino (FSHe).....	15
2.4.1.3. Hormônio folículo estimulante equino recombinante (FSHre).....	16
2.4.2. Início do tratamento superovulatório.....	16
2.4.3. Dose e frequência das aplicações.....	17
2.4.4. Indução da ovulação.....	18
2.4.5. Resposta ovariana.....	19
2.5. Anticoagulantes.....	20
2.5.1. Anticoagulantes parenterais não fracionadas (HNF).....	20
2.5.2. Anticoagulantes parenterais fracionados ou de baixo peso molecular (HBPM).....	23
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
<b>HIPÓTESE</b> .....	35
<b>OBJETIVOS</b> .....	35
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	36
<b>ARTIGO 1: AUMENTO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA COM O USO DE ANTICOAGULANTES EM ÉGUAS SUPEROVULADAS</b>	

RODRIGUES, L.T. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANTICOAGULANTES SOBRE A RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA DE ÉGUAS SUPEROVULADAS. Botucatu – SP. 2019. 82p. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

## RESUMO

A superovulação é uma biotécnica utilizada nos programas de transferência de embrião e proporciona diversos benefícios devido ao maior número de ovulações por ciclo. Entretanto, os protocolos superovulatórios na espécie equina ainda não são utilizados rotineiramente, pois apresentam resultados inconsistentes relacionados a baixa taxa de recuperação embrionária frente ao número de ovulações, estando muito aquém do esperado quando comparado a espécie bovina. Atualmente, sabe-se que uma das possíveis causas responsáveis por este fato pode estar relacionada pela formação de grandes coágulos de sangue obstruindo a fossa da ovulação, dificultando assim a captação do oócito para o interior da tuba uterina. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da utilização de dois tipos de anticoagulantes parenterais (heparina não fracionada - HNF e heparina de baixo peso molecular - HBPM) em éguas superovuladas com extrato de pituitária equina (EPE), sobre a posterior taxa de recuperação embrionária. Foram utilizados quatro ciclos estrais de 11 éguas, sendo subdivididos em quatro grupos: Grupo 1 (G1) utilizado como controle; Grupo 2 (G2) receberam 25 mg de EPE intramuscular (IM) a cada 12 horas sendo a primeira e a terceira administração associada a 5 mg de dinoprost-trometamina (IM) e solução fisiológica 0,9% única aplicação 35 horas após indução da ovulação; Grupo 3 (G3) foi utilizado mesmo protocolo superovulatório, sendo substituído a solução fisiológica por um dos anticoagulantes, Heparina Sódica 450 UI/Kg/IV, e Grupo 4 (G4) onde as éguas foram superovuladas pelo mesmo protocolo mencionada acima e receberam 1 mg/Kg/IV de Enoxaparina Sódica. Os animais foram aleatoriamente designados aos quatro grupos em *cross-over design*, nos quais todos foram submetidos a todos os tratamentos. O intervalo de um ciclo estral para cada égua foi utilizado entre os tratamentos. Os tratamentos foram iniciados no sétimo dia pós-ovulação. A duração do tratamento com EPE não excedeu oito dias, sendo interrompido quando a maioria dos folículos atingissem diâmetro adequado para indução da ovulação. A indução da ovulação foi realizada utilizando 1 ml (250µg) de GnRH (Histrelina Acetato) intramuscular e 2500 UI de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) intravenoso quando o(s) folículo(s) atingisse um diâmetro médio entre eles de 35 mm em ambos os grupos. A partir da indução da ovulação, 24 horas após as éguas foram inseminadas com sêmen a fresco de um garanhão de fertilidade comprovada. A colheita de embriões foi realizada no nono dia após a primeira ovulação detectada. Para cada animal submetido ao tratamento com anticoagulante foram realizadas avaliações laboratoriais (hemograma e coagulograma). Para isso foram padronizados os seguintes momentos de avaliação; para hemograma as amostras de sangue foram coletadas nos momentos prévio a administração do anticoagulante (T0 hora) servindo como controle, e três horas após a aplicação do anticoagulante (T3 horas), já para o coagulograma as amostras foram coletadas nos momentos T0, T1, T2, T3, T6, T9 e T12 horas após aplicação do anticoagulante. Os resultados demonstraram maior ( $p < 0,05$ ) número de ovulações nos grupos de éguas superovuladas (G2 –  $4,6 \pm 0,4$ ; G3 –  $5,2 \pm 0,5$ ; G4 –  $4,9 \pm 0,6$ ) em relação ao G1 ( $1 \pm 0$ ). Já o número de embriões recuperados por égua não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre o G1 ( $0,6 \pm 0,2$ ) e G2 ( $1,6 \pm 0,5$ ), no entanto, foi maior para os grupos que receberam anticoagulantes G3 ( $2,5 \pm 0,3$ ) e G4 ( $2,6 \pm 0,6$ ) em relação ao G1. Quando a taxa

de recuperação embrionária por folículo ovulado foi avaliado, os resultados demonstraram que os grupos tratados com anticoagulantes apresentaram taxas similares (G3 – 50%; G4 – 52%) em comparação ao grupo controle (G1 – 64%), já o grupo superovulado controle (G2 – 36%) apresentou tendência de redução ( $P = 0,8$ ) em relação ao G1. Em relação a avaliação laboratorial, os valores hematológicos dos animais em ambos os grupos que receberam anticoagulante (G3 e G4) no momento T3 horas não diferiu ( $p > 0,05$ ) em relação ao momento T0 hora, mantendo-se dentro dos valores de referência. Quanto ao coagulograma, para o G3 os valores de tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) a partir de uma hora após aplicação (T1 hora) apresentou aumento significativo se manteve até doze horas após aplicação (T12 horas), onde todos os momentos diferiram-se ( $p < 0,05$ ) em relação ao momento (T0 hora), já para o tempo de protrombina (TP) houve um aumento ( $p < 0,05$ ) após aplicação do anticoagulante (T1-T2 horas) em relação ao tempo de avaliação pré aplicação (T0 hora), reduzindo-se gradativamente a partir de três horas até doze horas após aplicação (T3-T12 horas), não diferindo ( $p > 0,05$ ) em relação do T0 hora. Para o G4, uma hora após a aplicação (T1 hora) houve um aumento ( $p < 0,05$ ) da atividade plasmática fator anti-Xa, apresentando um constante declínio até doze horas (T12), não apresentando diferença ( $p > 0,05$ ) apenas neste momento em relação ao T9 horas e T0 hora. Desta forma, pode-se concluir que o protocolo proposto no presente estudo é uma alternativa para melhoria das taxas de recuperação embrionária em éguas superovuladas com EPE, mostrando-se seguro para o uso de ambos os tipos de anticoagulantes sem apresentar alterações hematológicas ou efeitos adversos que possam comprometer ou colocar em risco a condição clínica do animal.

**Palavras-chave:** embrião, extrato de pituitária equina, fertilização, oócito, ovulação múltipla.

RODRIGUES, L.T. EFFECT OF ANTICOAGULANTS ON EMBRYONIC RECOVERY IN SUPEROVULATED MARES. Botucatu – SP, Brazil. 82p. São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science.

### ABSTRACT

Superovulation is a biotechnic from embryo transfer programs providing several benefits due to the higher number of ovulations per cycle. However, superovulation protocols in the equine species are not yet routinely used, as they present inconsistent results related to the low embryonic recovery rate concerning the number of ovulations, being far below expectations when compared to the bovine species. Currently, one of the possible causes responsible for this fact may be related to the development of large blood clots obstructing the ovulation fossa, making it difficult to capture the oocyte into the fallopian tube. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of two types of parenteral anticoagulants (unfractionated heparin - HNF and low molecular weight heparin - LMWH) on equine pituitary extract (EPE) superovulated mares of embryonic recovery. Four estrous cycles of 11 mares were used and subdivided into four groups: Group 1 (G1) as a control; Group 2 (G2) received 25 mg intramuscular EPE (MI) every 12 hours being the first and third administration associated with 5 mg dinoprost-tromethamine (IM) and 0.9% saline only application 35 hours after ovulation induction; Group 3 (G3) in the same superovulation protocol, replacing the physiological solution with one of the anticoagulants, Sodium Heparin 450 IU / kg / IV, and Group 4 (G4) where the mares were superovulated by the same protocol mentioned above and received 1 mg. / Kg / IV of Enoxaparin Sodium. All animals were randomly assigned to the four cross-over design groups, in which all underwent all treatments. The interval of one estrous cycle for each mare was used between treatments. Treatments started on the seventh day after ovulation. EPE treatment did not exceed eight days being interrupted when most follicles reached the appropriate diameter for ovulation induction. Ovulation induction was performed using 1 ml (250µg) of intramuscular GnRH (Histrelin Acetate) and 2500 IU of intravenous hCG (Human Chorionic Gonadotropin) when the follicle (s) reached a mean diameter of 35 mm in both groups. Twenty-four hours afterward ovulation induction the mares were inseminated with fresh semen from a proven fertility stallion. Embryo collection was performed on the ninth day after the first ovulation detected. Each animal at anticoagulant treatment was submitted to laboratory evaluations (blood count and coagulogram). For blood count blood samples were collected before anticoagulant administration (T0 hour) serving as a control, and three hours after applying anticoagulant (T3 hours), while for the coagulogram the samples were collected at T0, T1, T2, T3, T6, T9 and T12 hours after anticoagulant application. Groups of superovulated mares showed higher ( $p < 0.05$ ) number of ovulations (G2 -  $4.6 \pm 0.4$ ; G3 -  $5.2 \pm 0.5$ ; G4 -  $4.9 \pm 0.6$ ) in relation to G1 ( $1 \pm 0$ ). The number of embryos recovered by mare did not differ ( $p > 0.05$ ) between G1 ( $0.6 \pm 0.2$ ) and G2 ( $1.6 \pm 0.5$ ), however, it was higher for the groups that received anticoagulants G3 ( $2.5 \pm 0.3$ ) and G4 ( $2.6 \pm 0.6$ ) concerning G1. Evaluating the embryo recovery rate by ovulated follicle, anticoagulant-treated groups had similar rates (G3 - 50%; G4 - 52%) compared to the control group (G1 - 64%). Superovulated control (G2 - 36%) showed a tendency to decrease ( $P = 0.8$ ) concerning G1. Hematological values in both groups receiving anticoagulant (G3 and G4) at T3 hours did not differ ( $p > 0.05$ ) from T0 hour, remaining the reference values. As for the coagulogram, for G3 the activated partial thromboplastin time (TTPA) values from one hour after application (T1 hour) showed a significant increase until twelve hours after application (T12 hours), where all

moments differed ( $p < 0.05$ ) to (T0 hour). Prothrombin time (PT) had an increase ( $p < 0.05$ ) after anticoagulant application (T1-T2 hours) about pre-application evaluation (T0 hour), gradually decreasing from three hours to twelve hours after application (T3-T12 hours), not differing ( $p > 0.05$ ) from T0 hour. For G4, one hour after application (T1 hour) there was an increase ( $p < 0.05$ ) of anti-Xa factor plasma activity, showing a constant decline up to twelve hours (T12), with no difference ( $p > 0, 05$ ) only at this moment in relation to T9 hours and T0 hour. The protocol proposed in this study is an alternative for improving embryo recovery rates in EPE superovulated mares, proving safe use of both types of anticoagulants without presenting hematological alterations or adverse effects compromising or endangering the clinical condition of the animal.

**Keywords:** embryo, equine pituitary extract, fertilization, oocyte, multiple ovulation.





# ***CAPÍTULO 1***

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil, de acordo com estudo desenvolvido pelo MAPA (2016), possui o quarto maior rebanho equino do mundo com 5,6 milhões de cabeças, sendo o faturamento anual da indústria do cavalo de 16 bilhões, gerando em torno de 3,2 milhões de empregos, tendo em vista que é um dos maiores países que utilizam biotecnologias da reprodução e que gera potros oriundos destas biotécnicas.

A prática esportiva equina tem apresentado grande importância e evolução no Brasil; esse cenário tem aumentado a demanda por cavalos com alta genética, maior desempenho, resistência e força física, o que faz com que haja maior organização dos criadores para suprir à demanda deste mercado (EDWARDS, 2008), tendo como consequência a necessidade de novas biotecnologias voltadas à reprodução para que se tenha um melhor aproveitamento produtivo e reprodutivo (BRANDÃO, 2008).

A transferência de embriões (TE) é uma biotécnica que tem como principal objetivo o aumento do número de produtos nascidos de fêmeas geneticamente superiores. Assim como qualquer outra biotécnica também apresenta algumas limitações, sendo a principal a eficiência do programa. Em vista da dificuldade de se obter resultados satisfatórios na recuperação de embriões em éguas superovuladas, a eficiência nos programas de TE é baixa, sendo necessária uma média de 2 a 3 lavados para se obter uma prenhez (ALVARENGA et al., 2008). Consequentemente os custos para a produção de um potro gerado de TE são altos (ALVARENGA et al., 2017).

Assim, é desejável a adequação dos protocolos de superovulação para que se aumente o número de ovulações por ciclo, taxa de recuperação embrionária e se diminua os custos dos programas de transferências de embriões (McKINNON et al., 2011). No entanto, os protocolos até agora desenvolvidos não se tornaram rotina, apresentando resultados inconsistentes principalmente a respeito da recuperação embrionária.

Com a finalidade de melhorar os resultados dos tratamentos de superovulação, já foram citados na literatura fatores que podem influenciar na resposta superovulatória: hormônio utilizado (McCUE et al., 1993; DIPPET et al., 1994; ALVARENGA et al., 2003; MACHADO et al., 2003; IGNACIO et al., 2008; RAZ et al., 2009), dose e frequência das aplicações (ALVARENGA et al., 2001; CARMO, 2003; ALONSO et al.,

2006, GIMENES et al., 2010), dia do início do tratamento e diâmetro do maior folículo (DIPPERT, et al., 1992; SQUIRES; McCUE, 2006; ORLANDI, 2008), agente indutor da ovulação (NISWENDER et al., 2003; LOGAN et al., 2007) e a resposta ovariana (CARMO, 2007).

Contudo, todas as drogas rotineiramente utilizadas para superovular outras espécies, não tem sido efetivas para a espécie equina (McCUE, 1996). Dentre as preparações hormonais com mais estudos até o momento e apresentando melhores resultados para este fim, tem-se o Extrato de Pituitária Equina (EPE) (McCUE, 1996) e o FSH equino (FSHe) (NAGAO et al., 2012).

Entretanto, por mais que a grande maioria das éguas responda aos protocolos de superovulação com crescimento desejado de maior número de folículos e posterior aumento da taxa de ovulação, esta prática ainda não se tornou rotina, pois os resultados ainda são inconsistentes e a taxa de recuperação embrionária é baixa (MACHADO, 2008).

Sabe-se atualmente que isso se deve a alguns entraves, como alterações na maturação do oócito, e principalmente a conformação anatômica do ovário na espécie equina, no qual o único ponto em que os folículos podem se romper é na fossa da ovulação (SQUIRES, 2006), além de apresentar um grande coágulo após a ovulação levando a obstrução e provavelmente impedindo em algum momento a migração de alguns oócitos para o interior da tuba uterina, fato este observado em um estudo realizado por Carmo (2007), mostrando ser o principal fator limitante e responsável pelas baixas taxas de recuperação embrionária em protocolos de superovulação na espécie equina.

Diante disto, o presente estudo tem o objetivo de utilizar duas substâncias anticoagulantes parenterais (heparina sódica e enoxaparina sódica) em éguas superovuladas com EPE, para evitar a formação do coágulo após processo ovulatório, na tentativa de possibilitar a passagem de um maior número de oócitos para o interior da tuba uterina, esperando assim aumentar o número de embriões por lavado e redução de custos dos programas de TE.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Aspectos anatômicos e endócrinos da égua**

O sistema reprodutivo da égua é composto e pode ser subdividido basicamente em dois grupos de órgãos: estruturas que são intrínsecas ao trato reprodutivo (ovários, ovidutos, útero, cérvix uterina, vagina e vulva), e de estruturas que estão fisicamente isoladas do trato reprodutivo (retina, glândula pineal, hipotálamo e hipófise ou glândula pituitária), mas que desempenham funções essenciais para o funcionamento e regulação dos eventos reprodutivos (BRINSKO et al., 2011; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Na égua os ovários estão localizados na área sublombar (ventral a quarta e quinta vertebrae lombares), suspensos pelo ligamento largo e geralmente localizados caudais ao rim correspondente, localização esta que pode variar em alguns momentos, devido a extensão do mesóvario que permite a movimentação ovariana. Seu tamanho pode variar de acordo com a atividade ovariana, sendo maior durante a fase reprodutiva (6 a 8 cm de comprimento e 3 a 4 cm de altura); sua forma (denominada formato de feijão) é devido a sua particularidade anatômica pela presença da fossa da ovulação (BRINSKO et al., 2011; GINTHER, 1992).

Assim o ovário nesta espécie exige uma avaliação específica comparado as outras, pois suas particularidades morfológicas influem na fisiologia (EVANS et al., 2007). Suas funções são tanto exócrinas (liberação de óvulos) como endócrinas (esteroidogênese) (EVANS et al., 2007). No ovário podem se diferenciar duas zonas em relação a sua morfologia e funcionalidade. O córtex composto por tecido altamente denso e pouco vascularizado (que contém os folículos, desde os primordiais até os de Graaf) e a medula do ovário formada por tecidos conectivos, musculares e uma grande quantidade de vasos sanguíneos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Na maioria dos animais domésticos a medula do ovário encontra-se na parte central do órgão e é circundada pelo córtex (tecido produtor de gametas). Já nos equinos podemos referir que o ovário é “de dentro para fora”, em outras palavras a zona medular é superficial e a zona cortical (contém os folículos) está no interior da glândula. O tecido cortical atinge a superfície ovariana apenas em uma depressão da borda ventral do ovário, sendo esta portanto, a única área em que ocorre a ovulação; esta região é apropriadamente denominada fossa da ovulação (EVANS et al., 2007), por onde o oócito consegue sair do

folículo ovulado e chegar a tuba uterina para posterior fertilização (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

As tubas uterinas se estendem desde os extremos dos cornos uterinos até os ovários (no caso dos equinos até a fossa da ovulação), havendo uma íntima relação anatômica entre eles sendo responsáveis pela captação do oócito (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A tuba uterina pode ser dividida basicamente em quatro segmentos funcionais: fímbrias (formato de franjas, nas margens do infundíbulo), infundíbulo (abertura abdominal próxima ao ovário com formato de funil), ampola (porção média dilatada) e o istmo (conectado diretamente ao útero, penetrando no corno uterino da égua na forma de uma pequena papila). Na ovulação o infundíbulo em forma de leque envolve a fossa ovulatória para facilitar a captação do oócito.

O útero é composto de dois cornos uterinos (formato de “Y”), um corpo e uma cérvix (colo). A cérvix é uma estrutura semelhante a um esfíncter, que se projeta caudalmente na vagina, se estende desde o orifício interno do útero até seu orifício externo na porção de fundo de vagina (HAFEZ; HAFEZ, 2004; KAINER, 2011). A vagina é caracterizada por ser um órgão tubular que se estende da cérvix até a prega transversal do meato urinário externo. Nas éguas virgens essa prega transversal se continua e forma o hímen. Dentre suas funções a vagina serve como um órgão copulatório, ducto excretor das secreções cervicais, endometriais, tubárias e também de via natural durante o parto. Estendendo da prega transversa sobrejacente ao meato urinário até a vulva está presente o vestíbulo vaginal, onde na junção entre o vestíbulo vaginal e a vagina há um anel vestibulovaginal, minimizando assim a entrada de contaminantes externos. A vulva refere-se a abertura externa do trato reprodutivo feminino, que deve possuir uma posição vertical sem nenhum desvio em sua angulação e os lábios vulvares deve coaptar-se não permitindo a entrada de ar na vagina (BRINSKO et al., 2011).

