

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: Prof^a. Ass. Dr^a. 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

Prof^a. Ass. Dr^a. Fernanda Saules Ignácio

Presidente e Orientadora

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

Prof^a. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

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

Prof^a. Dr^a. 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 Prof^a Ass. Dr^a 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 SIMULAÇÃO 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); 15°C (n= 6, mantidos à 15°C por 24h); 32°C (n= 6, mantidos à 32°C por 24h); 15°C-ET (n= 6, mantidos à 15°C por 24h e submetido a estufa à 50°C por 2h); 32°C-ET (n= 6, mantidos à 32°C por 24h e submetido a estufa à 50°C por 2h) e ET (n= 7, submetido ao estresse térmico por 2h em estufa à 50°C em criotubo). O acondicionamento dos embriões foi realizado em caixas isotérmicas (Botuflex®, Botupharma, Botucatu, SP) seguindo as descrições do fabricante nos grupos 15°C e 15°C-ET e, nos grupos 32°C e 32°C-ET, foram colocados dois gelos descartáveis mantidos em banho maria a 32°C por 48h. Os grupos submetidos ao ET ficaram 2h em estufa à 50°C. 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 15°C-ET e 32°C-ET). O grupo ET mostrou aumento ($P<0,001$) a partir dos 30 minutos e manteve acima de 41,2°C durante as 2h. A taxa de crescimento o grupo 32°C-ET foi maior que os grupos 15°C, 15°C-ET e ET; o grupo ET menor que o 15°C, 32°C e 32°C-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), 32°C (193,7 ng/mL) e 15°C-ET (160,3 ng/mL) foram semelhantes quanto a resposta oxidativa, enquanto o grupo 15°C (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 32°C 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 15°C 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); 15°C (n= 6, storage at 15°C for 24h); 32°C (n= 6, storage 32°C for 24h); HS-15°C (storage at 15°C for 24h and subjected to HS for 2h); HS-32°C (n=6, storage 32°C 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 15°C and HS-15°C groups, and in the 32°C and HS-32°C groups, two disposable ices were placed and kept in a water bath at 32°C for 48h. The groups submitted to HS were spent 2h in an incubator at 50°C. The embryos underwent morphological (M1) and oxidative stress (TBARS; ng/mL). In the statistical 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-15°C and HS-32°C). The HS group showed an increase ($P<0.001$) from 30 minutes onwards and remained above 41,2°C during 2h. The growth rate differed between the groups at M1, in which the HS-32°C group was higher than 15°C, HS-15°C and HS groups; the HS group was lower than 15°C, 32°C and HS-32°C. 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), 32°C (193.7 ng/mL) and HS-15°C (160.3 ng/mL) groups were similar in terms of oxidative response, while the 15°C (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 32°C 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 15°C 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 20°C e condições extremas ao longo do dia, atingindo temperaturas acima de 30°C (Instituto Nacional de Meteorologia, MAPA). Nos últimos 50 anos foi observado um aumento médio de pelo menos 1°C em todas as regiões do país, e o Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas prevê uma tendência de aquecimento entre 1 e 1,5°C 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

sobre embriões produzidos *in vivo* durante simulação de transporte em condições correspondentes à realidade atual à campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Transporte embrionário

Há um forte apelo na indústria equestre para os constantes avanços nos estudos das biotecnologias envolvendo o embrião equino, principalmente no desenvolvimento de técnicas alternativas acessíveis a campo. No mercado envolvendo os programas de TE, que incluem tanto os embriões produzidos *in vivo* quanto *in vitro*, o transporte de embriões por períodos curtos, em torno de 24 horas se tornou necessário dentro da rotina a campo (MOUSSA *et al.*, 2006; MOYA-ARAUJO *et al.*, 2010).

O transporte curto viabiliza a realização da técnica quando as doadoras e receptoras não se encontram no mesmo local. Avaliando a importância dentro dos programas de TE, escassos são os estudos que consideram as condições (ambiente de acondicionamento e temperatura) disponíveis à campo, para que os embriões produzidos *in vivo* tenham um transporte seguro e com poucas injúrias celulares (CLARK *et al.*, 1987; COOK *et al.*, 1989; CARNEY *et al.*, 1991; CARNEVALE *et al.*, 2000; MOUSSA *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2006; ALONSO *et al.*, 2020; GASTAL *et al.*, 2021; CAMARGO *et al.*, 2024).

