RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissetação será disponibilizado somente a partir de 10/10/2025.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE EMBRIÕES EQUINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* DURANTE SIMULAÇÃO DE TRANSPORTE

GIULIA VIGNOLI RIBEIRO LOPES

Botucatu, SP
Outubro – 2024

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE EMBRIÕES EQUINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* DURANTE SIMULAÇÃO DE TRANSPORTE

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de MESTRE

Giulia Vignoli Ribeiro Lopes
Orientadora: Profª. Ass. Drª. Fernanda Saules Ignácio

Botucatu, SP
Outubro – 2024

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

Lopes, Giulia Vignoli Ribeiro.
Efeito do estresse térmico sobre embriões equinos produzidos *in vivo* durante simulação de transporte / Giulia Vignoli Ribeiro Lopes. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: Fernanda Saules Ignácio
Capes: 50504002

1. Embriões - Criopreservação. 2. Resposta ao choque térmico. 3. Embriologia veterinária. 4. Reprodução animal.

Palavras-chave: Acondicionamento; Estresse térmico; Qualidade embrionária.

Nome do autor (a): Giulia Vignoli Ribeiro Lopes

Título: EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE EMBRIÕES EQUINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* DURANTE SIMULAÇÃO DE TRANSPORTE

BANCA EXAMINADORA

Profª. Ass. Drª. Fernanda Saules Ignácio
Presidente e Orientadora
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Profª. Drª. Fabiana Ferreira de Souza
Membro
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Profª. Drª. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva
Membro
Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia – UFU – Uberlândia/MG

Data da defesa: 10 de outubro de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora por me darem sabedoria e discernimento para iniciar e finalizar esta caminhada.

Também agradeço a minha família. A minha mãe Andrea por ser o alicerce da nossa família, zelando e cuidando enquanto buscamos nossos sonhos. Ao meu pai Arley por acreditar em mim e apoiar meus caminhos, por ajudar a sempre tornar realidade meus sonhos. Ao meu noivo e futuro marido Lucas por não me deixar desistir, por me dar todo amor e cuidado, ser meu companheiro e fiel escudeiro nesta caminhada da vida. E ao meu irmão Andrey por me dar apoio e ser meu melhor amigo.

Agradeço a minha orientadora Profª Ass. Drª Fernanda Saules Ignácio por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, por me apoiar, cuidar e confiar em mim, se tornando uma grande amiga.

Agradeço também aos meus colegas da pós-graduação, entre outros, por me ajudarem a desenvolver este projeto.

Também agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, na realização do projeto.

“Faça o teu melhor na condição que você tem, enquanto você não tiver condições para fazer melhor ainda!”