O sistema neuroendócrino (hipotálamo-hipófise-gônadas) deve manter-se em uma relação sincrônica para o bom funcionamento reprodutivo tanto nos machos quanto nas fêmeas, de tal forma que os hormônios envolvidos sejam liberados em quantidades adequadas para que os animais manifestem seu potencial reprodutivo (BRINSKO et al., 2011).

A glândula pineal exerce um importante papel no controle neuroendócrino da reprodução (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Sua atividade hormonal é influenciada tanto com o aumento ou diminuição da intensidade luminosa, convertendo informações neurais provenientes dos olhos (retina) em liberação endócrina de melatonina. Nos equinos o aumento da quantidade de luz/dia inibe a atividade do órgão e a secreção de melatonina, estimulando assim a atividade reprodutiva (REITER, 1981).

O hipotálamo é uma glândula neuroendócrina, situada na base do cérebro abaixo do terceiro ventrículo cerebral. A glândula hipófise (ou pituitária), está intimamente ligada ao hipotálamo, a qual é constituída por dois lobos, o lobo posterior denominado de neuro-hipófise e o anterior de adeno-hipófise, estando ambos alojados na sela túrsica, uma depressão óssea localizada na base do cérebro com íntimo contato com hipotálamo por meio do pedículo hipofisário (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Existem conexões neurais entre o hipotálamo e o lobo posterior (neuro-hipófise), contendo neurônios que possuem o corpo celular no hipotálamo e o final do axônio em seu lobo posterior. No momento em que há estímulo no hipotálamo, os hormônios produzidos por estes neurônios são liberados pela neuro-hipófise, entre eles; ocitocina e hormônio antidiurético (ADH ou vasopressina). No lobo anterior (adeno-hipófise) existem conexões vasculares com o hipotálamo, e para cada hormônio sintetizado na adeno-hipófise há um hormônio de liberação hipotalâmico, que é secretado no sistema porta-hipotalâmico-hipofisário (HAFEZ; HAFEZ, 2004; PRICE; SMITH, 1987).

O GnRH liberado pelo hipotálamo, através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, atinge a hipófise e estimula a secreção das gonadotrofinas, FSH e LH. Por via circulação sistêmica esses hormônios chegam aos ovários, onde o FSH é responsável por estimular o desenvolvimento folicular, enquanto o LH terá o papel de maturação folicular, produção de estrógeno e posterior ovulação e luteinização. Os folículos, pelo estímulo do FSH, iniciarão a produção de estrógeno até o momento em que a concentração de estrógeno na circulação se eleve (devido a produção continua pelos folículos em desenvolvimento) e sensibilize áreas superiores do sistema nervoso central, responsável pela manifestação dos sinais de estro, atuando também nos centros controladores da onda pré-ovulatória de GnRH, aumentando a quantidade deste hormônio na circulação. Na etapa final do desenvolvimento, o folículo dominante secreta a inibina, que via sistêmica possui a função de inibir a liberação de FSH pela hipófise. Diante disto

e acompanhando o pico de liberação de GnRH (onda pré-ovulatória) ocorre maior aumento de LH, já que a liberação de FSH se encontra bloqueada. Essa elevação de LH será responsável então pela ovulação do folículo (s) dominante (s). As células presentes no folículo ovulado sofrem uma transformação chamada luteinização, formando o corpo lúteo, que produz progesterona (BRINSKO et al., 2011).

Considerando que a fêmea tenha ficado gestante, o embrião em desenvolvimento sinaliza sua presença (reconhecimento materno), prevenindo a luteólise, caso contrário, a lise do corpo lúteo ocorre 14 a 16 dias após a ovulação (ALLEN, 2000), onde o folículo dominante produz estrógeno aumentando receptores para ocitocina no endométrio e posteriormente promovendo a produção  $PGF_{2\alpha}$  que será responsável pela regressão do corpo lúteo (McKINNON et al., 2011; GOFF et al., 1987), havendo o início de um novo ciclo.

## **2.2. Fisiologia do ciclo estral**

A compreensão e conhecimento do ciclo estral equino e suas variações são necessárias para que se tenha um eficiente manejo reprodutivo dentro dos programas de biotecnologias e para posteriores desenvolvimentos de protocolos farmacológicos afim de maximizar resultados (EVANS et al., 1997; GINTHER, 1992).

As éguas são animais considerados poliéstricos sazonais, que manifestam vários ciclos estrais em um determinado período do ano que coincide com maior disponibilidade de luz ao dia (HAFEZ; HAFEZ, 2004), que corresponde de outubro a março no hemisfério sul.

O ciclo estral corresponde a uma combinação de eventos fisiológicos regulados pela interação entre a glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários e endométrio, podendo ser definido entre o início de um estro e o início do estro subsequente, onde cada ciclo apresenta em média duração de 21 dias. Divide-se didaticamente este ciclo em duas fases: estro e diestro. A fase de estro tem duração média de 7 dias e a de diestro 14 dias (GINTHER, 1992; McCUE et al., 2011).

O estro é caracterizado pelo período em que a égua é receptiva ao garanhão, devido a presença de um folículo dominante de 30 mm de diâmetro no ovário, onde são produzidos elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa (GINTHER, 1992).

Já a fase de diestro, corresponde pela presença do corpo lúteo, decorrente do processo de ovulação. Este evento ocorre normalmente 24 a 48 horas antes do término do estro, resultando na liberação do oócito e captação pela tuba uterina, tendo o início da fase progesterônica. Nesta fase o corpo lúteo produz progesterona em quantidades crescentes do segundo ao décimo dia pós-ovulação, período que não há os sinais de receptividade ao macho (GINTHER, 1992).

### 2.2.1. Dinâmica folicular

As éguas podem apresentar uma ou duas ondas foliculares durante cada ciclo estral, havendo apenas em 70% dos ciclos uma única onda de crescimento folicular (GINTHER, 1992).

No entanto, estudos comparativos da dinâmica folicular entre raças, tem demonstrado maior porcentagem a duas ondas foliculares para as raças Puro Sangue Inglês (15 a 30%), Polo Argentino (38%), Quarto de Milha (9%), Apaloosa (8%) (LOSINO et al., 2000) e Brasileiro de Hipismo (53%) (CARMO et al., 2002).

O crescimento folicular diário em uma onda folicular, pode variar de 2,5 a 3,0 mm (GINTHER, 1986), porém quando é utilizado uma terapia hormonal para estimulação ovariana o crescimento folicular diário pode chegar a 3,0 mm ou mais (MOURA; MERKT, 1996).

As ondas foliculares emergem entre o sexto e oitavo dia (dia 0 = ovulação) durante o diestro, com folículos de 6 mm de diâmetro, devido ao aumento da secreção de FSH pela hipófise, denominada onda maior primária que termina em ovulação (ovulação associada ao estro). Em caso de éguas com duas ondas foliculares, a onda secundária emerge durante o estro ou no início do diestro dando origem a um folículo dominante que regride ou, eventualmente, ovula durante a fase de diestro (ovulação de diestro) (GINTHER, 1992).

A partir deste momento, os folículos passam por uma fase de crescimento comum, onde todos os folículos, independentemente do tamanho, apresentam a mesma taxa de crescimento diário (3 mm/dia). A concentração de FSH aumenta e atinge seu pico no momento que os folículos atingem 13 mm de diâmetro, e diminui após a dominância folicular. A fase de desvio ou divergência ocorre no final da fase de crescimento folicular,



e representa o momento em que o folículo de maior diâmetro atinge 23 mm, onde passa a apresentar maior taxa de crescimento diário que os demais, caracterizando a seleção do folículo dominante (GASTAL et al., 1997; GINTHER et al., 2001). O folículo dominante além de estrógeno também secreta inibina, responsável pela redução nos níveis de FSH. Conseqüentemente os folículos subordinados entram em atresia por ainda serem dependentes deste hormônio para crescer. O aumento nos níveis de LH ocorre concomitante com estrógeno, sendo principalmente o LH o hormônio responsável pelo crescimento do folículo dominante, maturação e posterior ovulação (ALEXANDER et al., 1993; GASTAL et al., 1997; PATTISON et al., 1974).

A maturação final do oócito e o processo ovulatório ocorre no momento em que o folículo dominante se torna pré-ovulatório devido ao aumento sérico de LH liberado pela hipófise (GINTHER, 1992), no entanto, a maior concentração sanguínea deste hormônio é detectada dois dias após a ovulação. A ovulação é um processo caracterizado por uma reação inflamatória (KERBAN et al., 1999), e uma sequência de eventos que leva a ruptura da parede folicular na fossa da ovulação, permitindo o extravasamento do fluido folicular juntamente com as células da granulosa e o complexo cumulus/oócito (BERGFELT; ADAMS, 2007). A partir deste momento inicia-se a fase lútea (HAFEZ; HAFEZ, 2004), onde a concentração de progesterona aumenta atingindo níveis máximos até 5° / 6° dia pós ovulação (maior que 4ng/ml), permanecendo alto por toda fase progesterônica. A luteólise ocorre 14 dias após a ovulação pela liberação de PGF<sub>2α</sub> pelo endométrio induzida pela ocitocina (McKINNON; VOSS, 1993), retornando a fase estrogênica.

### 2.2.2. Processo ovulatório

O processo da ovulação consiste na liberação do oócito do folículo dominante selecionado a partir da emergência de uma onda folicular (HAFEZ; HAFEZ, 2004). É caracterizado por um processo rápido, com a maior parte do líquido folicular sendo liberado em 2 minutos e com uma evacuação completa, normalmente em um período de 2 a 7 minutos (BRINSKO et al., 2011).

Na maioria das éguas, o diâmetro folicular na ovulação varia medindo de 40 a 45mm, no período do final do estro. Entretanto, algumas éguas podem ovular com

folículos de 35mm de diâmetro apresentando uma consistência firme, considerando que outras não ovularão até que o folículo atinja 50mm (SAMPER, 1997).

Os folículos pré-ovulatórios sofrem três modificações principais durante o processo ovulatório: a) maturação citoplasmática e nuclear do oócito; b) separação das células do cumulus do restante das células da granulosa; c) afinamento e ruptura da parede folicular externa (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Mudanças também ocorrem neste momento no interior do folículo após a estimulação do LH como: aumento na produção de progesterona, ativação de enzimas proteolíticas, aumento na síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) e aumento na síntese de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e diminuição na produção de glicosaminoglicano. Além disto, o fluxo sanguíneo aumenta para todos os folículos, contudo, o folículo destinado a ovulação recebe maior volume de sangue que os demais (PIERSON, 1992; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

No momento próximo da ovulação o folículo desenvolve uma protuberância na superfície do ovário devido ao seu crescimento, no qual o estroma oferece pouca resistência a ovulação. Toda parede folicular se enfraquece, entretanto, a ruptura ocorre na fossa da ovulação, expelindo o oócito nesta região. O oócito é captado pela fimbria e liberado ao infundíbulo da tuba uterina até ocorrer na fertilização (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Inicialmente após a ruptura do folículo ocorre uma hemorragia para a formação do corpo hemorrágico, havendo em seguida um processo de diferenciação das células da granulosa e da teca para formar o corpo lúteo. A partir deste momento tem-se o início da fase lútea (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

### **2.3. Transferência de embriões**

A transferência de embriões é um ramo importante da biotecnologia aplicada à reprodução equina, descrita pela primeira vez no Japão em 1972 (OGURI; TSUTSUMI, 1972). No Brasil foi introduzida e iniciada comercialmente em 1986 pelo Médico Veterinário João Junqueira Fleury, e a partir desta década as taxas de recuperação embrionária e prenhez evoluíram positivamente.

Na espécie equina houve um intenso avanço desta biotécnica aumentando consideravelmente as taxas de prenhez, e até os dias atuais vem se buscando melhorias e estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva para os programas de TE (ALVARENGA et al., 2017). Hoje a maioria absoluta das associações de criadores reconhecem os benefícios da técnica e permitem seu uso.

A técnica consiste basicamente na colheita de um embrião fertilizado *“in vivo”* de uma égua, doadora, geneticamente superior, e transferido (inovulado) para o útero de uma outra égua, receptora, que levará a gestação a termo e irá criar este potro até seu desmame (ANDRADE, 1986). A sua finalidade é aumentar a produção de potros por égua durante uma determinada estação reprodutiva, conseguindo desta forma atender a demanda do mercado e dos respectivos criadores.

A transferência de embriões também possibilita a obtenção de produtos de animais que estão em atividades esportivas, não deixando que se afastem por conta de uma gestação, animais jovens, éguas subférteis, as quais ficam impossibilitadas de exercer uma gestação devido a diversos fatores como idade, endometrites, danos cervicais / perineais e problemas osteomusculares (HURTGEN, 2008). Mais recentemente, tem sido utilizada em larga escala combinada com novas biotecnologias, como com a utilização de sêmen congelado, técnicas de inseminação com baixa dose, transportes de embriões congelados e outras técnicas de reprodução assistida para éguas que não conseguem fornecer embriões, como a transferência de oócitos e a produção *“in vitro”* de embriões através da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (McKINNON; SQUIRES, 2007).

Dentre os fatores que afetam a recuperação embrionária e a eficiência do programa de transferência de embriões, temos; elevada porcentagem de doadoras idosas, subférteis, qualidade do sêmen, tipo de sêmen e sua manipulação inadequada (fresco, refrigerado e congelado) e número de ovulações da égua (McKINNON; SQUIRES, 1988), além dos fatores que influenciam a taxa de prenhez como; método de inovulação, sincronização doadora-receptora, qualidade dos embriões e condições nutricionais e uterinas das receptoras (SQUIRES et al., 1999). Todos estes fatores isolados ou associados fazem com que os resultados finais dentro dos programas de TE sejam baixos, uma vez que Alvarenga et. al. (2008) relatam necessário 3 ciclos estrais para se obter uma gestação.

Para se obter melhores resultados na recuperação embrionária por ciclo, uma alternativa seria a utilização de protocolos hormonais para aumentar o número de ovulações (ALVARENGA et al., 2008).

Os tratamentos superovulatórios em programas de TE na égua e em outras espécies de ovulação única procuram selecionar um maior número de folículos dentro de uma determinada onda de crescimento folicular, visando aumentar número de ovulações por ciclo, taxa de recuperação embrionária e diminuir os custos em programas de transferências de embriões (McKINNON et al., 2011).

#### **2.4. Superovulação**

A espécie equina é classificada como mono-ovulatória, ocorrendo normalmente a fertilização de apenas um oócito por ciclo estral, sendo que isto é compatível com as características intrínsecas da espécie (MACHADO, 2008). Em vista disto as técnicas para melhorar a fertilidade tem sido limitantes em decorrência da particularidade anatômica da fêmea equina (McCUE, 1996). No entanto quando se diz respeito principalmente as raças europeias nos beneficiamos pelo aumento da incidência de ovulações múltiplas espontâneas, aumentando assim os resultados nas transferências de embriões (CARMO et al., 2002), entretanto se trata de uma particularidade que não abrange todas as raças.

Desta forma dentro dos programas de transferência de embriões, os tratamentos superovulatórios tem como objetivo elevar a eficiência reprodutiva, selecionando assim um maior número de folículos dentro de uma única onda folicular, sustentando o desenvolvimento até o momento da ovulação (ORLANDI, 2006), para que posteriormente aumente o número de oócitos para a fertilização, e tenha assim um maior número de embriões por éguas doadoras a serem obtidos em uma única colheita (ANDRADE, 1986), reduzindo custos, principalmente no que diz respeito ao transporte de sêmen (SQUIRES et al., 2003) e manutenção de receptoras de embrião (SQUIRES; SEIDEL, 1995).

Outros benefícios que esta biotécnia fornece para a reprodução equina é o aumento da taxa de fertilidade de garanhões e éguas subférteis, aumento da eficiência da colheita de oócitos, transferência intra-falopiana de gametas (GIFT), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (McCUE, 1996; SQUIRES et al., 2003), número de embriões para processo de congelamento, e proporcionar melhores taxas de

prenhez/recuperação embrionária com uso de sêmen congelado (McKINNON; SQUIRES, 2007).

No entanto alguns fatores podem interferir no sucesso da resposta superovulatória, dentre eles: hormônios utilizados, início do tratamento, dose e frequência do hormônio, agente indutor da ovulação e resposta ovariana.

#### 2.4.1. Hormônios utilizados na superovulação

Quanto ao tipo de hormônio a ser utilizado na superovulação, numerosos produtos foram avaliados, entre eles gonadotrofina coriônica equina (eCG) (DAY, 1940; GINTHER, 1992; McCUE, 1996), FSH-P (IGNÁCIO et al., 2007; McCUE, 1996), GnRH (GINTHER; BERGFELT, 1990; McCUE, 1996), FSH humano recombinante (THARASANIT et al., 2006) e imunoneutralização da inibina (McKINNON et al., 1992; McCUE et al., 1993) sem resultados satisfatórios ou condizentes para uso viável e seguro nos protocolos de superovulação.

Além disso alguns desses hormônios na espécie equina apresentam uma barreira quando relacionamos a preparados hormonais disponíveis comercialmente, como o FSH de origem suína e o eCG, onde estudos tem demonstrado resultados insatisfatórios em induzir múltiplas ovulações (McCUE, 1996), sendo necessário o uso de FSH homólogo para se obter boa resposta.

A razão pela qual as éguas não respondam ao eCG se refere ao fato deste hormônio se ligar apenas aos receptores do hormônio luteinizante (LH), enquanto que este fármaco possui tanto o hormônio folículo estimulante (FSH) quanto LH, desempenhando sua ação e atividade de ambos os hormônios nas outras espécies. Já a administração repetidas de altas doses de FSH-P pode aumentar a taxa de duplas ovulações nas éguas. Assim seu uso não é justificado pelos resultados insatisfatórios e o alto custo do tratamento (BLANCHARD et al., 2003).

Dentre os preparados com melhores resultados para induzir a superovulação em éguas temos; o extrato de pituitária equina (EPE), FSH equino purificado e mais recentemente o FSH recombinante (ALVARENGA et al., 2008).

#### 2.4.1.1. Extrato de Pituitária Equina (EPE)

O EPE é preparado a partir da obtenção de glândulas pituitárias, consiste em um preparado parcial de gonadotrofina equina, o qual possui tanto FSH quanto LH em sua composição (DOUGLAS, 1979), sendo um dos primeiros preparados hormonais utilizado na superovulação. As concentrações de FSH e LH variam em torno de 40% e 60% respectivamente, oscilando de acordo com a partida preparada, em consequência das variedades individuais dos animais como; sexo, idade, estágio reprodutivo e época no ano que foram coletadas as pituitárias (CARMO, 2003).

Tratamentos com EPE vem sendo utilizado há muitos anos, e são capazes de aumentar o número de ovulações por égua e o número de embriões captados por lavado uterino (SQUIRES et al., 1987; DOUGLAS, 1979; DIPPERT et al., 1994; ROSAS et al., 1998; ALVARENGA et al., 2001; SCOGGIN et al., 2002).

Ao compararem éguas superovuladas com EPE e éguas com ovulações fisiológicas (sem tratamento), Dippert et al. (1994) encontraram número de ovulações maiores para éguas tratadas (3,6), contra (1,1) não tratadas, além do número de embriões recuperados ser maior para éguas sobre tratamento (2,0). Já Alvarenga et al. (2001) e Scoggin et al. (2002) utilizando EPE 25 mg duas aplicações ao dia, observaram uma média de 7 e 4 ovulações por ciclo, respectivamente para cada estudo. Contudo, ambos tiveram taxas de recuperação embrionária insatisfatórias, sugerindo como possível hipótese que altas concentrações de LH no EPE possa ser uma das causas envolvidas pelo baixo resultado (ALVARENGA et al., 2003; MACHADO et al., 2003).