A escolha do meio em que o embrião ficará imerso é fundamental para o transporte. Estudos utilizaram o meio de manutenção Ham's F-10® para transporte embrionário (CLARK *et al.*, 1987; MOUSSA *et al.*, 2002; 2004), todavia, este necessita de manutenção correta do pH em presença de CO₂ (5%), O₂ (5%) e N₂ (90%) adequado para manter sua estabilidade tamponante por bicarbonato, dificultando sua utilização no campo (GOOD *et al.* 1966, 1966; MOUSSA *et al.*, 2003). Assim, os meios de manutenção embrionária contendo agentes tamponantes, não dependentes de CO₂, tal qual os hepes e os zwitteriônicos foram desenvolvidos (GOOD *et al.*, 1966; MOUSSA *et al.*, 2003). Os meios tamponantes de manutenção (holding) são compostos por uma molécula neutra, que não atravessa as membranas celulares, e com isso criam um microambiente estável na zona pelúcida (zp), evitando a inibição do tampão fosfato no desenvolvimento embrionário (GOOD *et al.*, 1966).

Os meios “holding” de embriões, como Vigro Holding Plus®(VHP) e Emcare® (EHS), mostraram eficiência para o transporte (MOUSSA *et al.*, 2002). Estudos relataram

taxas de gestação de 83% (30/36) e 75% (33/44) utilizando BotuEmbryo® e meio TQC Holding Plus®, respectivamente, por até 120 minutos mostrando sua eficiência em temperatura ambiente (GOMES *et al.*, 2014). Boas taxas gestacionais também foram observadas em embriões produzidos *in vivo* (n=126) acondicionados à 5°C em Syngro Holding Solution®, com 71.9% (>300 µm) e 41.7% (<300 µm) (ALONSO *et al.*, 2020). Avaliações moleculares (GASTAL *et al.*, 2021) e morfológicas (CAMARGO *et al.*, 2024) em embriões utilizando meios de manutenção comercialmente disponíveis sugeriram segurança no transporte, a depender da temperatura de acondicionamento.

As informações sobre a temperatura no transporte são poucas, mesmo sendo um fator que reflete na qualidade do embrião transferido e taxa gestacional (CLARK *et al.*, 1987; CARNEVALE *et al.*, 1987). Embriões cultivados em meio PBS (“phosphatase Buffered Saline”) adicionado à 20% de soro fetal bovino à 37°C por 3h e 24h, apresentaram melhor taxa de prenhez quando transferidos dentro de 3h após coleta (IMEL *et al.*, 1981; SQUIRES *et al.*, 1982). Entretanto, um estudo avaliou o transporte de embriões em meio Ham’s F10® em até 12h à 24°C, e a viabilidade embrionária se manteve neste período, uma vez que as taxas gestacionais foram similares aos embriões inovulados até 1h após a coleta (CLARK *et al.*, 1987). Considerando a avaliação morfológica, embriões acondicionados por 12 ou 24h à 5°C ou 24°C em meio Ham’s F-10® à 24°C apresentaram melhor qualidade quando comparados aos mantidos à 5°C em meio MEM (meio essencial mínimo com Sais de Hank -EARLE®) por 24h, e houve perda da qualidade embrionária de 12 a 24h de acondicionamento nos embriões que estavam em meio MEM (CLARK *et al.*, 1985).

Os resultados encontrados em embriões não refrigerados são justificados devido a queda do metabolismo embrionário, a latência dos estágios de desenvolvimento e a manutenção do tamanho embrionário durante o armazenamento (MCCUE *et al.*, 2011; RIERA *et al.*, 2019). Assim, os estudos buscaram a refrigeração para transporte de embriões produzidos *in vivo* por até 24h (CARNEVALE *et al.*, 1987; MOUSSA *et al.*, 2002; 2003; 2004; DIAZ *et al.*, 2018). Entretanto, a refrigeração causa lesões às células embrionárias (MOUSSA *et al.*, 2003; 2004). Embriões refrigerados obtiveram menores taxas gestacionais em comparação aos transferidos a fresco (COOK *et al.*, 1989), e observaram maior perda das gestações entre 12 e 35 dias de embriões refrigerados por 12h (CARNEY *et al.*, 1991).

