

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/10/2021.



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
PGF2α: Prostaglandina F2α
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

CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	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
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
HIPÓTESE.....	35
OBJETIVOS.....	35
CAPÍTULO 2.....	36
ARTIGO 1: AUMENTO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA COM O	
USO DE ANTICOAGULANTES EM ÉGUAS SUPEROVULADAS	

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 – $4,6\pm0,4$; G3 – $5,2\pm0,5$; G4 – $4,9\pm0,6$) em relação ao G1 (1 ± 0). Já o número de embriões recuperados por égua não diferiu ($p>0,05$) entre o G1 ($0,6\pm0,2$) e G2 ($1,6\pm0,5$), no entanto, foi maior para os grupos que receberam anticoagulantes G3 ($2,5\pm0,3$) e G4 ($2,6\pm0,6$) 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 ± 0.4 ; G3 - 5.2 ± 0.5 ; G4 - 4.9 ± 0.6) in relation to G1 (1 ± 0). The number of embryos recovered by mare did not differ ($p > 0.05$) between G1 (0.6 ± 0.2) and G2 (1.6 ± 0.5), however, it was higher for the groups that received anticoagulants G3 (2.5 ± 0.3) and G4 (2.6 ± 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; DIPPERT 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.

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^a.

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 eqüina 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^a. 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^a 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 eqüina 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**. 1º ed. p. 319–334, 2007.

McKINNON, A.O; SQUIRES, E.L; VAALA, W.E; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2º ed. Wiley-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 reuniao 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 productionof 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- w e i g h t - 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 Williams & 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^a ed. Philadelphia: Leppincott Williams & 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.