Seguindo esta mesma linha de raciocínio, Machado (2004) em seu estudo teve como objetivo comparar a resposta superovulatória de éguas, utilizando dois diferentes protocolos de EPE (doses constantes e doses decrescentes) mesmo utilizado por Carmo (2003), em relação ao tratamento com FSHe purificado, a fim de avaliar principalmente o efeito negativo do LH. O tratamento foi iniciado no sétimo dia pós-ovulação (D7), no qual as éguas passaram por quatro tratamentos. GI (EPE 25 mg duas vezes ao dia), GII (EPE doses decrescentes 40, 35, 30, 25, 15 e 10 mg duas vezes ao dia), GIII (FSH equino purificado 12,5 mg duas vezes ao dia) e GIV como controle. Quando a maioria dos folículos atingiram diâmetro de  $\geq 35$  mm foi administrado 3000 UI de hCG. Concluiu-se que o número de ovulações por égua foi semelhante entre os tratamentos

superovulatórios, e significativamente maior que o grupo controle. Já em relação à média de embriões recuperado por lavado tendeu a ser superior ao tratamento com FSHe.

Rosas et al. (1998) compararam o FSHe com o EPE, utilizando uma dose diária de 25 mg para ambos os tratamentos. Em relação ao número de ovulações por égua foi maior para tratamento com FSHe (4,6) e EPE (3,6), em relação ao grupo não superovulado. Porém o número de embriões recuperado por égua foi semelhante entre os grupos FSHe e EPE (2,0 e 2,0). Assim, estes resultados deste estudo nos sugerem que a alta quantidade de LH no EPE provavelmente não afeta a resposta ovulatória das éguas submetidas a superovulação e posteriormente a recuperação embrionária.

No geral, em um resumo de diversos estudos realizados na Universidade do Estado do Colorado (Colorado State University) com tratamentos utilizando EPE, observaram uma taxa média de ovulações variando entre 2,3 e 3,9 por égua. Em uma outra avaliação avaliando 170 éguas tratadas com EPE, uma média de 3,2 ovulações foi observada e 1,96 embriões foram recuperados por égua, comparando com um valor de 0,65 embriões recuperados de éguas não tratadas (SQUIRES; McCUE, 2011).

#### 2.4.1.2. Hormônio Folículo Estimulante Equino (FSHe)

Quanto ao FSH equino purificado (FSHe), este hormônio se trata de uma preparação enriquecida de FSH obtida a partir do extrato de pituitária equina, e diversos estudos tem obtido sucesso com seu uso (SQUIRES, 2003), entretanto a terapia utilizando o FSHe possui comparativamente um maior custo em relação ao EPE (CARMO, 2003).

Em 2003, os procedimentos de preparação hormonal a partir do EPE foram fornecidos a empresa Bioniche Animal Health, Canadá Inc. para produção do FSHe purificado contendo uma proporção de FSH para LH de 10:1, no entanto, em 2007 sua comercialização foi interrompida (SQUIRES; McCUE, 2011).

Estudos utilizando FSH-e foram conduzidos por Niswender et al. (2003), nos quais foram comparadas diferentes doses (duas vezes ao dia) e indutores de ovulação (GnRH ou hCG), em relação ao grupo de éguas controle. Em uma visão geral 80% das éguas tiveram bons resultados e responderam na indução de múltiplas ovulações com administração de FSH-e. No entanto, em uma comparação e avaliação frente aos grupos, melhores resultados foram obtidos com aplicações de 12 mg de FSH-e duas vezes ao dia

seguido de 2500 UI hCG, assim devido a este resultado encontrado, um posterior estudo foi realizado utilizando este mesmo protocolo superovulatório, apresentando em seus resultados uma taxa média de ovulação (3,6) e de recuperação embrionária (1,9) por ciclo, quando comparado com grupo controle (1,0) e (0,5), respectivamente.

Diversos trabalhos reportam melhores resultados (ALVARENGA et al., 2003; NISWENDER et al., 2003; MACHADO et al., 2004), quando a dose utilizada foi de 12,5 mg de FSHe duas vezes ao dia, fornecendo uma taxa de ovulação média por égua de 3,3-5,2 e taxa de recuperação embrionária de 1,6-2,6.

#### 2.4.1.3. Hormônio folículo estimulante equino recombinante (FSHre)

Já o FSH equino recombinante (FSHre) é um hormônio sintético, que apresenta bons resultados na taxa de ovulação e recuperação embrionária, além de indicação para se tornar um futuro produto comercial (JENNINGS et al., 2009). Segundo Niswender et al. (2008), ao avaliar diferentes doses e frequências de administrações, concluíram que o FSHre foi eficaz na estimulação de múltiplos folículos pré-ovulatórios e múltiplas ovulações. Entretanto por se tratar de um produto novo, não houve padronização de protocolos.

#### 2.4.2. Início do tratamento superovulatório

Um dos fatores importantes é momento do ciclo para o início do tratamento, sendo ideal começar o tratamento superovulatório no início da onda folicular, antes do aparecimento do folículo dominante, onde a resposta irá depender da população de folículos presentes no ovário de cada égua no início do tratamento (MEIRA; BURATINI, 1998).

Autores relatam a importância da administração da  $PGF_{2\alpha}$  associada ao início do tratamento, fase a qual o animal se encontra em diestro (DOUGLAS, 1979; WOODS; GINTHER, 1983), possibilitando assim um estro em que as ovulações sejam sincrônicas.

Segundo Scoggin et al. (2002) e Dippert et al. (1992), é preconizado entre os dias cinco e sete após ovulação, quando ainda não há a seleção do folículo dominante, o que possibilita o desenvolvimento de uma população maior de folículos, aumentando a resposta ovariana e recuperação embrionária.



Machado et al. (2003) observaram uma população folicular entre 16-20 mm de diâmetro 48 horas após o início do tratamento (sétimo dia pós-ovulação), correlacionado com o número de ovulações dos grupos de éguas tratadas tanto com EPE como FSH equino, o que, de acordo com outros autores, esta avaliação da população de folículos no início do tratamento é uma forma de poder estimar a resposta superovulatória e a taxa de ovulação de cada ciclo.

Uma melhor resposta ovulatória foi obtida por Carmo (2003), onde no início do tratamento (sétimo dia pós-ovulação) as éguas apresentaram folículos entre 10 e 20 mm. Já Orlandi (2008), induziu a onda folicular através da aspiração folicular e iniciou o tratamento superovulatório com EPE em diferentes momentos (antes do desvio  $\geq 13$  mm, momento esperado do desvio  $\geq 23$  mm e após estabelecimento da dominância folicular  $\geq 26$  mm), e detectou que o melhor momento para se iniciar o tratamento é quando os folículos estão com diâmetro entre 20-23 mm.

#### 2.4.3. Dose e frequência das aplicações

A dose e a frequência das aplicações de EPE também são fatores importantes para se obter uma boa resposta. Squires et al. (2003) relatam que aplicações a cada 12 horas apresentam melhores taxas de ovulações e de recuperação embrionária quando comparado a uma única aplicação diária.

Em um estudo realizado por Alvarenga et al. (2001) foi avaliado o efeito de uma aplicação única diária de 25 mg de EPE em comparação a duas aplicações diárias de 25 mg, e observaram que o número de ovulações foi de 2,4 e 7,1 respectivamente, havendo uma elevação na resposta superovulatória frente a ovulação com o aumento da frequência de aplicação (duas aplicações), no entanto não houve diferença no percentual de embriões recuperados por ovulações entre os dois tratamentos (69% e 49% para grupos tratados uma e duas vezes ao dia).

Scoggin et al. (2002) também detectaram mais ovulações em éguas que receberam 25 mg de EPE duas vezes ao dia, comparado aos outros tratamentos (25 mg EPE uma vez ao dia, 50 mg EPE uma vez ao dia e 12,5 mg EPE duas vezes ao dia). Em relação a taxa de recuperação embrionária por égua, foi maior nas éguas que receberam 12,5 mg de EPE duas vezes ao dia.

Carmo (2003) comparou o uso de doses constantes e decrescentes de EPE duas vezes ao dia. Aplicações em doses decrescentes teve como objetivo reduzir as concentrações de LH exógeno próximo do momento ovulatório, sendo baseado em um estudo realizado por Monniaux et al. (1993), relatando que na espécie bovina a administração de um produto com alta concentração de LH em doses decrescentes proporciona uma melhora significativa na taxa de ovulação e de embriões. No entanto Carmo (2003) não encontrou diferença significativa na taxa de ovulação (3,5 e 5,0) e na recuperação embrionária (1,2 e 1,8), respectivamente para os tratamentos, proporcionando apenas uma melhora numérica para o grupo em doses decrescentes.

Welch et al. (2006) utilizaram 40 éguas cíclicas para avaliar o efeito do FSH equino 25 mg uma vez ao dia contra 12,5 mg duas vezes ao dia, onde a taxa de ovulação foi maior nas éguas que receberam a administração do hormônio duas vezes ao dia.

Assim com base nestes estudos, a maioria dos protocolos superovulatórios utilizam a aplicação hormonal duas vezes ao dia (SQUIRES; McCUE, 2011), aumentando a sua biodisponibilidade e conseqüentemente a resposta ovariana.

#### 2.4.4. Indução da ovulação

Em relação a obtenção do sincronismo entre as ovulações em um mesmo momento ou em intervalos próximos após uma estimulação hormonal dentro de um protocolo superovulatório, é essencial a escolha correta de um agente indutor eficaz. Isso garante e possibilita um agendamento ideal para a realização da colheita dos embriões (SQUIRES; McCUE, 2011), e uma maior chance de recuperação.

Alguns indutores de ovulação foram testados; hCG, GnRH como por exemplo a deslorelina (NISWENDER et al., 2003; LOGAN et al., 2007), EPE (FARINASSO et al., 2005) e mais recente LH recombinante equino (YONN et al., 2007).

Em éguas, os agentes indutores mais utilizados na rotina são o GnRH e hCG. Em alguns estudos quando se avaliou com fim comparativo a eficiência do acetato de deslorelina e do hCG, demonstrou que o hCG proporciona melhor taxa e sincronia de ovulações (WOODS; GINTHER, 1983; DIPPET et al., 1994; NISWENDER et al., 2003; LOGAN et al., 2007).

#### 2.4.5. Resposta ovariana

Assim temos em vista frente aos diversos estudos ao longo destes anos, que a resposta ovariana nos protocolos superovulatórios é eficaz a respeito em induzir múltiplas ovulações, contudo quando nos referimos a recuperação embrionária comparado ao número de ovulações os resultados tem permanecido abaixo das expectativas esperadas (ALVARENGA et al., 2001; SCOGGIN et al., 2002; DIPPET et al., 1994; CARMO, 2003; CARMO, 2007), mostrando uma média de 4 a 5 ovulações por égua com uma taxa de embrião recuperado por folículo ovulado de 30% (ALVARENGA et al., 2008).

Distúrbios na captação dos oócitos para o interior da tuba uterina das éguas podem ocorrer durante o processo ovulatório de múltiplos folículos. Dippert et al. (1994) relatam que após a lavagem das tubas uterinas de éguas superovuladas e não superovuladas recuperaram 1,0 e 1,6 oócitos, respectivamente.

Logan et al. (2007) também relataram a possibilidade de uma interferência na captação dos oócitos, pois foi observado que quando as éguas apresentaram maior taxa de ovulação menor foi a recuperação embrionária, fato este relatado também por Carmo et al. (2006).

Neste estudo de Carmo et al. (2006) as éguas foram divididas em dois grupos, tratado (25 mg de EPE duas vezes ao dia) e não tratado (controle). As ovulações foram induzidas com 2500 UI de hCG e após 12 a 24 h após a detecção da primeira ovulação as éguas foram abatidas sendo lavado então as tubas uterinas para avaliar a recuperação dos oócitos. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre o número de oócitos degenerados por grupo, entretanto a taxa de recuperação de oócito não degenerados/ovulação foi de 60% para éguas superovuladas e 85% para não superovuladas (ovulação única). Ou seja, quando houve o aumento do número de ovulações menor foi a taxa de recuperação dos oócitos na tuba uterina.

Assim nesta mesma linha de pesquisa após avaliar os ovários foi verificado a presença de um grande coágulo de sangue na fossa da ovulação das éguas com mais de 3 ovulações por ovário que foram submetidas ao protocolo de superovulação e posteriormente abatidas, atribuindo a este fato a causa das baixas taxas de recuperações de oócitos e conseqüentemente taxas de recuperação embrionária nos procedimento de

colheita de embriões de éguas superovuladas (múltiplas ovulações) (CARMO et al., 2006; CARMO, 2007).

Portanto, uma das opções acessíveis para o Médico Veterinário de reprodução equina que temos nos dias atuais principalmente também pelo fácil acesso comercial ao produto, são os tratamentos hormonais utilizando baixas doses com o acetato de deslorelina, onde pode produzir o aumento na incidência de duplas ovulações (NAGAO et al., 2012; SEGABINAZZI et al., 2015), garantindo pelo menos um embrião por colheita.

## **2.5. Anticoagulantes**

Fármacos anticoagulantes são substâncias com efeitos de prevenir a formação de coágulos de fibrina, visto que seu uso vem sendo rotineiramente empregado de forma profilática e terapêutica na medicina equina em algumas enfermidades como doença gastrointestinal (pós-operatório de cólicas), peritonite, endotoxemia, septicemia, trombose venosa (por exemplo; tromboflebite jugular) e em laminites (ALONSO, 2013; BORGHESAN, 2010; DARIEN, 1993; FEIGE et al., 2003; POUYADE et al., 2009). No entanto, a sua aplicabilidade nas biotecnologias da reprodução da fêmea equina até o momento não foi relatada, não havendo nenhum trabalho desenvolvido utilizando substâncias anticoagulantes nos protocolos de superovulação em éguas.

Neste sentido os tratamentos com fármacos anticoagulantes são essenciais visando prevenir e impedir a formação dos coágulos. A rápida anticoagulação pode ser alcançada com a administração de anticoagulantes parenterais não fracionadas (HNF) como a Heparina (KALODIKI; NICOLAIDES, 2002; COMP, 2003; BECATTINI et al., 2006) e fracionadas ou de baixo peso molecular (HBPM) como a Enoxaparina (LAGE et al., 2007; HIRSH et al., 2001), sendo substâncias de escolha quando um efeito anticoagulante rápido é necessário, obtendo ação imediata realizando a administração por via intravenosa (IV) (HIRSH et al., 2001).

### **2.5.1. Anticoagulantes parenterais não fracionadas (HNF)**

A heparina é um dos mais antigos anticoagulantes conhecidos, foi acidentalmente descoberta e descrita em 1916 por McLean um estudante de Medicina, que na época ao investigar a natureza dos pró-coagulantes no fígado, descobriu um

anticoagulante fosfolipídico. Posteriormente em 1922 por Howell, esta substância foi nomeada de heparina devido a sua abundância no tecido hepático (MOORE; HINCHCLIFF, 1994). Consiste em um proteoglicano ácido sulfatado (mucopolissacarídeo) com peso molecular variável de 4.000 a 40.000 dáltons (MOORE; HINCHCLIFF, 1994; GUERRA; ROSENFELD, 2002).

A heparina endógena é produzida no interior dos mastócitos do pulmão, fígado e intestino (JAQUES, 1980). A sua extração se dá a partir do pulmão bovino e da mucosa intestinal suína, e é precipitada na forma de sal sódico ou cálcico para uso terapêutico. Assim apesar da desigualdade da composição das diferentes preparações comerciais, suas ações biológicas são semelhantes (MAJERUS, 2006).

Em 1939 Brinkhous e demais pesquisadores, descobriram que um cofator presente no plasma era necessário para a atividade anticoagulante da heparina. Albidgaard trinta anos depois, demonstrou que a antitrombina III (AT III) apresentou atividade de cofator da heparina, onde em sua ausência a heparina não possui atividade anticoagulante (HOPPENSTEADT, 2003). A antitrombina inibi rapidamente a trombina com a presença da heparina, a qual é sintetizada no fígado e então circulada no plasma, inibindo os fatores de coagulação das vias comuns e intrínseca, inclusive a trombina, os fatores Xa, IXa, XIa, XIIa e calicreína (MAJERUS, 2006). A união da heparina com a antitrombina, faz com que sua molécula se torne muita mais ativa, aumentando a potência inibitória da AT III em cerca de 1.000 vezes (O'REILLY, 1987).

Uma pequena fração da molécula da heparina é responsável por seu efeito anticoagulante principal. Em sua molécula contém uma unidade de glicosamina com uma sequência de pentassacarídeos que se liga à antitrombina III (AT III) (TOLLEFSEN; ZHANG, 2006), que é um inibidor lento de trombina, plasmina e fatores de coagulação. A reação de inibição realizada pela AT III é catalisada pela heparina, acelerando o processo. A trombina (fator II ativado) e o fator X ativado são enzimas da coagulação mais sensíveis a inativação pelo complexo formado pela heparina e a AT III (MOORE; HINCHCLIFF, 1994). Assim tanto a heparina quanto a AT III devem se ligar de forma simultânea e direta a trombina para inibi-la, já para inibir o fator Xa a heparina só precisa se ligar a AT III (NESHEIM, 1983). Moléculas de heparina contendo menos de 18 sacarídeos não podem se ligar a AT III e a trombina no mesmo momento, e, portanto, as heparinas de baixo peso molecular (HBPM) não podem catalisar a inibição da trombina

(CHOAY et al., 1983; HOLMER et al., 1982). De uma forma geral o efeito anticoagulante primário da heparina é através da supressão da amplificação dependente da trombina da cascata de coagulação e da inibição da conversão do fibrinogênio mediada pela trombina em fibrina (OFUSO et al., 1989).

A heparina se liga as plaquetas e causa uma redução leve e imediata em seu número circulante, denominado de “trombocitopenia não imune associado a heparina”. A heparina na presença da antitrombina pode também, bloquear a ativação das plaquetas induzida pela trombina, tendo em vista também que impede a ligação do fator de von Willebrand a plaquetas, reduzindo adesão das plaquetas ao subendotélio dos vasos lesados (TOLLEFSEN; ZHANG, 2006).

As vias de eleição para administração da heparina são a intravenosa e subcutânea. Quando a via intravenosa é eleita sua ação é imediata, já pela via subcutânea o efeito máximo ocorre em aproximadamente 3 horas após sua administração, e permanece em torno de 12 horas, sendo sua meia vida dose dependente (SWART et al., 1982). A administração intramuscular é contraindicada pois está relacionada a complicações hemorrágicas no local da injeção (SALZMAN et al., 2004).

A farmacocinética da heparina não é totalmente esclarecida. Na circulação a heparina se liga a várias proteínas plasmáticas, o que reduz sua ação anticoagulante quando utilizada em baixas concentrações, contribuindo para ter uma variabilidade de resposta anticoagulante a heparina entre os pacientes (YOUNG et al., 1992), além de se ligar também as células endoteliais e macrófagos, complicando ainda mais sua farmacocinética.

No entanto, a relação dose-resposta da heparina não é linear, onde a duração e o efeito da heparina aumentam intensamente quando realizado o aumento frequente da sua dose. Saturações de mecanismos como a ligação com células endoteliais e proteínas plasmáticas ocorrem a partir da administração inicial da heparina. Assim uma vez que estes mecanismos estejam saturados, subseqüentes administrações resultam em uma grande quantidade de heparina livre no plasma para fornecer seu efeito anticoagulante (MOORE; HINCHCLIFF, 1994). Este acúmulo de heparina pode causar sangramento, além de que, se a terapia for prolongada podem haver complicações além da hemorragia citada como, anemia, trombocitopenia e sensibilidade dolorosa no local da aplicação

(MOORE; HINCHCLIFF, 1994). Portanto, por este fato é recomendado um regime de doses decrescentes para evitar complicações hemorrágicas e manter os níveis de heparina no plasma dentro do intervalo terapêutico (GERHARDS, 1991).

A depuração da heparina envolve uma combinação de mecanismos de primeira ordem muito rápido e saturável. O mecanismo da fase saturável é através da ligação em receptores nas células endoteliais e macrófagos, o qual é despolimerizado, enquanto o mecanismo insaturável é por via renal sendo mais lento (MOORE; HINCHCLIFF, 1994).