Considerando o tamanho, embriões equinos pequenos (<175 µm) possuíram maior susceptibilidade a lesões e menores taxas gestacionais pela refrigeração, em

comparação aos maiores (CLARK *et al.*, 1987; MOUSSA *et al.*, 2003; 2004; ALONSO *et al.*, 2020). E a refrigeração à 5°C por 24h proporcionou um aumento no número de células mortas (DAPI), não desencadeado por apoptose (TUNEL) (MOUSSA *et al.*, 2004).

Estudos recentes demonstraram efeitos benéficos do transporte à 20°C à nível intracelular, e melhor taxa gestacional de embriões transportados entre 10 e 16°C quando comparados aos refrigerados à 5°C (GASTAL *et al.*, 2021; ALONSO *et al.*, 2020). Em outro relato, embriões excelentes ou bons transportados à 25°C mantiveram seu grau de qualidade e apresentaram um aumento médio de 25,9% de diâmetro em 24h, contrapondo à um decréscimo na qualidade embrionária de 20% a 5°C, seguido por diminuição média do diâmetro em -4,3% (CAMARGO *et al.*, 2024). O que indicou melhor crescimento, desenvolvimento e qualidade quando transportados à 25°C, em relação aos armazenados em baixas temperaturas. Além disso, pesquisas com embriões refrigerados resultaram em uma menor vesícula embrionária por meio da ultrassonografia (CARNEVALE *et al.*, 2000) e consequentemente no retardo no metabolismo e desenvolvimento dos embriões (MCCUE *et al.*, 2011).

O transporte dos embriões à campo é fundamentado em condições desenvolvidas para o transporte de sêmen refrigerado (KAYSER *et al.*, 1992; SQUIRES *et al.*, 1998; MOUSSA *et al.*, 2003; 2004; CHOI *et al.*, 2011; CHOI e HINRICHS, 2016; PAPA, 2020). Diferentes modelos de caixas isotérmicas estão disponíveis comercialmente garantindo curvas de temperatura previamente estabelecidas, porém com variações nas condições sob temperaturas externas extremas (AVANZI *et al.*, 2006).

Atualmente não existem estudos avaliando os sistemas de acondicionamento para transporte, levando em consideração o clima no Brasil e suas variações extremas na estação reprodutiva. Outro fator importante é que o transporte dos embriões é feito dentro de caixas isotérmicas em carros ou por motoboys. Pesquisas apontam que as temperaturas internas de um carro fechado alcançam acima de 50°C em 20 minutos (GIBBS *et al.*, 1995), demonstrando a importância de estudos avaliando as curvas de acondicionamento para transporte de embriões utilizadas atualmente à campo, e quais os danos causados aos embriões transportados.

2.2. Avaliação morfológica embrionária

A avaliação morfológica, mesmo subjetiva, surgiu para aferir a qualidade dos embriões transferidos, validando diferentes tipos de meios de transporte ou cultivo, e

manipulações embrionárias (CLARK et al., 1985; 1987; CAREVALE et al., 2000; MOUSSA et al., 2003; 2004). Levando à um valor preditivo sobre a taxa de prenhez e sobre a perda embrionária antes da transferência (MCKINNON e SQUIRES, 1988; VANDERWALL et al., 1996; CARNEVALE et al., 2000; MCCUE et al., 2009).

A classificação morfológica para os embriões equinos foi dividida em graus de qualidade entre 1 a 5, sendo 1- excelente, 2- bom, 3- razoável, 4- pobre e 5- não fecundado ou morto (MCKINNON e SQUIRES, 1988), com características morfológicas como compactação de blastômeros, blastômeros extrusados e/ou envelhecidos, coloração das células, formato do embrião, espaço perivitelínico, dano a zona pelúcida e cápsula, e a relação entre idade e estágio de desenvolvimento embrionário (MCKINNON e SQUIRES, 1988).

Sendo assim, a avaliação morfológica é um critério para aplicação comercial capaz de fornecer informações sobre a probabilidade de efetivação de gestações após a TE, e para os estudos fornecendo informações sobre as novas biotecnologias utilizadas. Obtendo um método de avaliação qualitativa antes e depois da aplicação das técnicas (VANDERWALL et al., 1996).

2.3. Estresse térmico

À medida que as mudanças climáticas progridem, o aumento da temperatura global e os eventos climáticos extremos se tornam mais frequentes e intensos (IPCC - *Intergovernmental Panel on Climate Change*, 2018). O Brasil, apesar de sua grande diversidade climática é caracterizado por altas temperaturas no verão, grande amplitude térmica e médias diárias superiores a 20°C. Além de condições extremas de temperaturas ao decorrer do dia, ultrapassando 30°C (Instituto Nacional de Meteorologia, MAPA), nos últimos 50 anos pesquisas relataram em todo país um acréscimo de 1°C e preveem um aumento entre 1 e 1,5°C nos próximos anos (MENEGASSI *et al.*, 2023).