Mario Sérgio Cortella

RESUMO

LOPES, G.V.R. **EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE EMBRIÕES EQUINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* DURANTE SIMULACÃO DE TRANSPORTE**. Botucatu – SP. 2024. 51p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O aumento da temperatura global e seus extremos climáticos impactam na reprodução, bem como nos métodos de transporte de embriões. Este estudo objetivou avaliar efeito do estresse térmico (ET) sobre o embrião equino durante diferentes simulações de transporte. Os embriões foram coletados através de lavados uterinos 8 ou 9 dias após a ovulação, analisados (M0) quanto a sua morfologia e divididos em grupo controle (n= 7, avaliação imediatamente após colheita); 15ºC (n= 6, mantidos à 15ºC por 24h); 32ºC (n= 6, mantidos à 32ºC por 24h); 15ºC-ET (n= 6, mantidos à 15ºC por 24h e submetido a estufa á 50ºC por 2h); 32ºC-ET (n= 6, mantidos à 32ºC por 24h e submetido a estufa á 50ºC por 2h) e ET (n= 7, submetido ao estresse térmico por 2h em estufa à 50ºC em criotubo). O acondicionamento dos embriões foi realizado em caixas isotérmicas (Botuflex®, Botupharma, Botucatu, SP) seguindo as descrições do fabricante nos grupos 15ºC e 15ºC-ET e, nos grupos 32ºC e 32ºC-ET, foram colocados dois gelos descartáveis mantidos em banho maria a 32ºC por 48h. Os grupos submetidos ao ET ficaram 2h em estufa à 50ºC. Os embriões passaram por avaliação (M1) morfológica e estresse oxidativo (TBARS-ng/mL). Na análise estatística foi usado ANOVA e Kruskal-Wallis comparando os grupos, seguido por Tukey comparando as médias, para avaliação morfológica foi utilizado teste Wilcoxon e o modelo linear para estresse oxidativo à um nível de significância de 5%. O ET em estufa promoveu aumento da temperatura da caixa em 4h e 6h, e redução até 24h (grupos 15ºC-ET e 32ºC-ET). O grupo ET mostrou aumento (P<0,001) a partir dos 30 minutos e manteve acima de 41,2ºC durante as 2h. A taxa de crescimento o grupo 32ºC-ET foi maior que os grupos 15ºC, 15ºC-ET e ET; o grupo ET menor que o 15ºC, 32ºC e 32ºC-ET. Apenas o grupo ET diferiu (P=0,0006) o grau de qualidade do M0 (G1+) para o M1(G2-), e obteve resposta oxidativa (1627 ng/mL; P<0,0001) maior que todos os grupos. Os grupos controle (227 ng/mL), 32ºC (193,7 ng/mL) e 15ºC-ET (160,3 ng/mL) foram semelhantes quanto a resposta oxidativa, enquanto o grupo 15ºC (93,7 ng/mL) foi menor que os demais grupos. Considerando o grupo controle representativo da resposta oxidativa esperada para os embriões produzidos *in vivo* (D8/D9), o acondicionamento a 32ºC se mostrou mais seguro quando não submetido a condições de temperaturas elevadas, justificado pela curva de temperatura homogênea e a taxa de crescimento embrionário. Porém, a refrigeração a 15ºC pode ser mais adequada quando o sistema de acondicionamento for exposto às altas temperaturas.

Palavras-chave: estresse térmico, qualidade embrionária, resposta oxidativa, acondicionamento.

ABSTRACT

LOPES, G.V.R. **EFFECTS OF HEAT STRESS ON *IN VIVO* PRODUCED EQUINE EMBRYOS DURING SHORT STORAGE SIMULATION.** Botucatu– SP. 2024. 51p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The increase in global temperature and its climactic extremes impact reproduction, as well as embryo transport methods. The aim of this study was to evaluate the effect of heat stress (HS) on equine embryos during different short storage simulations. The embryos were collected through uterine lavage 8 or 9 days after ovulation, analyzed (M0) for their morphology and divided by change into: control (n= 7, evaluation immediately after collection); 15ºC (n= 6, storage at 15ºC for 24h); 32ºC (n= 6, storage 32ºC for 24h); HS-15ºC (storage ate 15ºC for 24h and subjected to HS for 2h); HS-32ºC (n=6, storage 32ºC for 24h and subjected to HS for 2h) and HS (n= 7, subjected to HS for 2h). The embryos were storage in isothermal boxes (Botuflex®, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's descriptions in the 15ºC and HS-15ºC groups, and in the 32ºC and HS-32ºC groups, two disposable ices were placed and kept in a water bath ate 32ºC for 48h. The groups submitted to HS were spent 2h in an incubator at 50ºC. The embryos underwent morphological (M1) and oxidative stress (TBARs; ng/mL). In the statical analysis, ANOVA and Kruskal-Wallis were used to compare the groups, followed by Tukey comparing the means, for morphological evaluation of the embryos, the Wilcoxon test and linear model for oxidative stress were used (P<0,005). The HS in the incubator increased the temperature of the box at 4 and 6h and reduced it up to 24h (HS-15ºC and HS-32ºC). The HS group showed an increase (P<0.001) from 30 minutes on wards and remained above 41,2ºC during 2h. The growth rate differed between the groups at M1, in which the HS-32ºC group was higher than 15ºC, HS-15ºC and HS groups; the HS group was lower than 15ºC, 32ºC and HS-32ºC. Only the HS group differed (P=0.0006) the quality grade from M0 (G1+) to M1 (G2-) and obtained an oxidative response (1627 ng/mL; P<0.001) was higher than all groups. The control (277 ng/mL), 32ºC (193.7 ng/mL) and HS-15ºC (160.3 ng/mL) groups were similar in terms of oxidative response, while the 15ºC (93.7 ng/mL) group was lower than the other groups. Considering the control group representative of the oxidative response expected for day 8 or 9 embryos produced in vivo, the storage at 32ºC proved to be safer when not subjected to high temperature conditions, justified by the homogeneous temperature curve and the embryonic growth rate. However, refrigeration at 15ºC seems to be more appropriate when the storage system is exposed to high temperatures.