Concentrações séricas de heparina 0,05 a 0,2 UI/ml são suficientes para suprimir a amplificação da cascata de coagulação e prevenir a formação do coagulo/trombo. Assim um método efetivo para a mensuração desta concentração é a determinação do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), sendo que para os tratamentos de desordens coagulatórias a concentração de heparina deve permanecer entre 0,2 a 0,4 UI/ml, que corresponde a um aumento de 1,5 a 2,5 vezes no TTPA normal de um paciente (BOUNAMEAUX et al., 1980).

Em cavalos, o TTPA não é alterado por concentrações plasmáticas de heparina menor que 0,2 UI/ml (GERHARDS, 1991). Assim o tratamento proposto por Moore e Hinchcliff (1994) para a manutenção nos níveis plasmáticos entre 0,2 a 0,4 UI/ml de sangue pode ser com uma aplicação inicial na dose de 150 UI/Kg. Caso o tratamento for continuado, após 12 horas dessa aplicação inicial a dose deve ser reduzida para 125 UI/Kg, com administrações em intervalos de 12 horas, em um total de seis aplicações (3dias). Após a sétima aplicação a dose deve ser reduzida para 100 UI/Kg sendo mantida até o termino do tratamento. Em terapias prolongadas é fundamental o monitoramento do paciente através do TTPA, sendo que se os valores ultrapassarem 2,5 vezes o valor normal o tratamento deve ser interrompido (TRAN; GINSBERG, 2006).

#### 2.5.2. Anticoagulantes parenterais fracionados ou de baixo peso molecular (HBPM)

A heparina fracionada ou de baixo peso molecular (HBPM), apareceu como uma nova opção nos últimos anos. Vários estudos tem demonstrado a sua segurança e eficiência, além de apresentar uma meia vida mais longa permitindo uma anticoagulação com dose única (KOCK et al., 2001).

As HBPM registradas no país são dalteparina sódica, enoxaparina sódica, nadroparina cálcica. São derivadas da heparina por despolimerização química ou enzimática, produzindo fragmentos com um terço do tamanho da heparina, com um peso molecular variando entre 4.500 a 5.000 daltons (HIRSH et al., 2001) e uma potência de 99 – 125 UI de atividade anti-fator Xa por miligrama (LAGE et al., 2007).

A farmacocinética e outras diferenças biológicas entre a HNF e a HBPM podem ser explicadas pelas propriedades de ligação as proteínas circulantes e celulares relativamente menores para as HBPM. Em comparação a HNF, as HBPM aumentam sua ação da AT III sobre o fator Xa, mas com menos ação e capacidade de inativar a trombina, pois as moléculas são muito pequenas para se ligarem tanto a enzima quanto ao inibidor no mesmo momento (fato essencial para ocorrer inibição da trombina), mas não do fator Xa, inativando-o de forma eficaz (HIRSH et al., 2001; KLEINSHMIDT; CHARLES, 2001).

Apresentam assim maior atividade anti Xa em relação a atividade anti IIa, quando comparada a heparina sódica, além de redução ao fator IV plaquetário, com menor índice de trombocitopenia (ALBUQUERQUE; ALBUQUERQUE, 2001).

A biodisponibilidade e a meia vida da HBPM são maiores, pois a ligação a proteínas circulantes é bem menor do que a HNF, permitindo sua utilização em menos aplicações em relação a heparina sódica, sendo a depuração na HNF muito mais rápida (HIRSH et al., 2001).

Suas principais vias para administrações são por via intravenosa, onde tem seu efeito imediato e rápida distribuição pelos tecidos e pela via subcutânea, onde são rapidamente distribuídas, mas seu efeito antitrombótico demora torno de 30 minutos (BONEU, 2000).

A dose preventiva utilizada em humanos é de 20-40 mg/total (cada 24 horas), para uma pessoa de 70 kg, variando de acordo ao nível de risco de cada paciente, onde estas doses correspondem a 0,28-0,57 mg/kg. Já para o uso terapêutico é recomendada uma dose de 1 mg/kg (cada 12 horas) (LAGE et al., 2007). Assim os níveis plasmáticos recomendados para efeito profilático deve se manter entre 0,1 a 0,2 UI/ml e terapêutico entre 0,4 a 0,7 UI/ml (HARENBERG et al., 1997).



Em estudo realizado em equinos por Schwarzwald et al., (2002), constatou-se que a enoxaparina sódica em doses de 40 UI/Kg/SC (0,35 mg/Kg) e 80 UI/Kg/SC (0,72 mg/Kg), ambas cada 24 horas se mostraram adequadas para tratamento anticoagulatório profilático e terapêutico, respectivamente. Desta forma, baseado nestas dosagens utilizada na medicina humana, estudos na medicina equina tem utilizado tais doses como referência (SCHWARZWALD et al., 2002; FEIGE et al., 2003; POUYADE et al., 2009).

O teste de escolha para o monitoramento da terapia com HBPM é a determinação da atividade anti fator Xa (BONEU, 1994; LEVINE et al., 1994), entretanto, na rotina a monitorização laboratorial não é necessária no homem (BONEU, 1994; BUSSEY, 1999) ou em cavalos (SCHWARZWALD et al., 2002), devido a menor incidência de efeitos adversos e risco de sangramento em comparação ao uso da HNF (ROSENBERG, 1997; WEITZ, 1997; HIRSH et al., 1998).

Assim podemos concluir que as preparações de HBPM são eficazes e seguras, e embora seja um produto com preço mais oneroso do que a HNF, a despesa é compensada pelos resultados fornecidos, principalmente pela sua característica de apresentar menos efeitos adversos e necessidade de monitoramento laboratorial.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os protocolos superovulatórios na espécie equina ainda não apresentam resultados satisfatórios quando se diz respeito a recuperação embrionária frente ao número de ovulações obtidas por ciclo, fazendo com que a eficiência nos programas de Transferência de Embriões (TE) ainda seja baixa quando comparada a outras espécies. Parece que o principal fator envolvido na influência da baixa recuperação é a formação de um grande coágulo logo após o processo ovulatório, levando a obstrução da fossa da ovulação, o que posteriormente impede a passagem de alguns oócitos para o interior da tuba uterina. Assim é desejável a adequação de um protocolo de superovulação em éguas, para que se aumente a taxa de recuperação embrionária e que se tenha posteriormente redução de custos nos programas de TE.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, D. C.; ALBUQUERQUE, F.N. Utilização das heparinas nas síndromes isquêmicas agudas. **Revista Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**. v.14, p.28 – 34, 2001.

ALEXANDER SL.; IRVINE CHG. FSH and LH. In: McKinnon AO, Voss JL (eds) **Equine Reproduction**. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 45–56,1993.

ALLEN WR. The physiology of early pregnancy in the mare. In: **Proceedings of the 46th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, p. 338–54, 2000.

ALONSO, J. DE M. **Avaliação da reatividade peritoneal de equinos submetidos à enterotomia de cólon menor e tratados com heparina pela via subcutânea**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária. p. 189. Dissertação de Doutorado., 2013.

ALONSO, M.A.; FLEURY, P.D.C.; ALVARENGA, M.A. Efeito da frequência do tratamento com baixas doses do extrato de pituitária equina na indução de múltiplas ovulações em éguas. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.34, Supl2, p.532, 2006.

ALVARENGA, M.A.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.; NEVES NETO, J.R.; SQUIRES, E.L. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, v.56, p.879-887, 2001.

ALVARENGA, M.A.; SQUIRES, E.L; MACHADO, M, S.; ARANTES, M.; PERES, K.R.; LEO, K.M.; OLIVEIRA, J.V.; ROSER, J.F. Avaliação da resposta superovulatória em éguas tratadas com FSH equino purificado. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.31, p.216-217, 2003.

ALVARENGA, M.A; TONGU, E.A.O. Estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva em programas de transferência de embrião de equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, p.19-24, 2017.

ANDRADE, L.S. O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. **In: Fisiologia e Manejo da Reprodução Equina**. 2o ed, Recife, 1986, p. 57 –63.

BECATTINI, C.; AGNELLI, G.; EMMERICH, J. et al. Initial treatment of venous thromboembolism. **Thrombosis and Haemostasis**. v.96, p.242-50, 2006.

BERGFELT, D. R.; ADAMS, G. P. Ovulation and Corpus Luteum Development. In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. **Current Therapy in Equine Reproduction**, p. 1-13, 2007.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; BRINSKO,S. P.; RIGBY, S. L. **Manual of Equine Reproduction**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 2003.272p.

BONEU, B. Low molecular weight heparins: are they superior to unfractionated heparins to prevent and to treat deep vein thrombosis **Thrombosis Research**, v. 100, p. 113 – 20, 2000.

BONEU, B. (1994) Low molecular weight heparin therapy: **Is monitoring needed** **Thrombosis Haemostasis**. 72, 330-334.

BORGHESAN, A. C. **Avaliação da tromboflebite jugular experimental em equinos tratados com heparina**. 2010. 66f, Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

BOUNAMEAUX, H.; MARBET, G.; LAMMLE, B. et al. Monitoring of heparin treatment: comparison of thrombin time, activated partial thromboplastin time, and plasma heparin concentration and analysis of the behavior of antithrombin II. **American Journal of Clinical Pathology**. v.74, p. 68-73, 1980.

BRANDÃO, A. C. **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide criopreservados de equinos**. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008.

BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. 3rd ed: **Manual of Equine Reproduction**. Mosby. 2011.

BUSSEY, H.I. (1999) **Problems with monitoring heparin anticoagulation**. **Pharmacother**. 19, 2-5.

CARMO, M.T; LOSINO, L.; AQUILAR, J.J.; ARAÚJO, G.H.M.; ALVARENGA, M.A., Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.337-339, 2006.

CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, pg. 252 – 254 2002<sup>a</sup>.

CARMO, M.T. **Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária equina na indução de superovulação em éguas**. Dissertação (mestrado na área de reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu/SP, 2003.

CARMO, M.T. **Estudo do fluido folicular, transporte, recuperação e maturação de oócitos em éguas superovuladas com o extrato de pituitária equina**. Tese (doutorado na área de reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu/SP, 2007.

COMP, P.C. Treatment and management of acute venous thromboembolic disease. **Thrombosis Research**. v.111, p. 3-8, 2003.

DARIEN, B.J. (1993) Heparin therapy: rationale and clinical indications. **The Compendium on Continuing Education for The Practicing Veterinarian**. 15, 1273-1276.

DAY, F.T. Clinical and experimental observation on reproduction in the mare. **The Journal of Agricultural Science**. v.30, p.244-261, 1940.

DIPERT, K.D.; HOFFERER, S.; PALMER, E.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. **Theriogenology**, v.38, p. 695, 1992.

DIPERT, K.D.; JASKO, D.J.; SEIDEL Jr. G.E.; SQUIRES, E.L. Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares. **Theriogenology**, v.41, p.1141-23, 1994.

DOUGLAS, R.H.; Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology**, Los altos, v.11, p.33-46, 1979.

EDWARDS, E. H. **The encyclopedia of the horse**. London: Ed. DORLING KINDERSLEY BOOK, 2008. p. 476.

FARINASSO, A.; BRANQUINHO, J.A.; RUMPF, R.; ALVARENGA, M.A. Utilização de baixas doses de extrato de pituitária equina para indução de ovulações múltiplas em éguas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Angra dos Reis-RJ. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.33, p135-38, 2005.

FEIGE, K.; KÄSTNER, S. B. R.; DEMPFLER, C. E.; BALESTRA, E. Changes in coagulation and markers of fibrinolysis in horses undergoing colic surgery. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 50, p. 30-36, 2003.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Role of diameter differences among follicles in selection of future dominant follicle in mares. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1320-1327, 1997.

GERHARDS, H. Low dose calcium heparin in horses: plasma heparin concentration, effects on red blood cell mass and on coagulation variables. **Equine Veterinary Journal**. v. 23, p. 37-43, 1991.

GIMENES, A.M.; IGNÁCIO, F.S.; BOFF, A.L.N.; BERGFELT, D.R.; MEIRA, C. Enhanced ovarian response to low-dose treatment with equine pituitary Extract in mares. **Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Córdoba, Argentina, 9–12 January 2010**, v.22, p.410.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**. 65, 638–647, 2001.

GINTHER, O.J.; BERGFELDT, D.R. Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rates and on follicular development during the existing pregnancy in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88: 119- 126, 1990.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of mare: basic and applied aspects**. 2<sup>a</sup>. Ed. Crossplains: Equiservices, p.642, 1992.

GINTHER, O.P. **Ultrasound imaging and reproductive events in the mare**. Madison: Equiservice, 1986. p.37.

GOFF AK.; SIROIS J.; PONTBRIAND D. Oxytocin stimulation of plasma 15-keto-13,14-dihydro prostaglandin F2a during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. **Journal Reproduction Fertility Suppl** ; 35:253–60, 1987.

GUERRA, C.C.C.; ROSENFELD, L.G.M. Drogas anticoagulantes In: MAFFEI, F.H.A.; LASTORIA, S.; YOSHIDA, W.B.; ROLLO, H.A. **Doenças Vasculares Periféricas**, 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: MEDSI editora Médica e Científica, 2002, p. 625-36.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole. 2004. 513p.

HARENBER, J.; HUHLE, G.; PIAZOLO, L.; MALSCH, R.; Niedermolekulare Heparine. **Hautarzt**; 48: p. 52-864, 1997.

HIRSH, J.; Warkentin, T.E.; Raschke, R.; Granger, C.; Ohman, E.M.; Dalen, J.E. Heparin and low-molecular-weight heparin: Mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. **Chest** 114, p. 489-510, 1998.

HIRSH, J.; WARKENTIN, T. E.; SHAUGHNESSY, S. G.; ANAND, S. S.; HALPERIN, J. L.; RASCHKE, R.; GRANGER, C.; OHMAN, E. M.; DALNE, J. E. Heparin and low molecular weight heparin. **Chest**, v. 119, p. 64-94, 2001.

HURTGEN J.P. Management of embryo donor mares with chronic infertility. **Proceedings 54th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, San Diego, California. p.414-417, 2008.

HOPPENSTEADT, D.A., WALENGA, J.M., FAREED, J., BICK, R.L. Heparin, low – molecular - weight heparins, and heparina pentasaccharide: basic and clinical differentiation. **Hematology Oncology Clinics North America**. v. 17, p. 432. 2003.

IGNACIO, F.S.; BERGFELT, D.R.; MONTECHIESE, D.F.; ARAUJO, G.H.M.; CARVALHO, R.L.; MEIRA, C. Resposta ovariana e recuperação embrionária em éguas tratadas com 50mg de FSH-p, precedido de aspiração folicular para indução da emergência da nova onda folicular. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.36, p.504, 2008.

IGNÁCIO, F.S.; BERGFELT, D.R.; ORLANDI, C.; MONTECHIESI, D.F.; WECHSLER, F.S.; MEIRA, C. Ovarian response to pFSH and embryo recovery following follicular wave emergence induced by follicle ablation in mares. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.35, p.1245, 2007.

JENNINGS, M.W.; BOIME, I.; DAPHNA-IKEN, D.; JABLONKA-SHARIFF, A.; CONLEY, A.J.; COLGIN, M.; BIDSTRUP, L.A.; MEYERS-BROWN, G.A.; FAMULA, T.R.; ROSER, J.F. The efficacy of recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a 21 follicular suppression model. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p. 191-307, 2009.

KALODIKI, E.; NICOLAIDES, A.N. Superficial thrombophlebitis and low-molecular-weight heparins. **Angiology**. v. 53, p. 659-63, 2002.

KOCK, A.; ZIEGLER, S.; BREITSCHWERDT, H.; VICTOR, N. Low molecular weight heparins and unfractionated heparin in thrombosis prophylaxis: meta analysis based on original patient data. **Thrombosis Research**. v. 102, p. 295 – 309, 2001.

LAGE, S.G.; CARVALHO, R.T.; KOPEL, L.; BASTOS, J.F.; RIBEIRO, M.A.; FAGUNDES JR, A.A.P.; ARAUJO, H.B.N.; STRUNZ, C.C.; Estudo de Segurança e Eficácia da Enoxaparina Sódica na Profilaxia e Terapêutica Antitrombótica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 19, p. 67-73, 2007.

LEVINE, M.N.; HIRSH, J.; GENT, M.; TURPIE, A.G.; CRUICKSHANK, M.; WEITZ, J.; ANDERSON, D.; JOHNSON, M. Arandomized trial comparing activated thromboplastin time with heparin assay in patients with acute venous thromboembolism requiring large daily doses of heparin. **Archives Internal Medicine**. 154, p.49-56, 1994.

LOGAN, N. L.; McCUE, P. M.; ALONSO, M. A.; SQUIRES, E. L. Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 48–55, 2007.

LOSINNO, L.; AGUILAR, J.J. AND LISA, H. Impact of multiple ovulation in a commercial equine embryo transfer programme. **Equine EmbryoTransfer**.v.03, p. 81 – 83, 2000.

MACHADO, M.S.; ARANTES, M.; PERES, K.R.; LEAO, K.M.; CARMO, M.T.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A. Dinâmica folicular, número de ovulações e embriões recuperados em éguas submetidas a tratamento superovulatório utilizando o extrato de pituitária equina e FSH equino purificado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.506-8, 2003.

MACHADO, M.S. **Avaliação da dinâmica folicular de éguas superovuladas com extrato de pituitária equina e FSH equino purificado**. 121p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

MACHADO, M.S. **Avaliação do perfil endócrino de éguas submetidas a tratamentos superovulatórios com extrato de pituitária e FSH equino purificado**. Tese (doutorado na área de reprodução animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu/SP, 2008.

MAJERUS P. W. Blood coagulation and anticoagulation, thrombolytic, and antiplatelet drugs. In: BRUNTON, L. L; CHABNER, B.A.; BJORN, C. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. New York: McGraw Hill, 2006.

McCUE, P.M.; HUGHES, J.P.; LASHLEY, B.L. Effect on ovulation rate of passive immunization of mares against inhibin. **Equine Veterinary Journal.**, v.15 (suppl), p.103-106, 1993.

McCUE, P.M. Superovulation. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, Los Altos, Philadelphia, v.12, n.1, p.1-11, 1996.

McKINNON, A.O.; BROWN, R.W.; PASSION, R.L. Increased ovulation rate in mares after immunization against recombinant bovine inhibin - subunit. **Equine Veterinary Journal**, London, v.24, p.144-146, 1992.

McKINNON, A.; SQUIRES, E. Embryo Transfer and Related Technologies. In: SAMPER, J.; PYCOCK, J.; MCKINNON, A. (Eds.). **Current Therapy Equine Reproduction**. 1<sup>o</sup> ed. p. 319–334, 2007.

McKINNON, A.O; SQUIRES, E.L; VAALA, W.E; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2<sup>o</sup> ed. Wyley-Blackwell:Iowa, p. 1836-1844, 2011.

MEIRA, C., BURATINI, J. Follicular dynamics and superovulation in mares. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.26, p.125-140, 1998.

MONNIAUX, D.; MARIANA, J.C.; COGMIÉ, Y.; RABAHI, F.; MONGET, P.; MERMILLOD, P.; BARIL, G.; TOMANEK, M.; PISSELET, C.; CHUPIN, D.; POULIN, N.; BREBION, P.; BOSCH, M.; NICOLE, A.; FONTAINE, J.; DURAND, P. Controle de la maturation terminale des follicules au cours de la phase folliculaire chez les mammifères domestiques. **Contraception Fertilité Sexualité**, Paris, v. 21, p.403 – 407, 1993.

MOORE, B. R.; HINCHCLIFF, K. W. Heparin: a review of its pharmacology and therapeutic use in horses. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 8, n. 1, p. 26-35, 1994.

MOURA, J. C. A.; MERKT, H. **A ultra-sonografia na reprodução equina**. 2 ed., Salvador: Universitária America, p.162, 1996.