Fontes de estresse, como excesso de calor, podem afetar aspectos reprodutivos nos mamíferos, incluindo gametogênese, desenvolvimento embrionário inicial, crescimento fetal e placentário (HANSEN, 2009). Os efeitos prejudiciais das mudanças climáticas no desempenho reprodutivo são bem elucidados em bovinos, devido as consequências econômicas causadas nos sistemas de pecuária ao redor do mundo (GARCIA-ISPIERTO *et al.*, 2006; HANSEN, 2009; SANTOLARIA *et al.*, 2010). Ainda assim, em equinos esta associação não foi avaliada diretamente, mesmo a analogia sugerindo efeitos semelhantes entre as espécies.

A influência de altas temperaturas reflete na qualidade do embrião recuperado. Éguas submetidas diariamente ao exercício físico durante 30 minutos no período periovulatório e ovulatório sob condições ambientais médias maiores que 30°C e umidade acima de 50%, mostraram uma redução de aproximadamente 50% na taxa de recuperação embrionária em comparação aos ciclos não exercitados (MORTENSEN *et al.*, 2009; CAMPBELL, 2014). Em 2010, foram relatados níveis aumentados na expressão de genes relacionados ao estresse térmico em blastocistos de éguas previamente exercitadas, e este aumento ocorreu na mesma proporção que a qualidade embrionária diminuiu (MORTENSEN *et al.*, 2010). Recentemente, foi observada a associação entre o aumento de temperatura e umidade com a perda embrionária precoce em éguas receptoras de embrião, justificada por uma sensibilidade do embrião no dia e na hora da TE (YU *et al.*, 2022).

O embrião pré-implantação se torna mais susceptível ao estresse térmico no início da gestação e pressupõe que se torne resistente de acordo com seu desenvolvimento (HANSEN, 2009). O aquecimento de embriões bovinos durante estágios iniciais de desenvolvimento foi associado a taxas mais baixas no desenvolvimento de embriões subsequentes, assim como menor número celular (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002; SAKATANI *et al.*, 2012).

Em equinos, a exposição de oócitos a 42°C por 4h, no estágio final de maturação, aumentou os níveis de transcrição do gene HSPA1A, gene alvo para análise da resposta embrionária equina precoce ao estresse térmico, nos blastocistos produzidos posteriormente (MORTENSEN *et al.*, 2010). É suspeito que a susceptibilidade do embrião inicial a condições de altas temperaturas seja justificada pela transcrição e adaptabilidade limitada de genes (SAKATANI *et al.*, 2012; SAKATANI, 2017), e se relacione ao aumento das espécies reativas ao oxigênio (EROs) (HANSEN, 2009).

2.4. Estresse oxidativo

Determinadas reações do embrião pré-implantação podem ser relacionadas ao aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (HANSEN, 2009). A produção desequilibrada de EROs e/ou de espécies reativas ao nitrogênio (RNS) levam a superprodução de enzimas antioxidantes e posterior estresse oxidativo (BOROWIECKA *et al.*, 2012).

Os produtos tóxicos provenientes do excesso dos EROs causam danos oxidativos celulares modificando proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos,

comprometendo a integridade e função celular como vias de sinalização e estabilidade genica (FINKEL e HOLBROOK, 2000; BIRBEN *et al.*, 2012). O óxido nítrico está diretamente ligado ao desenvolvimento embrionário, porém em excesso pode interagir com as espécies reativas levando a produção do citotóxico ânion de peroxinitrito. Este dano oxidativo induz uma cascata de produção de EROs, algumas das quais são transitórias, enquanto outras aparecem de forma acumulativa tardiamente, como malonaldeído que é detectado pela reação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (PEDERSEN *et al.*, 200; KELLER *et al.*, 2000; COLL *et al.*, 2017).

No embrião o acúmulo de EROs no desenvolvimento pode causar aumento de apoptose celular e alterações na expressão gênica (WAN e WINN, 2006), acarretando graves injúrias (COVARRUBIAS *et al.*, 2008). O estresse térmico também leva ao aumento da concentração de EROs na tuba uterina e nos embriões de ratos (OZAWA *et al.*, 2002; MATSUZUKA *et al.*, 2005), o que também foi relatado em bovinos (SAKATANI *et al.*, 2004; 2008).