Keywords: Heat stress, embryo quality, oxidative response, storage.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 2
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1. Transporte embrionário 3
2.2. Avaliação morfológica embrionária 5
2.3. Estresse térmico 6
2.4. Estresse oxidativo 7
2.5. Proteínas do estresse térmico 8
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS 10
3.1. Hipótese(s) 10
3.2. Objetivo geral 10
3.3. Objetivos específicos 10
4. REFERÊNCIAS 11
CAPÍTULO 2 32
Este artigo, será submetido ao periódico da Revista Theriogenology 33
ARTIGO CIENTÍFICO 33
Resumo 34
1. Introdução 35
2. Material e métodos 36
2.1. Reagentes 36
2.2. Aspectos éticos 36
2.2. Animais e grupos experimentais 36
2.3. Preparação das doadoras 37
2.4. Manipulação e acondicionamento embrionário 38
2.5. Avaliação morfológica 39
2.6. Preparação dos embriões 40
2.7. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) 40
2.8. Análise estatística 41
3. RESULTADOS 42
3.1 Curva de temperatura 42
3.2 Tamanho e grau de qualidade dos embriões 43
..... 46

3.3 TBARS 47
4. DISCUSSÃO 47
5. CONCLUSÃO 51
AGRADECIMENTOS 51
CONFLITO DE INTERESSES 52
REFERÊNCIAS 53

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Brasil ocupa um lugar de destaque na produção de embrião equino no mundo. A busca constante por novas biotecnologias tornou o país um dos líderes mundiais na transferência de embriões (TE) produzidos *in vivo* (VIANA,2021), o que mostra a relevância desta tecnologia utilizada a campo, otimizando a economia equestre atual (SQUIRES, 2020).

O transporte de embriões por períodos curtos é um importante exemplo desta biotecnologia (MOUSSA *et al.*, 2006; MOYA-ARAUJO *et al.*, 2010), que possibilita o uso de doadoras e receptoras que não se encontram na mesma propriedade e permitiu o transporte embrionário por até 24h (CUERVO-ARANGO *et al.*, 2015). Apesar da aplicação e importância dentro dos programas de TE, poucos são os estudos que avaliam as condições disponíveis à campo, considerando os meios utilizados atualmente e o aumento da temperatura média global, para que os embriões sejam transportados em segurança e com mínimas lesões celulares (IPCC - *Intergovernmental Panel on Climate Change*; CLARK *et al.*, 1987; COOK *et al.*, 1989; CARNEY *et al.*, 1991; CARNEVALE *et al.*, 2000; MOUSSA *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2006).

No Brasil predomina-se o clima tropical caracterizado por altas temperaturas na estação reprodutiva, com médias diárias superiores à 20ºC e condições extremas ao longo do dia, atingindo temperaturas acima de 30ºC (Instituto Nacional de Meteorologia, MAPA). Nos últimos 50 anos foi observado um aumento médio de pelo menos 1ºC em todas as regiões do país, e o Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas prevê uma tendência de aquecimento entre 1 e 1,5ºC até 2040 (MENEGASSI *et al.*, 2023).

Os efeitos prejudiciais das variações climáticas no desempenho reprodutivo já foram estudados em outras espécies (GARCIA-ISPIERTO *et al.*, 2006; SANTOLARIA *et al.*, 2010), e a influência de altas temperaturas reflete na qualidade do embrião recuperado (MORTENSEN *et al.*,2009; CAMPBELL, 2014) e nas condições de transporte e qualidade seminal (AVANZI *et al.*, 2006). Entretanto, o efeito do estresse térmico sobre embriões equinos produzidos *in vivo* durante simulação de transporte de não foi estudado até o momento. Estudo recente associou a alta temperatura e umidade com aumento da perda embrionária precoce em éguas receptoras de embrião, justificada pela sensibilidade embrionária no momento e na semana após TE (YU *et al.*, 2022). Logo, é possível que os extremos na temperatura durante o transporte curto afetem a viabilidade embrionária.

Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do estresse térmico

REFERÊNCIAS

[1] Squires EL. Current reproductive Technologies impacting equine embryo production. J Equine Vet Sci 2020;89:102981. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102981
[2] Moussa M, Duchamp G, Dael PF, Bruyas J. Effect of embryo age on viability of equine embryos after cooled storage using two transport systems. J Equine Vet Sci 2006; 26(11):529-534. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2006.09.009.
[3] Moya-Araujo C, Araujo GH, Meira C. Avanços na criopreservação de embriões equinos. Rev Bras Reprod Anim 2010;58-66. http://www.cbra.org.br/portal/publicacoes/rbra/2010/rbrajm2010.html
[4] Menegassi SRO, Lopes LFD, Morais H, Alencar, AP, Lopes FG, Barca Junior FA. Cilmate change in Brazil: evolutionary, comparative and forecast study. Theoretical App Clim 2023;155:2323-2328. https://doi.org/10.1007/s00704-023-04778-6
[5] Masson-Delmotte V, Zhai P, Roberts DC, Skea J, Shukla PR, Pirani A, Moufouma-Okia W, Pean C, Pidcock R, Connors S, Mathews T. Global warming of 1.5ºC. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5ºC above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to threat of climate change. World Meteo Org Tech Doc 2018. https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/sites/2/2019/06/SR15_Full_Report_Low_Res.pdf
[6] Clark KE, Squires EL, Mckinnon AO, Seidel GEJR. Viability of stored equine embryos. J Anim Sci 1987;65:534-42. https://doi.prg/10.2527/jas1987.652534x
[7] Cook VM, Squires EL, Mckinnon AO, Balley J, Long PL. Pregnancy rates of cooled, transported equine embryos. Equine Vet J 1989;21:80-1. https://doi.org/10/1111/j.2042-3306.1989.tb04684.x
[8] Carney NJ, Squires EL, Cook VM, Seidel GFJR, Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. Theriogenology 1991;36:23-32. https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90430-L
[9] Carnevale EM, Squires EL, McKinnon AO. Comparison of Ham's F10 with CO2 or Hepes buffer for storage of equine embryos at 5C for 24h. Theriogenology 1987;65(6):1775-81. https://doi.org/jas1987.6561775x
[10] Gastal GDA, SiquiScarlet D, Melchert M, Ertl R, Aurich C. Epigenetic changes in equine embryos after short-term storage at different temperatures. Animals 2021;11(5):1325-45. https://doi.org/10.3390/ani11051325
[11] Camargo GS, Barros LD, Oliveira-Filho JP, Bromberger CR, Dias-Melicio LA, Santos LA, Bergfelt DR, Andrade ERF, Canesin H, Meira C, Ignácio FS. Evaluation of blastocyst re-expansion, quality, in relation to storage temperature, and sexing using blastocoel fluid after manual perforation with a hand-held needle involving in vivo produced equine embryos. Theriogenology 2024;219:39-48. https://10.1016/j.theriogenology.2024.02.012
[12] Alonso C, Bragulat AF, Llorente J, Morikawa I, Meyeren MV, Lossino L. Pregnancy rates for cooled transported equine embryos according to size and arrival temperature. J Equine Vet Sci 2020;89:103078. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103078
[13] OMM (2024) Organização Meteorológica Mundial 2024:OMM. https://g1.globo.com/meio-ambiente/noticia/2024/06/05/mundo-tem-o-12o-mes-consecutivo-de-recorde-de-calor-e-temperatura-global-anual-deve-exceder-limite-de-15c.ghtml
[14] Garicia-Ispierto I, L'pez-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C, Lópes-Béjar M, De Rensis F. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and