NAGAO, J.F.; NEVES, J.R.; PAPA, F.O; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA, C.P.F.; DELL'AQUA, J.A. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v.136, p. 69-73, 2012

NISWENDER, K.R.; ALVARENGA, M.A.; McCUE, P.M.; HARDT, Q.P.; SQUIRES, E.L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). **Journal of Equine Veterinary Science**, v.23, p.497-500, 2003.

NISWENDER, K.D.; JENNINGS, M., BOIME, I., COLGIN, M., ROSER, J.F. In vivo activity of recombinant equine follicle stimulating hormone in cycling mares. 7th **International Symposium on Equine Embryo Transfer**. Abstract Book., p. 61, 2008.



O'REILLY, R.A. Drogas anticoagulantes, antitrombóticas e trombolíticas. In: GILMAN, A.G., COODMAN, L.S. **Goodman e Gilman : as bases farmacológicas da terapêutica**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 887-90, 1987.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and na attempt at nonsurgical egg transfer in horse. **Journal Reproduction Fertility**. London, v. 31, p. 187, 1972.

ORLANDI, C.; BERGFELT,D.R.; WECHSLER,F.S.; NOGUEIRA,G.P.; PUOLI FILHO,J.N.P.; MEIRA,C. Resposta ovariana durante a superovulação precedida pela emergência da onda folicular induzida por aspiração dos folículos em éguas cíclicas. **Anais da XX reunião anual da SBTE**, supl. 34; p.278, 2006.

ORLANDI, C.M.B. **Resposta ovariana e concentrações plasmáticas de FSH em éguas submetidas a aspiração folicular e tratadas com extrato de pituitária eqüina (EPE)**. 2008. 68f Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, "Julio de Mesquita Filho".

PATTISON ML.; CHEN CL.; KELLEY ST.; BRANDT GW. Luteinizing hormone and estradiol in peripheral blood of mares during estrous cycle. **Biology Reproduction**. 11:245-50, 1974.

RAZ, T.; CARLEY, S.; CARD, C. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. **Theriogenology**, v.71, p.1358-1366,2009.

ROSAS, C.A.; ALBERIO, R.H.; BARANÃO, J.L.; AGUERO, A.; CHAVES, M.G. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, p. 1257-1264, 1998.

ROSENBERG, R.D. Biochemistry and pharmacology of low molecular weight heparin. **Seminars Hematology**. 34, 2-8, 1997.

SCHWARZWAL, C.C.; FEIGE, K.; WUNDERLI-ALLENSPACH, H.; BRAUN, U. Comparison of pharmacokinetic variables for two low-molecular- weight - heparins after subcutaneous administration of a single dose to horses. **American Journal Veterinary Research**. 63, 868-873, 2002.

SCOGGIN, C.F.; MEIRA, C.; McCUE, P.M.; CARNEVALE, E.M.; NETT, T.M.;SQUIRES, E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. **Theriogenology**. v.58, p.151-64, 2002.

SEGABINAZZI LG.; STEIGLEDER LF.; KAIPPER R.; RODRIGUES TS.; ARAGÃO O.; DELL`AQUA JR. JA.; ALVARENGA MA. Indução de múltiplas ovulações em éguas com baixas doses de acetato de deslorelina sem acompanhamento folicular prévio. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n 22, p 1488-1494, 2015.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

SQUIRES, E.L.; MCCLAIN, M.G.; GINTHER, O.J.; MCKINNON, A.O. Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. **Theriogenology**, Los Altos, v. 28, p. 609 –613, 1987.

SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.1-8, 2006.

SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M. Superovulation. In: Mckinnon, A.O. **Equine Reproduction**, 2. ed., v.2, p. 1836 – 1844, 2011.

SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, p. 91 – 104, 1999.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL JR, G.E, Superovulation in collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bull.** n.8, p.32-8,1995.

SQUIRES, E. L. Superovulation in mares. **Veterinary Clinics North America. Equine Practice**, v.22, p.819-830, 2006.

SWART, C.A.M.; NIJMEYER, B.; ROELOFS, J.M.M.; SIXMA, J.J. Kinetics of intravenously administered heparin in normal humans. **Blood**, v.60, p.1251-8, 1982.

THARASANIT, T.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M.; STOUT, T.A.E. Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on follicle development and ovulation in the mare. **Theriogenology**, v. 65, p. 1071–1081, 2006.

TOLLEFSEN, D. M.; ZHANG, L. Heparin and vascular proteoglycans. In: COLMAN, R. W.; MARDER, V. J.; CLOWES, A. W. **Hemostasis and Thrombosis Basics principles and clinical practice**, 5. ed., Philadelphia: Leppincott Willians & Wilkins, p. 217-83, 2006.

TRAN, H.A.M.; GINSBERG, J.S. Anticoagulant therapy for major arterial and venous thromboembolism. In: COLMAN, R.W.; MARDER, V.J.; CLOWES, A.W. et al. **Hemostasis and Thrombosis – Basics principles and clinical practice**, 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Leppincott Willians & Wilkins, p. 1673-88, 2006.

WEITZ, J.I. Low-molecular-weight heparins. **New England Journal Medicine**. 337, 688-698, 1997.

WELCH, S.A.; DENNISTON, D.J.; HUDSON, J.J.; BRUEMMER, J.E.; McCUE, P.M.; SQUIRES, E.L. Exogenous eFSH, Follicle Coasting, and hCG as a novel superovulation regimen in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, p.262-270, 2006.

WOODS, G.L. AND GINTHER, O.J. Recent studies relating to the collection of multiple embryos in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v.19, p.101-108, 1983.

## **HIPÓTESE**

A administração de substância anticoagulante associada ao protocolo superovulatório com extrato de pituitária equina (EPE) é eficaz na inibição da formação do coágulo na fossa ovulatória de éguas, a fim de aumentar e facilitar a captação de oócitos para o interior da tuba uterina, e conseqüentemente elevar as taxas de recuperação embrionária por ciclo nos programas de Transferência de Embriões (TE).

## **OBJETIVOS**

- Verificar o efeito de dois tipos de anticoagulantes (Heparina Sódica e Enoxaparina Sódica) em éguas superovuladas com extrato de pituitária equina (EPE), sobre a taxa de recuperação embrionária;
- Verificar o momento da aplicação dos anticoagulantes pré-ovulação e a dose utilizada sobre a taxa de ovulação das éguas e a suas concentrações plasmáticas neste período;
- Avaliar a segurança do uso dos anticoagulantes através de avaliações hematológicas.



## ***CAPÍTULO 2***

1 Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A2 pelo  
2 QUALIS – CAPES quadriênio 2013 - 2016.  
3 <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>

4  
5 **Aumento da taxa de recuperação embrionária com o uso de anticoagulantes em éguas**  
6 **superovuladas**

7 Lucas T. Rodrigues<sup>1\*</sup>, Frederico O. Papa<sup>1</sup>

8  
9 <sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária  
10 e Zootecnia, FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu,  
11 Brasil

12 \*Autor para correspondência: [lucastroncarellirodrigues@gmail.com](mailto:lucastroncarellirodrigues@gmail.com)

13  
14 **RESUMO**

15 O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de dois tipos de anticoagulantes parenterais  
16 (Heparina não fracionada - HNF e Heparina de baixo peso molecular - HBPM) em éguas  
17 superovuladas com extrato de pituitária equina (EPE), sobre a taxa de recuperação embrionária. Para  
18 isso, 11 éguas, idade entre 4 - 15 anos, histórico clínico e reprodutivo normais, foram utilizadas  
19 durante a estação reprodutiva (outubro de 2018 e março de 2019). Os animais foram divididos em  
20 quatro grupos em delineamento *cross-over*: Grupo 1 (G1) controle ciclo fisiológico; Grupo 2 (G2)  
21 éguas superovuladas e administrado solução fisiológica 0,9%, 35 h após indução da ovulação; Grupo  
22 3 (G3) éguas superovuladas e administrado Heparina Sódica 450 UI/Kg/IV, 35 h após indução da  
23 ovulação e Grupo 4 (G4) éguas superovuladas e administrado Enoxaparina Sódica 1 mg/Kg/IV 35 h  
24 após indução da ovulação. Os tratamentos superovulatórios foram iniciados no sétimo dia após a  
25 ovulação e consistiram na administração de EPE (25 mg a cada 12 h, IM), associado a administração  
26 de dinoprost-trometamina (5 mg, IM) nos dois primeiros dias, sendo interrompido quando a maioria  
27 do(s) folículo(s) atingiram diâmetro de 35 mm, onde neste momento foi realizada a indução da

28 ovulação e 24 horas após os animais foram inseminados. Os embriões foram coletados no nono dia  
29 após a primeira ovulação detectada. Para cada animal submetido aos grupos G3 e G4 foi realizado  
30 avaliações laboratoriais (hemograma e coagulograma), sendo padronizado momentos fixos para  
31 colheitas das amostras de sangue. A análise estatística foi efetuada através do teste de Shapiro-Wilk,  
32 ANOVA e teste de Tukey. Considerando diferenças estatísticas quando  $p < 0,05$ . Não houve diferença  
33 ( $p > 0,05$ ) quanto ao número de ovulações entre os grupos G2 ( $4,6 \pm 0,4$ ), G3 ( $5,2 \pm 0,5$ ) e G4 ( $4,9 \pm 0,6$ ),  
34 entretanto foram superiores ( $p < 0,05$ ) ao grupo G1 ( $1 \pm 0$ ). Já o número de embriões recuperados não  
35 diferiu ( $p > 0,05$ ) entre o grupo controle G1 ( $0,6 \pm 0,2$ ) e o grupo superovulado G2 ( $1,6 \pm 0,5$ ), no entanto,  
36 foi maior para os grupos que receberam anticoagulantes G3 ( $2,5 \pm 0,3$ ) e G4 ( $2,6 \pm 0,6$ ) em relação ao  
37 G1. Quando a taxa de recuperação embrionária por folículo ovulado foi avaliado, os resultados  
38 demonstraram que os grupos tratado com anticoagulantes apresentaram taxas similares (G3 – 50%; G4  
39 – 52%) em comparação ao grupo controle (G1 – 64%), já o grupo apenas superovulado (G2 – 36%)  
40 apresentou tendência de redução ( $P = 0,8$ ) em relação ao grupo controle G1. Os valores hematológicos  
41 em ambos os grupos que receberam anticoagulante (G3 e G4) no momento T3 horas não diferiu  
42 ( $p > 0,05$ ) em relação ao momento T0 hora, mantendo-se dentro dos valores de referência. Quanto ao  
43 coagulograma, para o grupo (G3) os valores de tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) a  
44 partir de uma hora após aplicação (T1 hora) apresentou aumento significativo se manteve até doze  
45 horas após aplicação (T12 horas), onde todos os momentos diferiram-se ( $p < 0,05$ ) em relação ao  
46 momento (T0 hora), já para o tempo de protrombina (TP) houve um aumento ( $p < 0,05$ ) após aplicação  
47 do anticoagulante (T1-T2 horas) em relação ao tempo de avaliação pré aplicação (T0 hora),  
48 reduzindo-se gradativamente a partir de três horas até doze horas após aplicação (T3-T12 horas), não  
49 diferindo ( $p > 0,05$ ) em relação do T0 hora. Para o grupo G4, uma hora após a aplicação (T1 hora)  
50 houve um aumento ( $p < 0,05$ ) da atividade plasmática fator anti-Xa, apresentando um constante  
51 declínio até doze horas (T12 horas), não apresentando diferença ( $p > 0,05$ ) apenas neste momento em  
52 relação ao T9 horas e T0 hora. Desta forma, concluímos que o protocolo proposto no presente estudo

53 é uma alternativa para melhoria das taxas de recuperação embrionária em éguas superovuladas com  
54 EPE, mostrando-se seguro para o uso de ambos os tipos de anticoagulantes sem apresentar alterações  
55 hematológicas ou efeitos adversos que possam comprometer ou colocar em risco a condição clínica  
56 do animal.

57 **Palavras-chave:** Oócito, Fertilização, Embrião, Ovulação múltipla, Extrato de pituitária equina.

58

## 59 **1. Introdução**

60 Para melhorar a eficiência reprodutiva nos programas de transferência de embriões (TE) em  
61 éguas, uma das alternativas é elevar o número de ovulações por ciclo, aumentando assim a chance de  
62 se obter melhores taxas de recuperação embrionária [1].

63 Desta forma, os tratamentos superovulatórios tem sido desejado com esta finalidade, para  
64 selecionar um maior número de folículos dentro de uma única onda folicular e sustentar seus  
65 desenvolvimentos até o momento da ovulação [2], para que posteriormente aumente o número de  
66 oócitos para a fertilização, e se tenha assim um maior número de embriões por éguas doadoras a  
67 serem obtidos em uma única colheita [3], reduzindo os custos desta biotécnica, principalmente no  
68 que se diz respeito ao transporte de sêmen [4] e as receptoras de embrião que teriam que ser mantidas  
69 e esperar vários ciclos para então receber o embrião [5].

70 Contudo, todas as drogas rotineiramente utilizadas para superovular as outras espécies, não tem  
71 sido efetivas para a espécie equina [6]. Dentre as preparações hormonais com mais estudos até o  
72 momento e apresentando melhores resultados para este fim, temos o Extrato de Pituitária Equina  
73 (EPE) e o FSH equino (FSHe) [1].

74 Entretanto por mais que a grande maioria das éguas respondam aos protocolos superovulatórios  
75 com crescimento desejado de números de folículos e posteriores ovulações, sua utilização ainda não  
76 se tornou rotina, pois os resultados ainda são inconsistentes a respeito da recuperação embrionária,

77 sendo este fato observado por diversos autores, que relatam que as taxas de recuperação embrionária  
78 decrescem a medida que o número de ovulações aumentam [7,8].

79 Sabe-se que isso se deve a alguns entraves, como alterações na qualidade do oócito e  
80 principalmente a conformação anatômica do ovário na espécie equina, onde o único ponto em que o  
81 folículo pode se romper é na fossa da ovulação, limitando assim o número de ovulações [9], além de  
82 apresentar grandes coágulos de sangue após processo ovulatório levando a obstrução da fossa da  
83 ovulação, provavelmente impedindo em algum momento a migração de alguns oócitos para o interior  
84 da tuba uterina, fato este observado em um estudo realizado por Carmo [8], mostrando ser o principal  
85 fator limitante e responsável pelas baixas taxas de recuperação embrionária em protocolos de  
86 superovulação na espécie equina.

87 Uma alternativa para prevenir os efeitos indesejados da formação do coágulo seria a utilização  
88 de fármacos anticoagulantes. Essa rápida ação pode ser alcançada com a administração de  
89 anticoagulantes parenterais não fracionadas (HNF) como a Heparina [10-12] e fracionadas ou de  
90 baixo peso molecular (HBPM) como a Enoxaparina [13,14], sendo substâncias de escolha quando  
91 um efeito anticoagulante rápido é necessário, obtendo ação imediata pela administração intravenosa  
92 (IV) [14].

93 Assim é desejável a adequação de um protocolo de superovulação em éguas para que se  
94 aumente o número de ovulações por ciclo juntamente relacionado com a taxa de recuperação de  
95 embriões [15]. Diante disto o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da Heparina Sódica  
96 (HNF) e da Enoxaparina Sódica (HBPM) em éguas superovuladas com extrato de pituitária equina  
97 (EPE), sobre a taxa de embriões recuperados por ciclo de cada égua e suas segurança na condição  
98 clínica do animal.

99

100



## 101 2. Material e métodos

102 Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de  
103 Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ – Unesp – Botucatu/São  
104 Paulo), sob Protocolo # 0175/2017.

### 105 2.1 Preparação do extrato de pituitária equina

106 O extrato de pituitária equina foi preparado segundo o método proposto por Guillon e  
107 Combarous [16] no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e  
108 zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ/UNESP), Campus de Botucatu- SP, utilizando  
109 pituitárias já armazenadas (-20°C). Resumidamente, ao serem processadas, estas foram descongeladas  
110 e banhadas em água destilada, logo após foram trituradas em liquidificador doméstico com solução  
111 de 40 % de etanol e 6 % de acetato de amônia. A fração ativa foi então precipitada aumentando-se a  
112 concentração de etanol em 80 %, sendo em seguida dializada, liofilizada e conservada a uma  
113 temperatura a -20°C.

114 Ao ser utilizado, o EPE liofilizado foi diluído em solução fisiológica na proporção de 10mg/ml,  
115 sendo conservado a uma temperatura a 5°C para posterior utilização em um período máximo de sete  
116 dias.

117 A relação de FSH e LH no EPE foi determinado pelo B.E.T Laboratories (Bet Labs<sup>®</sup>), onde o  
118 EPE utilizado neste estudo continha 79 % de FSH e 21 % de LH por mg.

### 119 2.2 Animais e local de pesquisa

120 Onze (n=11) éguas sem raça definida, com idade variando entre 4 e 15 anos, pesando entre 350  
121 e 450 kg, com boa condição corporal e históricos reprodutivos normais, foram utilizadas durante a  
122 estação reprodutiva, compreendida entre os meses de outubro de 2018 e março de 2019.

123 O experimento foi conduzido na área de Reprodução Animal, CERBEQ - Posto de Monta da  
124 Fazenda Lajeado – UNESP – localizado no município de Botucatu, estado de São Paulo, onde as

125 éguas foram mantidas em piquete com livre acesso a água, feno e sal mineral, além do fornecimento  
126 diário de uma ração comercial para equinos, em um total de 4 Kg divididos duas vezes ao dia.

### 127 *2.3 Estabelecimento da dose dos anticoagulantes*

128 Inicialmente foram utilizadas cinco éguas (n=5) em *crossover desing* para testar quatro  
129 diferentes doses da Heparina Sódica (HNF). Para isso foram divididos em três grupos: Grupos  
130 Heparina Sódica: H1 – 300 UI/Kg/IV, H2 – 400 UI/Kg/I e H3 – 450 UI/Kg/IV. Para o grupo  
131 Enoxaparina Sódica EN – 1mg/kg/IV foi estabelecido a mesma dosagem adotada para uso terapêutico  
132 em humanos.

133 Para isso as amostras de sangue para coagulograma foram coletadas da veia jugular com auxílio  
134 de tubos contendo citrato de sódio a 3,2% nos momentos pré-aplicação (T0 hora-Controle), uma hora  
135 (T1), três horas (T3), seis horas (T6), nove horas (T9) e doze horas (T12) após administração das  
136 substâncias. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos para  
137 obtenção do plasma e em seguidas processadas, para estabelecimento da concentração plasmática.

138 Para avaliação dos grupos da heparina sódica, as amostras foram submetidas a prova de tempo  
139 de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e tempo de protrombina (TP), utilizando Kit comercial  
140 (CLOT<sup>®</sup>, BIOS Diagnóstica).

141

### 142 *2.4 Processamento do sêmen*

143 Para inseminações artificiais de todas as éguas, foi utilizado sêmen de um único garanhão da  
144 raça Quarto de Milha com fertilidade comprovada.

145 O sêmen foi colhido com o auxílio de uma vagina artificial modelo Botucatu [17], filtrado para  
146 remoção de sujidades e da fração gel e em seguida realizada a contagem de espermatozoides (câmara  
147 de Newbauer) e avaliação da cinética espermática através da análise computadorizada CASA  
148 (Hamilton - Thorne<sup>TM</sup>). Posteriormente então foi preparado uma dose contendo 2 bilhões de

149 espermatozoides moveis diluído em meio a base de leite desnatado (Botu-Sêmen Special®) na  
150 proporção 1:1, realizando-se logo em seguida a inseminação.

### 151 2.5 Protocolo superovulatório

152 Através de palpação transretal e ultrassonografia (Sono Scape A5V), as éguas foram avaliadas  
153 diariamente durante todo o experimento a fim de identificar o desenvolvimento folicular e as  
154 ovulações. Para isso, foram acompanhados oito ciclos estrais consecutivos de cada égua durante a  
155 estação reprodutiva, sendo que destes, apenas quatro ciclos foram utilizados, os quais foram  
156 subdivididos em quatro grupos experimentais, dentre eles; Grupo 1 (G1) utilizado como controle,  
157 Grupo 2 (G2) superovulado com extrato de pituitária equina (EPE) e administrado solução fisiológica  
158 0,9%, Grupo 3 (G3) superovulado com EPE e administrado Heparina sódica (HNF) e Grupo 4 (G4)  
159 superovulado com EPE e administrado Enoxaparina Sódica (HBPM).