Em bovinos, os embriões apresentam maior resistência à medida que se desenvolvem, devido a diminuição da geração de EROs em resposta ao choque térmico conforme o desenvolvimento embrionário progride (SAKATANI *et al.*, 2004), enquanto as concentrações intracelulares de antioxidantes citoplasmáticos aumentam (LIM *et al.*, 1996). Caso estes impactos embrionários se assemelhem entre as espécies, o mecanismo de estresse oxidativo justifica o fato dos embriões equinos maiores, quando refrigerados a baixas temperaturas, obterem menor número de lesões celulares comparados aos menores (CLARK *et al.*, 1987; MOUSSA *et al.*, 2003; 2004). Além disso, outro dado interessante é a termotolerância induzida do embrião, em que sua exposição prévia à altas temperaturas torna as células resistentes a um subsequente aumento de temperatura (HANSEN, 2009).

2.5. Proteínas do estresse térmico

A fim de controle do estresse térmico a célula desenvolveu um complexo sistema de proteção, compreendido em proteínas específicas conhecidas como proteínas do choque térmico (HSP), as quais apresentam função de neutralizar a exposição da célula a estímulos externos (SCHLESINGER, 1990). Ativamente estas proteínas desempenham papel de chaperonas moleculares intracelulares nos mamíferos, preservando, protegendo e restaurando a função proteica (SCHLESINGER, 1990).

Nos embriões, estímulos externos como fluxo de temperatura e luz induzem a

expressão de genes HSP (MORTENSEN et al., 2010; PINSINO et al., 2011), que são críticos para a sobrevivência celular por causarem desdobramento ou agregação proteica intracelular à níveis potencialmente tóxicos (OUTEIRO et al., 2006; AKERFELT et al., 2010).

Durante o estresse térmico, as interações proteicas não específicas podem levar a formação de proteínas não funcionais, e as HSPs atuam impedindo esta formação (MORTENSEN et al., 2010). A desnaturação de proteínas resulta em uma série de efeitos em outras funções, como na produção de energia, integridade da mitocôndria e equilíbrios oxidativos (GREGERSEN e BROSS, 2010), podendo levar a morte celular (DAVENPORT et al., 2008), demonstrando que as proteínas do choque térmico têm um impacto significativo no desenvolvimento embrionário.

A proteína de choque térmico 70 (HSP70) é uma das mais estudadas e conservada em todas as espécies. Em níveis basais, as HSP70 atuam como chaperonas moleculares dependentes de ATP, amparando no dobramento de polipeptídeos recém-sintetizados, na produção de complexos multiproteicos, também no transporte de proteínas através das membranas celulares (DIDELOT et al., 2006). Há indícios que HSP70 está envolvida na fertilização e desenvolvimento precoce de embriões (ZHANG et al., 2011).

A forma induzida destas proteínas (HSPA1A) é expressa em resposta a fatores estressantes, evitando agregação proteica (KAMPINGA, 2006). A HSP1A foi estudada em embriões de diversas espécies, quando submetidos ao estresse térmico (PUTNEY et al., 1988; EDWARDS et al., 1997; TOMPSON et al., 2008; BERNARDI et al., 2003). Em bovinos, a expressão de HSPA1A foi relatada nos embriões mais desenvolvidos (PUTNEY et al., 1988; EDWARDS et al., 1997). A proteína foi a mais abundante após estresse térmico em embriões de ratos no dia 10 e de camundongos no dia 8 de seu desenvolvimento (HUNT et al., 2004).

Em 2010, Mortensen et al. relataram a expressão genica da HSPA1A em embriões equinos provenientes de oócitos expostos a 42°C por 2h durante a maturação tardia. Este mesmo grupo constatou um aumento na expressão deste gene à medida que a qualidade do embrião diminuía (MORTENSEN et al., 2010), sugerindo que este gene também pode ser expresso em embriões produzidos *in vivo* submetidos ao estresse térmico proveniente do acondicionamento inadequado.

Em estudo atual, baseado em espectrometria de massa, foram identificadas 1977 proteínas de embriões equinos de 8 dias produzidos *in vivo* (TELES FILHO et al., 2024).