early fetal loss in dairy cattle. Theriogenology 2006;65(4):799-807. https://doi.org/j.theriogenology.2005.06.011
[15] Santolaria P, López-Gatius JÁ, García-Ispierto I, Bech-Sàbat G, Ângulo e, Carretero T, Sanchez-Nadal JÁ, Yániz J. Effects of cumulative stressful and acute variation episodes of farm climate conditions on late embryo/early fetal loss in high producing dairy cows. Int J Biometeorol 2010;54(1):93-8. https://doi.org/10/1007/s00484-0258-8
[16] Sakatani M. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. J Reprod Dev 2017;63(4):347-352. https://doi.org/10.1262/jrd.2017-045
[17] Mortensen CJ, Choi YH, Ing NH, Kraemer DC, Vogelsang SG, Vogelsang MM. Embryo recovery from exercised mares. Anim Reprod Sci 2009;110(3-4):237-44. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.015
[18] Mortensen CJ, Choi YH, Ing NH, Kraemer DC, Vogelsang MM, Hinrichs K. Heat shock protein 70 genes expression in equine blastocysts after exposure of oocytes to high temperatures in vitro or in vivo after exercise donor mares. Theriogenology 2010; 74(3):374-83. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.020
[19] Campbell MLH. Embryo transfer in competition horse: Managing mares and expectations. Equine Vet Educ 2014;26(6):322327. https://doi.org/10.1111/eve.12182
[20] Yu K, Pfeiffer C, Burden C, Krekeler N, Marth C. High ambient temperature and humidity associated with early embryonic loss after embryo transfer in mares. Theriogenology 2022;188:37-42. https://doi.org/10/1016/j.theriogenology.2022.05.014
[21] Hansen PJ. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Philos Trans R Soc Lond B Biol 2009;364(1534):3342-50. https://doi.org/1098/rstb.2009.0131
[22] Ozawa M, Hirabayashi M, Kanai Y. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. Reproduction 2011;124(5):683-9. https://doi.org/10.1530/rep.0.1240683
[23] Matsuzuka T, Ozawa M, Nakamura A, Ushitani A, Hirabayashi M, Kanai Y. Effects of heat stress on the redo status in the oviduct and early embryonic development in mice. J Reprod Dev 2005;51(2):281-7. https://doi.org/10.1262/jrd.16089
[24] Sakatani M, Yamanaka K, Kobayashi S, Takahashi M. Heat shock-derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in in vitro early stage bovine embryos. J Reprod Dev 2008;54(6):496-501. https:/doi.org/10.1262/jrd.10017
[25] Sakatani M, Kobayashi S, Takahasi M. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. Mol Reprod Dev 2004;67(1):77-82. https://doi.org/10.1002/mrd.20014
[26] Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. Mol Reprod Dev 1997;46(2):138-45. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<138::AID-MRD4>3.0.CO;2-R
[27] Putney, DJ, Malayer JR, Gros TS, Thatcher WW, Hansen PJ, Drost M. Heat stress-induced alterations in the synthesis secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. Biol Reprod 1988;39(3):717-28. https://doi.or/10.1095/biolreprod39.3.717
[28] Thompson DM, Lu C, Green PJ, Parker R. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. RNA 2008;14(10):2095-103. https://doi.org/10.1261/rna.1232808
[29] Bernardi C, Fantinati P, Castellani G, Forni M, Zannoni A, Seren E, Bacci ML. Alteration of constitutive heat Shock protein 70 (HSC70) production by in vitro culture of porcine preimplanted embryos. Vet Res Commun 2003;27(1):575-8. https://doi.org/10.1023/b:verc.0000014220.96267.94
[30] Teles Filho ACA, Sanchez DJD, Viana AG, Sheheryar S, Guerreiro DD, Ricart CA, Fontes W, Moura AA. A prospective study of the proteome of equine pre-implantation