160 Todos os animais foram avaliados no início da estação de monta até a detecção e  
161 estabelecimento do dia da primeira ovulação da estação (D0). Assim os ciclos subsequentes já foram  
162 utilizados, onde os animais foram aleatoriamente designados aos quatro grupos em *cross-over*  
163 *design*, nos quais todos em algum momento participaram de um dos grupos estudados. Após um ciclo  
164 utilizado o animal tinha um intervalo de um ciclo normal para participar de um novo grupo.

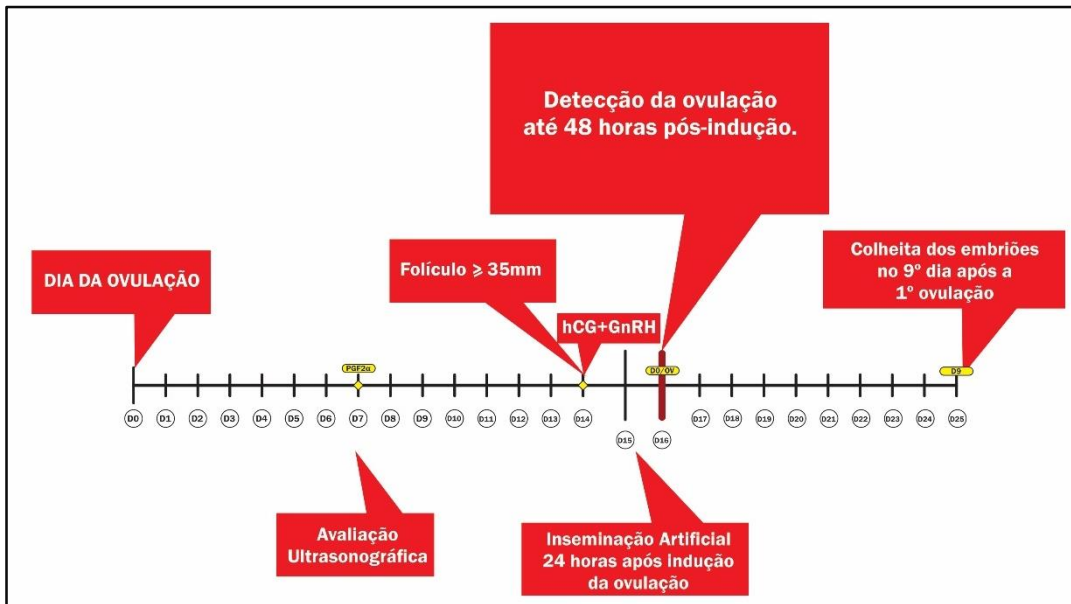
165 Os tratamentos foram iniciados no sétimo dia pós-ovulação (D7), sendo estipulado para grupo  
166 controle (G1) a presença de um corpo lúteo bem evidente e para os grupos superovulados (G2-G3-  
167 G4) além da presença de um corpo lúteo bem evidente, folículos com diâmetro menor ou igual a 23  
168 mm e não podendo haver discrepância maior que 10 mm entre eles. A duração do tratamento  
169 superovulatório não excedeu oito dias (caso não houvesse crescimento dos folículos até o sétimo dia  
170 após início das aplicações de EPE, o tratamento era cessado), sendo interrompido quando a maioria  
171 dos folículos atingissem diâmetro adequado para indução da ovulação. A indução da ovulação foi  
172 realizada quando o(s) folículo(s) atingisse um diâmetro médio de 35 mm e edema uterino grau 2-3.  
173 A partir deste momento, 24 horas após as éguas foram inseminadas.

174 O acompanhamento da detecção da ovulação do grupo controle (G1) e superovulado controle  
175 (G2) era realizado no período de 36-48 horas pós-indução. Já para os grupos superovulados que  
176 receberam um dos anticoagulantes (G3-G4), iniciava-se a partir de 35 horas pós-indução (momento  
177 da administração do anticoagulante) e se entendia até 48 horas. A colheita de embriões foi realizada  
178 no nono (9º) dia após primeira ovulação detectada para todos os grupos.

## 179 *2.6 Descrição dos Grupos Experimentais*

### 180 *2.6.1 Grupo 1 (G1): Controle*

181 Iniciou-se no sétimo (7º) dia pós-ovulação no período da manhã (7:00 h), realizando-se uma  
182 avaliação ultrassonográfica, onde na presença de um corpo lúteo bem evidente, administrou-se 5 mg  
183 de PGF2 $\alpha$  (Dinoprost, Lutalyse<sup>®</sup>), realizando-se posteriores acompanhamentos do crescimento  
184 folicular. Quando um folículo  $\geq 35$  mm e presença de edema uterino foi detectado, administrou-se no  
185 período da tarde (19:00) 1 ml (250 $\mu$ g) de Strelin<sup>®</sup> (Histrelina Acetato) intramuscular e 2.500 UI de  
186 Chorulon<sup>®</sup> (Gonadotrofina Coriônica Humana / “hCG”) intravenoso, realizando-se 24 horas após a  
187 inseminação artificial com sêmen a fresco contendo 2 bilhões de espermatozoides móveis. Detectou-  
188 se a ovulação no período de 36 a 48 horas pós-indução da ovulação. A colheita de embrião foi  
189 realizada no nono (9º) dia após primeira ovulação detectada (Figura 1).



190

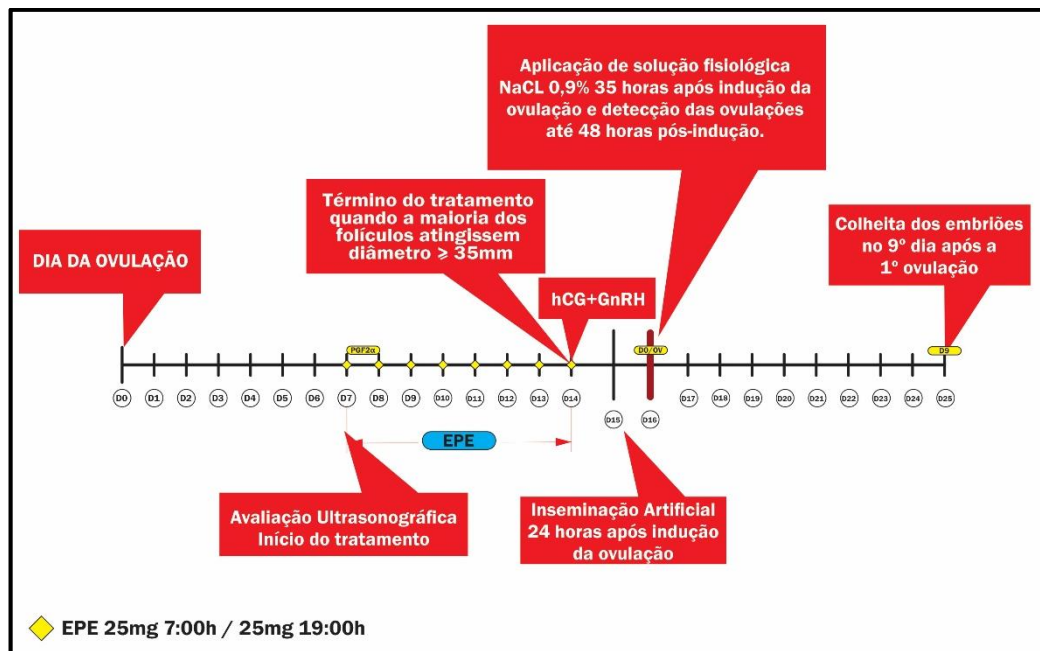
191 Fig. 1 – Representação esquemática do protocolo utilizado no grupo 1 (controle).

192 2.6.2 Grupo 2 (G2): Superovulado com extrato de pituitária equina (EPE) e administrado  
 193 solução fisiológica NaCL 0,9%

194 No sétimo dia pós-ovulação no período da manhã (7:00 h), realizou-se uma avaliação  
 195 ultrassonográfica, onde na presença de um corpo lúteo bem evidente e presença de folículos com  
 196 diâmetro menor ou igual a 23 mm, sem discrepância maior que 10 mm entre eles, iniciou-se o  
 197 primeiro dia do tratamento, administrando-se 25 mg/IM de EPE e 5 mg de PGF2 $\alpha$  (Dinoprost,  
 198 Lutalyse<sup>®</sup>), repetindo a aplicação de EPE no período da tarde (19:00 h) na mesma dosagem. No  
 199 segundo dia do tratamento pela manhã (7:00 h) administrou-se 25 mg/IM de EPE e repetiu-se a  
 200 aplicação de 5 mg de PGF2 $\alpha$  (Dinoprost, Lutalyse<sup>®</sup>), administrando-se somente o EPE (25 mg/IM)  
 201 no período da tarde (19:00 h). Do terceiro dia até detectar uma maioria de folículos com 35 mm,  
 202 aplicou-se EPE pela manhã (7:00 h) e a tarde (19:00 h) sempre utilizando 25 mg/IM. Quando a  
 203 maioria dos folículos atingiu uma média de 35 mm de diâmetro e edema uterino, interrompeu-se o  
 204 tratamento superovulatório e administrou-se no período da tarde (19:00) 1 ml (250 $\mu$ g) de Strelin<sup>®</sup>  
 205 (Histrelina Acetato) intramuscular e 2.500 UI de Chorulon<sup>®</sup> (Gonadotrofina Coriônica Humana /  
 206 “hCG”) intravenoso, realizando-se 24 horas após a inseminação artificial com sêmen a fresco

207 contendo 2 bilhões de espermatozoides móveis. Após 35 horas da indução da ovulação, realizou-se  
 208 ultrassonografia para avaliação da presença de todos os folículos que foram induzidos, desta forma  
 209 não havendo nenhuma ovulação antecipada e constatando-se a presença dos mesmos neste momento  
 210 pré-ovulatório ministrou-se então solução fisiológica NaCL 0,9%, única aplicação, acompanhando-  
 211 se em seguida os processos ovulatórios até 48 horas pós-indução. A colheita de embriões foi realizada  
 212 no nono (9º) dia após primeira ovulação detectada (Figura 2).

213



214

215 Fig. 2 – Representação esquemática do protocolo utilizado no grupo 2 (superovulado com EPE e  
 216 administrado solução fisiológica NaCL 0,9%).

217

218

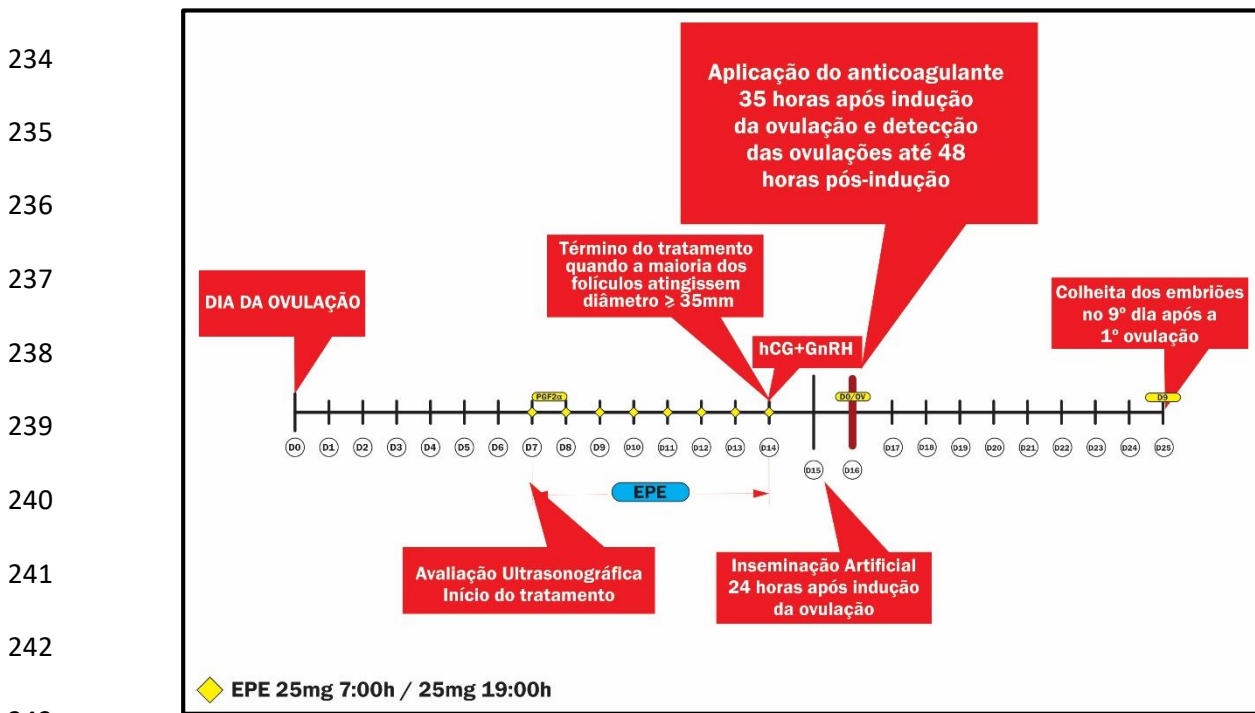
219

220

221

222 2.6.3 Grupo 3 e 4 (G3 e G4): Superovulado com extrato de pituitária equina (EPE) e  
 223 administrado anticoagulante (Heparina Sódica ou Enoxaparina Sódica)

224 Para estes dois grupos seguiram-se as mesmas recomendações do grupo anterior (G2) para  
 225 início de tratamento superovulatório, indução da ovulação e inseminação. No entanto 35 horas após  
 226 indução da ovulação (horário fixo para ambos tratamentos), realizou-se a ultrassonografia para  
 227 avaliação da presença de todos os folículos que foram induzidos, aonde não havendo desta forma  
 228 nenhuma ovulação antecipada e constatando-se a presença dos mesmos neste momento pré-  
 229 ovulatório ministrou-se no Grupo 3 (G3) Heparina Sódica (Hemofol<sup>®</sup> Cristália) 450 UI/Kg/IV única  
 230 aplicação, e no Grupo 4 (G4) Enoxaparina Sódica (Versa<sup>®</sup> Eurofarma) 1 mg/kg/IV única aplicação,  
 231 acompanhando-se em seguida em ambos os grupos os processos ovulatórios até 48 horas pós-indução  
 232 para as detecções das ovulações. A colheita de embriões foi realizada no nono (9<sup>o</sup>) dia após primeira  
 233 ovulação detectada (Figura 3).



244 Fig. 3 – Representação esquemática do protocolo utilizado nos grupos 3 e 4 (superovulado com EPE  
 245 e administrado um dos anticoagulantes).

## 247 2.7 Colheita dos embriões

248 A colheita dos embriões foi realizada no nono (9º) dia após a primeira ovulação detectada, no  
249 intuito de recuperar embriões em estágio de blastocisto a blastocisto expandido, apresentando  
250 diâmetro satisfatório principalmente para facilidade de visualização, evitando possíveis erros na  
251 quantificação dos embriões nos lavados obtidos.

252 Antes da colheita dos embriões, a égua foi previamente avaliada com auxílio do ultrassom via  
253 trans-retal, para verificar as condições uterinas (tonicidade, presença ou não de conteúdo), e o número  
254 de estruturas lúteas condizentes com o número de ovulações verificadas anteriormente. O períneo foi  
255 higienizado com água e sabão neutro e a cauda enfaixada com uma atadura, e por último verificado  
256 região de clitóris e vestibulo vaginal, com objetivo de evitar presença de sujidades a serem carregadas  
257 no momento da introdução da sonda uterina.

258 Para a realização da colheita dos embriões, foi utilizado uma sonda de silicone “ponta de  
259 bala” (bullet tip) a fim de evitar danos futuros a cérvix, acoplada a um frasco de Ringer com Lactato  
260 de Sódio (J.P. Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto-SP), [18]. Após a introdução via cervical para  
261 o corpo do útero, o balonete de “cuff” foi inflado com 40 ml de ar, bloqueando a abertura cervical e  
262 impedindo o retorno de líquido infundido no útero.

263 Foram realizados quatro lavados uterinos, onde cada litro infundido no interior do útero, teve  
264 seu refluxo para dentro de um filtro coletor de 0,75 µc. Após os quatro lavados, o filtro foi levado  
265 ao laboratório, e o conteúdo do filtro foi então despejado em uma placa de Petri de 45 x 25 com fundo  
266 quadriculado, lavando o filtro novamente com 20 ml de Ringer com Lactato de Sódio com o auxílio  
267 de uma seringa de 20 ml e uma agulha 30 x 0,8, para remoção de todo o conteúdo presente ainda no  
268 filtro para o interior da placa.

269 Com auxílio de uma lupa a placa de Petri foi conduzida e submetida a uma rigorosa inspeção  
270 com aumento de 20 x e 40x para localização dos embriões e quantificação dos mesmos. Seis dias  
271 após a colheita de embriões, realizou-se um exame ultrassonográfico criterioso, para diagnosticar



272 uma possível gestação de um embrião que não foi recuperado no lavado uterino, realizando logo após  
273 este momento a aplicação de prostaglandina F2 $\alpha$ .

## 274 *2.8 Exames Laboratoriais*

275 As colheitas das amostras de sangue para exames laboratoriais (Hemograma e Coagulograma)  
276 foram realizadas de maneira padronizada em momentos fixos para todos os animais de ambos os  
277 grupos que receberam anticoagulantes (G3 - Heparina Sódica 450 UI/Kg/IV e G4 - Enoxaparina  
278 Sódica 1 mg/kg/IV).

### 279 *2.8.1 Hemograma*

280 As amostras de sangue para hemograma foram coletadas sempre nos momentos pré-aplicação  
281 (T0 hora-Controle) e três horas após a aplicação de um dos anticoagulantes (T3 horas). Para isso o  
282 sangue foi colhido da veia jugular em tubos contendo (EDTA K3), onde foram processados  
283 imediatamente após cada colheita, avaliando-se posteriormente hemácias, hematócrito, proteína  
284 plasmática, contagem total de plaquetas e fibrinogênio.

### 285 *2.8.2 Coagulograma*

286 Para o coagulograma as amostras de sangue foram coletadas da veia jugular com auxílio de  
287 tubos contendo citrato de sódio a 3,2% nos momentos pré-aplicação (T0 hora-Controle), nas três  
288 primeiras horas (T1-T2-T3 horas), e em seguida a cada três horas finalizando com doze horas após a  
289 administração de um dos anticoagulantes (T6-T9 e T12 horas). As amostras logo em seguida foram  
290 centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos para obtenção do plasma e em seguida armazenados a  
291 -80°C para posterior avaliação.

292 Para avaliação do Grupo 3 - Heparina Sódica 450UI/Kg/IV, as amostras foram submetidas a  
293 prova de tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) e tempo de protrombina (TP), utilizando  
294 Kit comercial (CLOT<sup>®</sup>, BIOS Diagnóstica). Já para o Grupo 4 – Enoxaparina Sódica 1mg/Kg/IV, as

295 amostras foram processadas a partir do método da avaliação do substrato cromogênico do fator Xa.  
296 A partir de um pool derivado do plasma de 11 equinos clinicamente saudáveis, as amostras foram  
297 realizadas a partir do uso de um kit comercial (BIOPHEN Heparin Calibrator) em equipamento  
298 específico (ACL TOP500) para dosagem do fator anti Xa. O plasma dos animais foi mantido  
299 armazenado em criotubos a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios e todas as amostras  
300 foram realizadas em triplicata. Com base nos momentos definido e citados anteriormente, em tubos  
301 de ensaio, adicionou-se a antitrombina III, solução padrão e amostra, respectivamente. As amostras  
302 foram homogeneizadas e transferidas para placas de 96 poços (ELISA) e mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  até a adição  
303 da solução de fator Xa. As amostras foram incubadas durante dois minutos e, posteriormente,  
304 adicionou-se a solução de substrato cromogênico e a reação foi interrompida após 4 minutos pela  
305 adição de ácido acético a 20%. A leitura foi realizada através de espectofotometria.