As proteínas mais abundantes encontradas estão envolvidas em diversas vias metabólicas, incluindo biossíntese de ATP e a glicose, também envolvidas na dobra e degradação proteica durante o desenvolvimento embrionário (TELES FILHO *et al.*, 2024).

As chaperonas, incluindo HSPs 60, 70, 71 e 90 aumentam sua expressão nas células tronco diferenciadas quando comparadas com as não diferenciadas, e vão diminuindo durante a diferenciação (YAN *et al.*, 2020; SARETZKI *et al.*, 2004, 2008). Os níveis elevados de chaperonas podem fornecer às células-tronco capacidades aprimoradas para gerenciar proteínas anormais e manter a homeostase celular (Yan *et al.*, 2020), sugerindo um papel semelhante da proteostase no desenvolvimento de embriões equinos (TELES FILHO *et al.*, 2024).

Outro sistema de identificação e degradação proteica é de ubiquitina-proteassoma (UPS), uma via primária de degradação, ligando por enzimas a ubiquitina às proteínas-alvo, utilizando um processo dependente de ATP (SCHUBERT *et al.*, 2000). Considerando a abundância encontrada de proteínas ligadas as duas vias, as chaperonas e as proteínas ligadas à UPS podem ser bons biomarcadores para injúrias envolvendo as biotecnologias reprodutivas (TELES FILHO *et al.*, 2024)

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1. Hipótese(s)

A temperatura durante o transporte em caixas isotérmicas influenciam a morfologia e produção de EROs dos embriões equinos de 8 ou 9 dias produzidos *in vivo*.

3.2. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do estresse térmico sobre a viabilidade embrionária durante diferentes simulações de transporte.

3.3. Objetivos específicos

Avaliar a morfologia e o estresse oxidativo de embriões de 8 ou 9 dias produzidos *in vivo*, após diferentes simulações de transporte sob acondicionamentos à 15°C ou 32°C por 24 horas, submetidos ou não a altas temperaturas em estufa (50°C), e após exposição direta em estufa (50°) durante 2 horas.

4. REFERÊNCIAS*

- ALONSO, C.; BRAGULAT, A. F.; LLORENTE, J.; MORIKAWA, I.; MEYEREN, M. V.; LOSINNO, L. Pregnancy rates for cooled transported equine embryos according to size and arrival temperature. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.89, p. 103078, 2020.
- AVANZI, B R.; FARRÁS, M. C.; MELO, C. M.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA, J. A.; MEDEIROS, A. S.; ARAUJO, G. H; PAPA, F. O. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v.94, p. 152-154, 2006.
- AKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 8, p. 545-55, 2010.
- BERNARDI, C.; FANTINATI, P.; CASTELLANI, G. FORNI, M.; ZANNONI, A.; SEREN, E.; BACCI, M. L. Alteration of constitutive heat shock protein 70 (HSC70) production by in vitro culture of porcine pre implanted embryos. **Veterinary Research Communications**, v.27, p. 575-578, 2003.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organ Journal**, v.5, p. 9-19, 2012.
- BOROWIECKA, M.; WOISIAT, J.; POLAC, I.; RADWAN, M.; RADWAN, P.; ZBIKOWSKI, H. M. Oxidative stress markers in follicular fluid of woman undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v.58, p. 301-305, 2012.
- CAMARGO, G. S.; BARROS, L. D.; OLIVEIRA-FILHO, J. P.; BROMBERGER, C. R.; DIAS-MELICIO, L. A.; SANTOS, L. A.; BERGFELT, D. R.; ANDADRE, E. R. F.; CANESIN, H. S.; MEIRA, C.; IGNÁCIO, F. S. 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**, v. 219, p. 39-48, 2024.
- CAMPBELL, M. L. H. Embryo transfer in competition horses: Managing mares and expectations. **Equine Veterinary Education**, v. 6, n. 26, p. 322-327, 2014.
- CARNEVALE, E. M.; RAMIREZ, R. J.; SQUIRES, E. L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 965-79, 2000.
- CARNEVALE, E. M.; SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O. Comparison of Ham's F10 with CO₂ or Hepes buffer for storage of equine embryos at 5C for 24H. **Journal of Animal Science**, v.65, n. 6, p. 1775-1781, 1987.
- CARNEY, N. J.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M.; SEIDEL JR, G. E.; JASKO, D. J. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p.23-32, 1991.
- CHOI, Y. H.; VELEZ, I. C.; RIERA, F. L.; ROLDÁN, J. E.; HARTMAN, D. L; BLISS, S. B.; BLANCHARD, T. L.; HAYDEN S. S.; HINRICHS, K. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 143-

* Referências organizadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023 informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 74p.