embryo. Reprod in Dom Anim 2024;57(7):14663 https://doi.org/10.1111/rda.14663
[31] Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennik JR. Rapid degradation of large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. Nature 2000;404:770-774. https://doi.or/10.1038/35008096
[32] Avanzi BR, Ferrás MC, Melo CM, Alvarenga MA, Dell'Aqua JÁ, Medeiros AS, Araujo GH, Papa FO. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. Anim Reprod Sci 2006;94(1-4):152-154. https://doi.org/10.1016/j.anireprocsi.2006.03.042
[33] McCue PM, DeLuca CA, Wall JJ. Cooled-transported embryo technology. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. Equine Reproduction. Second ed Ames, IA: Wiley Blackwell; 2011. P. 2880-6.
[34] Mckinnon AO, Squires EL Morphologic assessment of the equine embryo. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1988; 192(17):401-406. https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30643-0
[35] Bollag DM, Rozycki MD, Edelstei SJ. Protein Methods, 1996. John Wiley & Sons, New York.
[36] Peach M, Marsh N, Macphee DJ. Protein solubilization: attend to the choice of lysis buffer, Methods Mol Biol 2012:869: 37-47. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4
McKinnon AO, Squires EL. Morphologic assessment of the equine embryo. J Am Vet Med Asoc 1988;192:401-6. https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30643-0
[37] Souza FF, Chirinéa VH, Martins MIM, Lopes MD. Osteopontin in Seminal Plasma and Sperm Membrane of Dogs. Reprod Dom Anim 2009;44(2):283-286. https://doi.org/10.1111.j.1439-0531.2009.01447.x
[38] Cunningham JG. Termorregulação. In: Tratado de fisiologia veterinária. São Paulo: Guanabara Koogan 1999;507-514.
[39] Kayser JP, Amann RP, Shideler EL, Jasko DJ, Pickett BW. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. Theriogenology 1992;38(4):601-14. https://doi.org/10.1016/0093.-691x(92)90023-k
[40] Moran DM. Effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa. M. S. Thesis, Colorado State University, Fort Collins 1992.
[41] Pickett BW. Seminal extenders and cooled semen. In: Mc Kinoon AO, Voss JL (Eds.), Equine Reprod. Lea & Febiger, Philadelphia 1992;715-45.
[42] Squires EL, Brubaker JK, McCue PM, Pickett BW. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. Theriogenology 1998;49(4):743-9. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00023-5
[43] Mezzalira A, Santos RM, Barreta M, Cucco D, Mezzalira J, Wentz KC, Cruz FB. Transferência de embriões bovinos produzidos in vitro: efeito da vitrificação e do transporte. Acta Sci. Vet. 2004;32:164 (supl)
[44] Canesin HS, Ortiz I, Rocha Filho NA, Salgado RM, Brom-de-Luna JG, Hinrichs K. Effects of warming method on embryo quality in a simplified equine embryo vitrification system. Theriogenology 2020;151:151-8. https://doi.org/j.theriogenology.2020.03.012
[45] Choi YH, Hinrichis K. Vitrification of in ivtro-produced and in vivo-recovered equine blastocysts in a clinical program. Theriogenology 2016;87(1):48-54. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.005
[46] Matsuzuka T, Ozawa M, Nakamura A, Ushitani A, Hirabayashi M, Kanai Y. Effects of heat stress on the redos status inthe oviduct and early embryonic development in mice. J Reprod Devel 2005;51(2):281-7. https://doi.org/10.1262/jrd.16089
[47] Ozawa M, Hirabayashi M, Kanai Y. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. Reproduction 2002;124:683-9. https://doi.org/10.1530/rep.01240683

[48] Covarrubias L, Hernández-Garía D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregón S. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? Dev Biol 2008;320(1):1-11. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.041
[49] Carneiro JAM, Canisso IF, Bandeira RS, Scheeren VFC, Freitas-Dell'Aqua CP, Alvarenga MA, Dell'Aqua JA. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad sêmen freezing ability. Anim Reprod Sci 2018;192:107–18. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.020.
[50] Moussa M, Duchamp G, Mahla R, Bruyas JF, Dael PF. In vitro and in vivo comparison of Ham's F-10, Emcare holding solution and ViGro holding plus for the cooled storage of equine embryos. Theriogenology 2003;59:1615–25. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01210-4.
[51] Moussa M, Tremoleda JL, Duchamp G, Bruyas JF, Colenbrander B, Bevers MM, Dael PF. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5°C. Theriogenology 2004;6:921–32. https://doi.org/ 10.1016/S0093-691X(03)00280-2.
[52] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 2000;408(6809):239-47. https://doi.org/10.1038/35041687
[53] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. Wordl Allergy Organ J 2012;5(1):9-19. https://doi.orb/10.1097/WOX.0b013e3182439613