## 306 2.9 Análise estatística

307 Para avaliação das análises estatísticas foi utilizado o programa *Statistical Analysis Software* –  
308 SAS (SAS Institute, 2007). Inicialmente foi efetuado o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da  
309 distribuição dos dados e posteriormente utilizou-se a análise de Variância (ANOVA) para medidas  
310 repetidas seguidas do teste de Tukey. Foram consideradas diferenças estatísticas quando  $p < 0,05$ .

311

## 312 3. Resultados

313 Os resultados do TTPA com a dose de 300 UI/Kg/IV de heparina sódica não demonstraram  
314 diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos momentos avaliados. Por outro lado quando foi  
315 realizado a aplicação de 400 UI/kg/IV houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os momentos T0-T6  
316 e T9 horas, havendo um aumento do TTPA somente seis horas (T6 horas) após aplicação do fármaco.  
317 Já com a dose de 450 UI/Kg/IV todos os momentos diferiram-se ( $p < 0,05$ ) em relação ao T0 hora,  
318 sendo constatado aumento esperado do TTPA uma hora (T1 hora) após aplicação (Tabela 1).

319 Em relação aos achados de TP após administração da dose de 300 UI/Kg observou-se que os  
 320 momentos T1-T6 horas diferiram ( $p < 0,05$ ) do T12 horas. Já para os valores de TP com as doses de  
 321 400 e 450 UI/Kg foi constatado aumento ( $p < 0,05$ ) uma hora após aplicação, com redução decrescente  
 322 de acordo com os tempo avaliados (Tabela 1).

323 **Tabela 1** - Média  $\pm$  desvio padrão dos valores do tempo de tromboplastina parcial ativada e do tempo  
 324 de protrombina, em segundos, nos diferentes tempos avaliados nos grupos com aplicação do  
 325 anticoagulante heparina sódica.

	T0 hora	T1 hora	T3 horas	T6 horas	T9 horas	T12 horas
H1 - TTPA (s)	51 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	66 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	67 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	62 $\pm$ 9 <sup>a</sup>
H2 - TTPA (s)	48 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	117 $\pm$ 76 <sup>ab</sup>	117 $\pm$ 76 <sup>ab</sup>	218 $\pm$ 48 <sup>b</sup>	218 $\pm$ 49 <sup>b</sup>	205 $\pm$ 74 <sup>ab</sup>
H3 - TTPA (s)	43 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	240 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	240 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	240 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	240 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	240 $\pm$ 0 <sup>b</sup>
H1 - TP (s)	13 $\pm$ 0,5 <sup>ab</sup>	19 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>ab</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	14 $\pm$ 1 <sup>ab</sup>	10 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
H2 - TP (s)	13 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	28 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	22 $\pm$ 5 <sup>abc</sup>	18 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	17 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	15 $\pm$ 2 <sup>ac</sup>
H3 - TP (s)	11 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	35 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	21 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>	17 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>	12 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 1 <sup>a</sup>

326 <sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). TTPA = Tempo de tromboplastina parcial ativada, TP =  
 327 Tempo de protrombina, s = segundos, T0 = avaliação pré administração do anticoagulante, T1 a T12 = avaliação em horas após  
 328 aplicação do anticoagulante.

330 O número médio de folículos entre 30-40 mm no momento na indução da ovulação foi similar  
 331 e não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre os grupos superovulados (G2 – 5,5 $\pm$ 0,6; G3 – 5,8 $\pm$ 0,5; G4 – 5,4 $\pm$ 0,5), no  
 332 entanto foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle G1 (1 $\pm$ 0). Da  
 333 mesma forma, consequentemente se obteve um maior ( $p < 0,05$ ) número de ovulações nos grupos de  
 334 éguas superovuladas (G2 – 4,6 $\pm$ 0,4; G3 – 5,2 $\pm$ 0,5; G4 – 4,9 $\pm$ 0,6) em relação ao G1 (1 $\pm$ 0). Também  
 335 ao avaliar a porcentagem obtida de ovulação por folículo induzido, não foi observada diferença entre  
 336 os grupos G1 (100 $\pm$ 0), G2 (87 $\pm$ 4), G3 (92 $\pm$ 4) e G4 (91 $\pm$ 5) (Tabela 2).

337 Quanto ao número de embriões recuperados não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre o grupo  
 338 controle G1 (0,6 $\pm$ 0,2) e o grupo de égua superovulada G2 (1,6 $\pm$ 0,5), entretanto, foi maior ( $p < 0,05$ )  
 339 para os grupos que receberam anticoagulante G3 (2,5 $\pm$ 0,3) e G4 (2,6 $\pm$ 0,6) em relação ao G1 (Tabela  
 340 2).

341 Ao comparar a taxa de recuperação embrionária por folículo ovulado, os grupos que receberam  
 342 anticoagulante apresentaram taxas similares (G3 – 50%; G4 – 52%) ao grupo controle (G1 – 64%),  
 343 já o grupo apenas superovulado (G2 – 36%) apresentou tendência de redução (P = 0,8) em relação ao  
 344 grupo controle G1 (Tabela 2).

345 **Tabela 2** - Média  $\pm$  desvio padrão das variáveis para cada tratamento.

Variável	G1	G2	G3	G4
Nº de folículos induzidos (33 - 40mm)	1 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	5,5 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	5,8 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	5,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
Nº de folículos ovulados até 48h (Pós indução)	1 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	4,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	5,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	4,9 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
Nº de embriões recuperados	0,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,5 <sup>ab</sup>	2,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	2,6 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
% recuperação embrião por folículo ovulado	64 $\pm$ 15 <sup>x</sup>	36 $\pm$ 10 <sup>Y</sup>	50 $\pm$ 7 <sup>xy</sup>	52 $\pm$ 9 <sup>xy</sup>
% de ovulação por folículo induzido	100 $\pm$ 0	87 $\pm$ 4	92 $\pm$ 4	91 $\pm$ 5

346 <sup>ab</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05). <sup>xy</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam tendência  
 347 estatística (p=0,8) G1 = Controle; G2 = Grupo superovulado controle, G3 = Grupo superovulado + heparina, G4 = Grupo  
 348 superovulado + enoxaparina.  
 349

350 Não houve diferença significativa (p>0,05) quando foi comparado a porcentagem/número de  
 351 éguas que tiveram  $\geq 3$  ovulações por ovário entre os grupos que foram superovulados com ou sem  
 352 anticoagulante G2 (81%; 9/11 éguas), G3 (72%; 8/11) e G4 (72%; 8/11), da mesma forma para o  
 353 número de folículos ovulados 4,9 $\pm$ 1,5, 6,0 $\pm$ 1,4 e 5,5 $\pm$ 1,8, respectivamente (Tabela 3).

354 Em relação ao número de embriões recuperados em éguas que tiveram  $\geq 3$  ovulações por ovário  
 355 não houve diferença estatística (p>0,05) entre os grupos apenas superovulado ou superovulado com  
 356 anticoagulante (G2 – 1,8 $\pm$ 1,6; G3 – 2,8 $\pm$ 1,0; G4 – 2,9 $\pm$ 2,2), no entanto numericamente foi constatado  
 357 um maior número de embriões obtidos para os grupos de éguas que receberam o anticoagulante (G3  
 358 e G4) (Tabela 3).

359 Também não houve diferença (p>0,05) quando foi analisado nestas éguas com  $\geq 3$  ovulações  
 360 por ovário o percentual de animais que tiveram pelo menos  $\geq 2$  embriões recuperados (G2 – 55%; G3  
 361 – 100% e G4 – 75%), entretanto demonstrou maior percentual para os grupos com anticoagulante (G3  
 362 e G4) em relação ao grupo (G2) (Tabela 3).

363

364 **Tabela 3** – Descrição das variáveis de éguas que ovularam no mínimo três folículos em um ovário.

Variável	G2	G3	G4
Número de animais	81% (9/11)	72% (8/11)	72% (8/11)
Média do nº de folículos ovulados	4,9 ± 1,5	6,0 ± 1,4	5,5 ± 1,8
Média do nº de embriões recuperados	1,8 ± 1,6	2,8 ± 1,0	2,9 ± 2,2
% animais com ≥ 2 embriões recuperados	55% (5/9)	100% (8/8)	75% (6/8)

365 G2 = superovulado controle, G3 = Grupo superovulado + heparina, G4 = Grupo superovulado + enoxaparina (p>0,05).

366 Os valores hematológicos dos animais em ambos os grupos que receberam anticoagulante (G3  
367 e G4) no momento T3horas não diferiu (p>0,05) em relação ao momento T0hora, mantendo-se dentro  
368 dos valores de referência para espécie equina (Tabela 4).

369 **Tabela 4** - Média ± desvio padrão em relação aos valores hematológicos de referências nos grupos  
370 que receberam anticoagulante nos diferentes tempos avaliados.

	Referência	G3		G4	
		T0 hora	T3 horas	T0 hora	T3 horas
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	6,8 – 12,9	8,5 ± 2,8	7,6 ± 1,3	7,1 ± 1,0	7,1 ± 0,8
Hematócrito (%)	32 – 53	36 ± 10	33 ± 5	32 ± 2	30 ± 1
Proteína Plasmática (g/dL)	5,8 – 8,7	6,7 ± 0,6	6,6 ± 0,7	6,6 ± 0,5	6,2 ± 0,4
Plaquetas (μL) x10 <sup>3</sup>	100 – 350	190 ± 40	175 ± 55	217 ± 80	205 ± 80
Fibrinogênio (mg/dL)	100 – 400	400 ± 126	400 ± 220	500 ± 110	333 ± 163

371 G3 = Grupo superovulado + heparina, G4 = Grupo superovulado + enoxaparina, T0 = avaliação pré administração do anticoagulante,  
372 T3 = avaliação 3 horas após aplicação do anticoagulante (p>0,05).

373

374 Para o coagulograma do grupo que recebeu heparina sódica (G3), constatou-se a partir de uma  
375 hora após aplicação (T1 hora) aumento significativo do TTPA se mantendo até doze horas após  
376 aplicação (T12 horas), onde todos os momentos diferiram-se (p<0,05) em relação ao momento T0  
377 hora (controle). Para os valores de TP houve um aumento (p<0,05) após aplicação do anticoagulante  
378 (T1-T2 horas) em relação ao tempo de avaliação pré administração (T0 hora), reduzindo-se  
379 gradativamente a partir de três horas até doze horas após aplicação do anticoagulante (T3-T12 horas),  
380 não diferindo (p>0,05) em relação ao T0 hora (Tabela 5).

381 **Tabela 5** - Média  $\pm$  desvio padrão dos valores do tempo de tromboplastina parcial ativada e do tempo  
 382 de protrombina, em segundos, nos diferentes tempos avaliados no grupo superovulado com aplicação  
 383 do anticoagulante heparina sódica.

	T0 hora	T1 hora	T2 horas	T3 horas	T6 horas	T9 horas	T12 horas
TTPA (s)	44 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	>240 <sup>a</sup>	>240 <sup>a</sup>	>240 <sup>a</sup>	>240 <sup>a</sup>	>240 <sup>a</sup>	>240 <sup>a</sup>
TP (s)	11 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	37 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	27 $\pm$ 7 <sup>ab</sup>	21 $\pm$ 5 <sup>bc</sup>	17 $\pm$ 6 <sup>bc</sup>	16 $\pm$ 5 <sup>bc</sup>	14 $\pm$ 4 <sup>bc</sup>

384 <sup>abc</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). TTPA = Tempo de tromboplastina parcial ativada, TP =  
 385 Tempo de protrombina, s = segundos, T0 = avaliação pré administração do anticoagulante, T1 a T12 = avaliação em horas após  
 386 aplicação do anticoagulante.  
 387

388 Já para o grupo enoxaparina sódica (G4), uma hora após a aplicação (T1 hora) houve um  
 389 aumento ( $p < 0,05$ ) da atividade plasmática fator anti-Xa, apresentando logo em seguida um constante  
 390 declínio até doze horas (T12 horas), não apresentando diferença ( $p > 0,05$ ) apenas neste momento em  
 391 relação ao T9 horas e T0 hora (Tabela 6).

392 **Tabela 6** - Média  $\pm$  desvio padrão dos valores da dosagem do fator anti-Xa em UI/mL, nos diferentes  
 393 tempos avaliados no grupo superovulado com aplicação do anticoagulante enoxaparina sódica.

	T0 hora	T1 hora	T2 horas	T3 horas	T6 horas	T9 horas	T12 horas
Fator anti-Xa (UI/mL)	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	1,09 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	0,78 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>	0,58 $\pm$ 0,07 <sup>d</sup>	0,28 $\pm$ 0,07 <sup>e</sup>	0,15 $\pm$ 0,05 <sup>f</sup>	0,08 $\pm$ 0,04 <sup>af</sup>

394 <sup>abc...</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). T0 = avaliação pré administração do anticoagulante, T1 a  
 395 T12 = avaliação em horas após aplicação do anticoagulante.  
 396

#### 397 4. Discussão

398 Diversos estudos com a finalidade de melhorar os resultados aos tratamentos de superovulação  
 399 na espécie equina foram realizados nos últimos anos, citando diversos fatores que podem influenciar  
 400 na resposta superovulatória e na incógnita ainda de apresentar baixa taxa de recuperação embrionária.  
 401 Assim torna-se desejável a adequação de um protocolo de superovulação para que se aumente o  
 402 número de ovulações por ciclo, taxa de recuperação embrionária e redução de custos nos programas  
 403 de TE.

404 No presente estudo, foi observado um valor médio de 4,9 ovulações por égua nos tratamentos  
 405 superovulatórios dos três grupos (G2, G3 E G4), permitindo afirmar que o dia que se iniciou o

406 tratamento, o tipo de hormônio, dose e frequência das aplicações que foi utilizado neste estudo foi  
407 eficaz em superestimular com eficiência a atividade ovariana de éguas cíclicas, apresentando boa taxa  
408 de ovulação por égua, estando de acordo com outros estudos que utilizaram protocolos semelhantes  
409 e também obtiveram taxas de ovulações satisfatórias [7,19-21].

410 Em relação aos principais valores encontrados no experimento quando se comparou o grupo  
411 superovulado (G2) ao superovulado e administrado heparina sódica (G3) e superovulado e  
412 administrado enoxaparina sódica (G4), foi obtido respectivamente 4,6; 5,2 e 4,9 ovulações e 1,6; 2,5  
413 e 2,6 embriões recuperados, não sendo observado diferenças significativas estatisticamente.  
414 Entretanto, o número de embriões recuperados nos grupos 3 (heparina sódica) e 4 (enoxaparina  
415 sódica) foram numericamente superiores ao grupo 2 (apenas superovulado); provavelmente o  
416 pequeno número de animais usados possa ter interferido na análise estatística dos resultados. Contudo  
417 quando comparado ao grupo controle (G1), foi observado que os índices de recuperação embrionária  
418 foram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) superiores para os grupos 3 e 4 que receberam um dos  
419 anticoagulantes.

420 Quando a taxa de recuperação embrionária por folículo ovulado foi avaliada no grupo  
421 superovulado (G2), observou-se um percentual de 36%, apresentado valor inferior e com tendência  
422 de redução ( $P = 0,8$ ) quando comparado ao grupo controle (G1) que obteve uma taxa de 64%, valores  
423 estes de acordo com o reportado por outros autores [22-24] que descreveram que a taxa de  
424 recuperação embrionária por ovulação é similar ou até inferior a taxa observada em éguas que não  
425 foram submetidas a um tratamento superovulatório.

426 No entanto, a taxa de recuperação embrionária observada nos grupos superovulados que  
427 receberam o anticoagulante (G3 – 50% e G4 – 52%) foi similar ao controle (G1 – 64%). Esses  
428 resultados demonstram que os tratamentos com anticoagulantes foram os que mais se aproximaram  
429 das condições fisiológicas.

430 Realizando uma avaliação geral dos resultados já demonstrados até os dias atuais por autores que  
431 utilizaram diferentes doses e frequências de administração de extrato de pituitária equina, observa-se  
432 uma média de 4-5 ovulações/égua, 1,2-2,0 embriões recuperados e uma taxa por volta de 30-40% de  
433 embriões recuperados por folículo ovulado [19-21,25-27]. Quando comparados aos nossos  
434 resultados, foi observado a mesma média de ovulação, entretanto com valores superiores para número  
435 de embriões recuperados e taxa de recuperação embrionária por folículo ovulado nos grupos que  
436 foram superovulados e receberam um dos anticoagulantes G3 e G4 (2,5 e 50%; 2,6 e 52%,  
437 respectivamente).

438 Alvarenga et al. [7] obtiveram o melhor resultado superovulatório demonstrado até os nossos  
439 dias, utilizando EPE em éguas, com a proposta de realizar administrações duas vezes ao dia, obtendo  
440 neste experimento uma taxa de 49% embriões recuperados por ovulação, valor este semelhante ao  
441 encontrado neste estudo quando se utilizou os anticoagulantes (G3 e G4).

442 No entanto a grande questão é que diversos trabalhos demonstram que o número de embriões  
443 recuperados por ovulação diminui com o aumento da resposta ovariana das éguas [7,27-29], fato este  
444 também observado por Carmo et al. [30] e Carmo [8] demonstrando haver a redução a partir da terceira  
445 ovulação por ovário, atribuindo esta causa a presença de um grande coágulo na fossa da ovulação  
446 impedindo a captação de alguns oócitos, alterando posteriormente na recuperação embrionária. Welch  
447 et al. [31] também relatam que quando as ovulações são bilaterais há uma maior taxa de recuperação  
448 embrionária quando comparado as ovulações unilaterais.

449 Estas informações se confirmam no presente estudo quando foram avaliadas as éguas que  
450 tiveram no mínimo três ovulações por ovário e não receberam o anticoagulante, constatando que  
451 mesmo não diferindo estatisticamente ( $p > 0,05$ ), numericamente obteve-se um maior número de  
452 embriões para as éguas superovuladas que receberam anticoagulante (G3 – 2,8 e G4 – 2,9) em relação  
453 as éguas apenas superovuladas (G2 – 1,8). Os grupos superovulados tratados com anticoagulante (G3  
454 e G4) também demonstraram serem superiores em relação ao grupo apenas superovulado (G2) ao



455 analisar nesta classe de éguas a porcentagem de animais que tiveram pelo menos  $\geq 2$  embriões  
456 recuperados por lavado, obtendo respectivamente nos grupos 2, 3 e 4 (55%, 100% e 75% das éguas).

457 Estes valores permitem afirmar, que quando se utilizou heparina sódica ou enoxaparina sódica  
458 no protocolo superovulatório (G3 e G4, respectivamente) ocorreu tanto um aumento da recuperação  
459 de embriões quanto no percentual de éguas fornecendo no mínimo dois embriões por lavado,  
460 resultado inverso quando observado o grupo superovulado sem a administração de anticoagulante  
461 (G2), apoiando a hipótese de Carmo [8] em ter ocorrido neste grupo a formação de um coágulo  
462 levando a alteração da captação de alguns oócitos para o interior da tuba uterina e conseqüentemente  
463 o baixo número de embriões obtidos.

464 Em um estudo relatado por Salomon e Amsterdam [32] foi sugerido que a heparina pode  
465 desempenhar um papel regulador no processo ovulatório, alterando a atividade do hormônio  
466 luteinizante (LH), e levando a alterações ovulatórias. Neste experimento não houve diferença entre  
467 os grupos ( $p > 0,05$ ) em relação a porcentagem de ovulação obtida por folículo induzido G1 (100%),  
468 G2 (87%), G3 (92%) e G4 (91%), demonstrando que a dose utilizada e o momento que foi administrado  
469 não causou nenhuma interferência ovulatória por nenhum dos dois tipos de heparina utilizados, entre  
470 elas heparina sódica (G3) e enoxaparina sódica (G4).

471 Outro fator relatado é que a terapia prolongada com a heparina não fracionada (HNF) pode  
472 levar a alterações hematológicas, como anemia, hemorragia, trombocitopenia e sensibilidade  
473 dolorosa no local da aplicação, fato este associado por apresentar aumento crescente na concentração  
474 sérica [33], além de aglutinação eritrocitária em cavalos [34].

475 A diminuição do número de hemácias é relatada como um efeito tóxico do tratamento com  
476 heparina em equinos [35,36]. Este efeito está principalmente relacionado a aglutinação das hemácias  
477 devido ao acúmulo na microcirculação. Ao que parece, que após a aplicação da heparina ocorre uma  
478 diminuição da atividade proteolítica, que desta forma permite a aderência de substâncias proteicas a  
479 membrana da hemácia, causando a aglutinação [33]. Já Duncan et al. [37] relatam esta redução das

480 hemácias ao aumento na fagocitose destas células por macrófagos, pelo complexo heparina-  
481 fibronectina. No entanto a teoria defendida devido a aglutinação das hemácias é a mais consistente  
482 devido a rápida recuperação da contagem de células após a suspensão do tratamento com heparina  
483 [33], fato este também observado por Borghesan [38] e Alonso [39].

484 Com referência a heparina de baixo peso molecular (HBPM), estas complicações relatadas com  
485 a heparina sódica (HNF) tanto em humanos quanto em cavalos são reduzidas quando são utilizadas,  
486 mostrando-se mais segura [33,34]. Vantagens na farmacocinética desta heparina (HBPM) explica suas  
487 diferenças com a heparina não fracionada (HNF) [34,40].

488 O valor referido como normalidade para contagem de hemácias em equino é entre 6,8 - 12,9 x  
489 10<sup>6</sup> [41], onde todos os animais de ambos os grupos que receberam heparina sódica (G3) ou  
490 enoxaparina sódica (G4) neste estudo não demonstraram queda no hematócrito, mantendo seus valores  
491 dentro da normalidade do padrão de referência, além de que o grupo que recebeu enoxaparina (G4)  
492 manteve valores mais estáveis comparando pré e pós aplicação, confirmando uma de suas vantagens  
493 deste tipo de heparina de baixo peso molecular. Quanto a aglutinação de hemácias não foi constatada  
494 em nenhum destes animais de ambos os grupos.

495 Outros estudos já constataram ocorrência de queda do hematócrito nos animais que foram  
496 submetidos ao tratamento com heparina sódica (HNF) [33,38,39]. Entretanto este fato se explica pelo  
497 tempo de tratamento que estes animais foram submetidos, onde neste estudo foi utilizado apenas uma  
498 aplicação única de heparina não expondo os animais a uma terapia prolongada.

499 Já a diminuição de plaquetas circulantes (trombocitopenia) em humanos é comum após  
500 tratamento prolongado com heparina, que é resultado do aumento da agregação plaquetária. Este  
501 evento, denominado de “trombocitopenia não imune associada a heparina”, provavelmente ocorre  
502 pela interação direta entre heparina e plaquetas [42]. Entretanto em equinos a trombocitopenia é mais  
503 difícil de ser observada, principalmente quando se utiliza heparina de baixo peso molecular, havendo  
504 apenas leve diminuição do número de plaquetas, porém não significativa [34,37]. Resultado este que

505 corrobora com os achados desse experimento, onde tanto no grupo que recebeu heparina sódica (G3)  
506 como a enoxaparina sódica (G4), observou-se uma discreta diminuição não significativa ( $p>0,05$ ) do  
507 número de plaquetas quando comparado o momento pré-medicação (T0 hora) e após três horas (T3  
508 horas), mantendo-se dentro dos valores de referência.

509 A heparina (HNF) também apresenta uma resposta individual para cada animal frente ao  
510 tratamento, assim a monitorização laboratorial é essencial para ajuste da dose ou suspensão do  
511 tratamento. Para isso o TTPA é o teste mais utilizado por ser sensível aos efeitos inibitórios da  
512 heparina sobre trombina, o fator Xa e o fator IXa [14]. É descrito para que o tratamento com heparina  
513 seja efetivo, que a sua concentração esteja entre 0,2 a 0,4 UI/ml, que corresponde a um aumento de  
514 1,5 a 2,5 vezes no TTPA normal de um paciente [43].

515 Segundo Duncan et al. [37] a dose de heparina de 160 UI/Kg já resulta em um aumento de 1,5-  
516 2,5 vezes do TTPA em relação ao valor basal. Já Alonso [39] e Borghesan [38] ao utilizarem heparina  
517 nesta dose de 150 UI/Kg indicada, relataram não ter alcançado este valor desejado do aumento do  
518 TTPA mesmo os tratamentos serem relativamente longos.

519 Baseado nestas oscilações de resultados, antes de iniciar este experimento foi realizado testes  
520 de TTPA para a heparina sódica, utilizando diversas doses (300; 400 e 450 UI/Kg/IV) para posterior  
521 padronização de uma dose que aumentasse no mínimo 1,5 vezes o TTPA com uma única aplicação  
522 intravenosa e se mantivesse por no mínimo 12 horas, não alterando posteriormente os parâmetros  
523 clínicos e hematológicos dos animais.

524 Desta forma, conseguiu-se obter o resultado com uma dose de heparina de 450 UI/Kg/IV, única  
525 aplicação, entretanto com um aumento maior que 2,5 vezes no valor do TTPA. Contudo, esta dose  
526 utilizada não causou alterações clínicas e hematológicas em nenhum dos animais como relatado  
527 anteriormente, constatando-se a partir de uma hora após aplicação (T1hora) aumento significativo do  
528 TTPA se mantendo até doze horas após aplicação (T12horas). Os resultados do tempo de protrombina  
529 (TP) demonstrou aumento apenas após uma hora da aplicação da heparina até duas horas, reduzindo-

530 se gradativamente até doze horas após aplicação. Contudo se trata de um teste pouco sensível para  
531 avaliação dos efeitos da heparina sobre o sistema de coagulação, pois este fármaco atua na via  
532 intrínseca, já o teste de TP avalia a via extrínseca da coagulação [44].

533 No entanto, para a terapia com heparina de baixo peso molecular (HBPM), o teste de escolha  
534 para seu monitoramento da concentração plasmática é através da determinação da atividade anti fator  
535 Xa [45,46], entretanto, na rotina a monitorização laboratorial não se torna necessária em humanos  
536 [45,47] ou em equinos [48], devido sua menor incidência de efeitos adversos e riscos de sangramento  
537 em comparação ao uso da heparina (HNF) [49-51].

538 A dose preventiva utilizada na medicina humana varia entre 0,28 – 0,57 mg/kg (variando de  
539 acordo com o risco de cada paciente) e para uso terapêutico 1 mg/kg (cada 12 horas) [13,52]. Assim  
540 os níveis plasmáticos para um efeito profilático deve se manter entre 0,1 a 0,2 UI/ml e terapêutico  
541 entre 0,4 a 0,7 UI/ml [53].

542 Portanto a dose de enoxaparina (HBPM) 1mg/Kg/IV que usamos em equinos foi a mesma  
543 adotada para uso terapêutico em humanos, onde a partir de uma hora após aplicação observou-se  
544 aumento significativo do nível plasmático se mantendo em adequadas concentrações dentro dos  
545 valores de referência até doze horas após aplicação. Entretanto observou-se uma meia vida menor  
546 apresentando uma depuração mais rápida dos níveis plásticos, em comparação aos achados de  
547 Schwarzwald et al. [48], onde com uma dose semelhante à deste estudo e administração subcutânea  
548 demonstrou doze horas após a administração uma maior concentração plasmática do fármaco. Este  
549 fato possivelmente está relacionado as diferentes vias de administração utilizadas, no qual tínhamos  
550 como objetivo uma ação imediata, justificando a via de aplicação intravenosa.

551 Os fármacos anticoagulantes utilizados mostraram-se eficazes em manter uma adequada  
552 concentração de heparina sódica (HNF) e enoxaparina sódica (HBPM) circulante, capaz de  
553 possibilitar uma maior fluidificação do sangue durante o processo ovulatório, e provavelmente

554 proporcionando a diminuição na formação do coágulo na fossa da ovulação, resultando numa maior  
555 recuperação de embriões.

556 Em conclusão, os protocolos propostos no presente estudo utilizando anticoagulantes, é uma  
557 alternativa para melhoria das taxas de recuperação embrionária em éguas superovuladas com EPE,  
558 proporcionando uma recuperação de no mínimo 2 (dois) embriões por ciclo na grande maioria das  
559 éguas, o que é altamente desejável em um programa de transferência de embriões em equinos. Além  
560 disso os dois tipos de heparina na dose utilizada para uma única aplicação, demonstraram-se seguras  
561 sem apresentar alterações hematológicas ou efeitos adversos que possam comprometer ou colocar em  
562 risco a condição clínica do animal.

563

#### 564 **Agradecimentos**

565 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
566 Superior – Brasil (CAPES), Eurofarma Laboratórios S.A., Botupharma Biotecnologia Animal.

567

#### 568 **Referência**

569 [1] Alvarenga MA, Carmo MT, Landim-Alvarenga FC. Superovulations in mares: limitations and  
570 perspectives. *Pferdeheilkunde* 2008;24:88-91.

571 [2] Orlandi C, Bergfelt DR, Wechsler FS, Nogueira GP, Puoli Filho JNP, Meira C. Resposta ovariana  
572 durante a superovulação precedida pela emergência da onda folicular induzida por aspiração dos  
573 folículos em éguas cíclicas. *Anais da XX reunião anual da SBTE* supl 2006;34:278.

574 [3] Andrade LS. O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. In: *Fisiologia e manejo da*  
575 *reprodução eqüina*. 2o ed, Recife 1986:57-63.

576 [4] Squires EL, Carnevale EM, Mccue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse.  
577 *Theriogenology* 2003;59:151-170.

- 578 [5] Squires EL, Seidel Jr. GE. Superovulation in collection and transfer of equine embryos. *Anim,*  
579 *Reprod. Biotechnol. Lab. Bull* 1995 n.8:32-8.
- 580 [6] McCue PM. Superovulation. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, Los Altos, Philadelphia  
581 1996;12:1-11.
- 582 [7] Alvarenga MA, McCue PM, Bruemmer J, Neves Neto JR, Squires EL. Ovarian superstimulatory  
583 response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily.  
584 *Theriogenology* 2001;56:879-887.
- 585 [8] Carmo MT. Estudo do fluido folicular, transporte, recuperação e maturação de oócitos em éguas  
586 superovuladas com o extrato de pituitária equina. Tese (doutorado na área de reprodução animal) –  
587 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
588 Filho, Botucatu/SP 2007.
- 589 [9] Squires EL, McCue PM. Superovulation in mares. *Animal Reproduction Science* 2006;99:1-8.
- 590 [10] Kalodiki E, Nicolaidis AN. Superficial thrombophlebitis and low-molecular-weight heparins.  
591 *Angiology* 2002;53:659-63.
- 592 [11] Comp PC. Treatment and management of acute venous thromboembolic disease. *Thrombosis*  
593 *Research* 2003;111:3-8.
- 594 [12] Becattini C, Agnelli G, Emmerich J. et al. Initial treatment of venous thromboembolism.  
595 *Thrombosis and Haemostasis* 2006;96:242-50.
- 596 [13] Lage SG, Carvalho RT, Kopel L, Bastos JF, Ribeiro MA, Fagundes Jr AAP, Araujo HBN, Strunz  
597 CC. Estudo de Segurança e Eficácia da Enoxaparina Sódica na Profilaxia e Terapêutica  
598 Antitrombótica. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 2007;19:1:67-73.
- 599 [14] Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, Granger C, Ohman  
600 EM, Dalne JE. Heparin and low molecular weight heparin. *Chest* 2001;119:64-94.
- 601 [15] McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine Reproduction*. 2º ed. Wiley-  
602 Blackwell: Iowa 2011: 1026-1277.

- 603 [16] Guillou F, Combarous Y. Purification of Equine Gonadotropins and Comparative Study of their  
604 Acid-Dissociation and Receptor-Binding Specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1983;755:229-  
605 236.
- 606 [17] Papa FO, Alvarenga MA. *Revista Hippius*, São Paulo 1984;62:62-64.
- 607 [18] Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC, Meira C. Some modifications in the technique used to  
608 recovery equine embryos. *Equine Vet. J. London* 1993;15:111-12.
- 609 [19] Carmo MT. Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária equina na  
610 indução de superovulação em éguas. Dissertação (mestrado na área de reprodução animal) –  
611 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
612 Filho, Botucatu/SP 2003.
- 613 [20] Machado MS. Avaliação da dinâmica folicular de éguas superovuladas com extrato de pituitária  
614 equina e FSH equino purificado. 121p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária  
615 e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu 2004.
- 616 [21] Scoggin CF, Meira C, McCue PM, Carnevale EM, Nett TM, Squires EL. Strategies to improve  
617 the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. *Theriogenology* 2002;58:151-64.
- 618 [22] Douglas RH, Nuti L, Ginther, OJ. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-  
619 anovulatory mares with equine pituitary fractions. *Theriogenology* 1974;2:133-142.
- 620 [23] Woods GL, Ginther OJ. Ovarian response, pregnancy rate, and incidence of multiple fetuses in  
621 mares treated with an equine pituitary extract. *J. Reprod. Fertil., London* 1982;32:167-172.
- 622 [24] Palmer E, Hajmeli G, Duchamps G. Gonadotrophin treatment increase ovulation rate but not  
623 embryo production from mares. *Equine Vet. J. suppl. London* 1993;15:99-102.
- 624 [25] Douglas RH. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine.  
625 *Theriogenology*, Los Altos 1979;11:33-46.
- 626 [26] Woods GL, Ginther OJ. Collection and transfer of multiple embryos in the mare. *Theriogenology*  
627 1984;21:461-469.

- 628 [27] Dipert KD, Jasko DJ, Seidel Jr. GE, Squires, EL. Fertilization rates in superovulated and  
629 spontaneously ovulating mares. *Theriogenology* 1994;41:1411-23.
- 630 [28] Rosas CA, Alberio RH, Baranão JL, Agüero A, Chaves MG. Evaluation of two treatments in  
631 superovulation of mares. *Theriogenology*, Los Altos 1998;49:1257-1264.
- 632 [29] Logan NL, McCue PM, Alonso MA, Squires EL. Evaluation of Three Equine FSH  
633 Superovulation Protocols in Mares. *Animal Reproduction Science* 2007;102:48-55.
- 634 [30] Carmo MT, Losino L, Aquilar JJ, Araújo GHM, Alvarenga MA. Oocyte transport to the oviduct  
635 of superovulated mares. *Animal Reproduction Science* 2006;94:337-9.
- 636 [31] Welch SA, Denniston DJ, Hudson JJ, Bruemmer JE.; McCue PM, Squires EL. Exogenous eFSH,  
637 Follicle Coasting, and hCG as a novel superovulation regimen in mares. *Journal of Equine Veterinary*  
638 *Science* 2006;26:262-270.
- 639 [32] Salomon Y, Amsterdam A. Heparin: A Potent Inhibitor Of Ovarian Luteinizing Hormone  
640 Sensitive Adenylate Cyclase. *Febs Letters* 1977;83:2:263-266.
- 641 [33] Moore BR, Hinchcliff KW. Heparin: a review of its pharmacology and therapeutic use in horses.  
642 *J Vet Intern Med* 1994;8 n.1:26-35.
- 643 [34] Monreal L, Villatoro AJ, Monreal M. Comparison of the effects of low molecular weight and  
644 unfractionated heparin in horses. *American Journal of Vet. Res* 1995;56:1281-85.
- 645 [35] Mahaffey EA, Moore JN. Erythrocyte agglutination associated with heparin treatment in three  
646 horses. *J Am Vet Med Assoc* 1986;189 n11: 1478-80.
- 647 [36] Moore JN, Mahaffey EA, Zboran M. Heparin-induced agglutination of erythrocytes in horses.  
648 *Am J Vet Res* 1987;48 n.1: 68-71.
- 649 [37] Duncan SG, Meyers KM, Reed SM. Reduction of the red blood cell mass of horses: Toxic effect  
650 of heparin anticoagulant therapy. *Am. J. vet. Res* 1983;44:2271-2276.



- 651 [38] Borghesan AC. Avaliação da tromboflebite jugular experimental em equinos tratados com  
652 heparina. 2010. 66f, Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
653 Universidade Estadual Paulista, Botucatu 2010.
- 654 [39] Alonso JM. Avaliação da reatividade peritoneal de equinos submetidos à enterotomia de cólon  
655 menor e tratados com heparina pela via subcutânea. Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
656 Mesquita Filho”. Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária. p. 189. Dissertação de  
657 Doutorado. 2013.
- 658 [40] Warkentin, TE, Levine MN, Hirsh J. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with  
659 low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med* 1995; 332(20): 1330–1335.
- 660 [41] Feldman BF, Zinkl JG, Jain CN. *Schalm’s veterinary hematology*. 5th ed. Philadelphia:  
661 Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- 662 [42] Tollefsen DM, Zhang L. Heparin and vascular proteoglycans. In: Colman RW, Marder VJ,  
663 Clowes AW. *Hemostasis and Thrombosis Basics principles and clinical practice*, 5. ed., Philadelphia:  
664 Leppincott Willians & Wilkins 2006:217-83.
- 665 [43] Bounameaux H, Marbet G, Lammle B. Monitoring of heparin treatment: comparison of thrombin  
666 time, activated partial thromboplastin time, and plasma heparin concentration and analysis of the  
667 behavior of antithrombin II. *American Journal of Clinical Pathology* 1980;74:68-73.
- 668 [44] Konkle BA. Clinical approach to the bleeding patient. In: Colman RW, Marder VJ, Clowes AW.  
669 *Hemostasis and Thrombosis – Basics Principles and Clinical Practice*, 5 ed., Philadelphia: Leppincott  
670 Willians & Wilkins 2006:1147-58.
- 671 [45] Boneu B. Low molecular weight heparin therapy: Is monitoring needed *Thrombosis Haemostasis*  
672 1994;72:330-334.
- 673 [46] Levine MN, Hirsh J, Gent M, Turpie AG, Cruickshank M, Weitz J, Anderson D, Johnson M.  
674 A randomized trial comparing activated thromboplastin time with heparin assay in patients with acute

- 675 venous thromboembolism requiring large daily doses of heparin. Archives Internal Medicine  
676 1994;154:49-56.
- 677 [47] Bussey HI. Problems with monitoring heparin anticoagulation. Pharmacother 1999; 19: 2-5.
- 678 [48] Schwarzwal CC, Feige K, Wunderli-Allenspach H, Braun U. Comparison of pharmacokinetic  
679 variables for two low-molecular- w e i g h t - heparins after subcutaneous administration of a single  
680 dose to horses. American Journal Veterinary Research 2002;63:868-873.
- 681 [49] Rosenberg RD. Biochemistry and Pharmacology of low Molecular Weight Heparin. Seminars  
682 Hematology 1997;34:2-8.
- 683 [50] Weitz JI. Low-Molecular-Weight Heparins. New England Journal Medicine 1197;337:688-698.
- 684 [51] Hirsh J, Warkentin TE, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE. Heparin and low-  
685 molecular-weight heparin: Mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations,  
686 monitoring, efficacy, and safety. Chest 1998;114:489-510.
- 687 [52] Geerts WH, Heit JA, Clagett GP. Prevention of Venous Thromboembolism. Chest 2001;  
688 119:132-175.
- 689 [53] Harenberg J, Huhle G, Piazzolo L, Malsch R. Niedermolekulare Heparine. Hautarzt 1997; 48:52-  
690 864.