152, 2011.

CHOI, Y. H.; HINRICHS, K. Vitrification of in vitro-produced and in vivo- recovered equine blastocysts in a clinical program. **Theriogenology**, v. 87, p. 48-54, 2016.

CLARK, K. E.; SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O.; SEIDEL JR, G. E. Viability of stored equine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 2, p. 534-542, 1987.

CLARK, K. E.; SQUIRES, E. L.; TAKEDA, T.; SEIDEL JR, G. E. Effect of culture media on viability of equine embryos *in vitro*. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. S3, p. 35, 1985.

COOL, T. A.; CHAUFAN, G.; PÉREZ-TITO, L.; VENTUREIRA, M. R.; SOBARZO, C. C.; MOLINA, M. C. R.; CEBRAL, E. Oxidative stress and cellular and tissue damage in organogenic outbred mouse embryos after moderate perigestational alcohol intake. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 10, p. 1086-1099, 2017.

COOK, V. M.; SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O.; BAILEY, J.; LONG, P. L. Pregnancy rates of cooled, transported equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. S8, p. 80-81, 1989.

COVARRUBIAS, L.; HERNÁNDEZ-GARÍA, D.; SCHNABEL, D.; SALAS-VIDAL, E.; CASTRO-OBREGÓN, S. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? **Journal of Developmental Biology**, v. 320, p. 1-11, 2008.

CUERVO-ARANGO, J.; AGUILAR, J. J.; VETTORAZZI, M. L.; MARTÍNEZ-BOVI, R. eCG concentrations, luteal structures, return to cyclicity, and post abortion fertility in embryo transfer recipient mares. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1003-1013, 2015.

DAVENPORT, M. D.; LUTZ, C. K.; TIEFENBACHER, S.; NOVAK, M. A.; MEYER, J. S. A Rhesus Monkey Model of Self-Injury: Effects of Relocation Stress on Behavior and Neuroendocrine Function. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 10, p. 990-996, 2008.

DIAZ, F. A.; GUTIERREZ, E. J.; CRAMER, E.; PACCAMONTI, D. L.; GENTRY, G. T.; BONDOLI, K. R. Pregnancy rates following low-temperature storage of large equine embryos prior vitrification. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 64, p. 12-16, 2018.

DIDELOT, C.; SCHIMITT, E.; BRUNET, M.; MAINGRET, L.; PARCELLIER, A.; GARRIDO E. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 172; 171-198.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction & Development**, v. 46, p. 138-145, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁÑIZ, J. L.; NOGAREDA, C.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; DE RENSIS, F. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 4, p. 799-807, 2006.

GASTAL, G. D. A.; SCARLET, D.; MELCHERT, M.; ERTL, R.; AURICH, C. Epigenetic changes in equine embryos after short-term storage at different temperatures. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1325-45, 2021.

GIBBS, L. I.; LAWRENC, D. W.; KOHN, M. A. Heat exposure in an enclosed automobile. **Journal of the Louisiana State Medical Society**, v. 147, p. 12, 1995.

GOMES, L. P. M.; GAVIOLI, D.; JACOB, J. F.; CRESPILOHO, A. M.; CARDOSO, C. E.; GOMES, G. M. Taxa de gestação de embriões equinos mantidos em dois meios comerciais diferentes de manutenção pós- transferência de embriões. **Revista Saúde**, v. 5, n. 1/2, p. 23-27, 2014.

- GOOD, N. E.; WINGET, G. D.; WINTER, W.; CONNOLLY, T. N.; IZAWA, S.; SINGH, R. M. M. Hydrogenion buffers for biological research. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467-477, 1966.
- GREGERSEN, N.; BROSS, P. Protein misfolding and cellular stress: an overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 648, p. 3-23, 2010.
- HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 364, p. 3341-3350, 2009.
- HUNT, C. R.; DIZ, D. J.; SHARMA G. G.; PANDITA, R. K.; GUPTA A.; FUNK, M.; PANDITA, T. K. Genomic instability and enhanced radiosensitivity in Hsp70 1 and Hsp70 3 deficient mice. **Molecular and Cellular Biology**, v.24, p. 899-911, 2004.
- IMEL, K. J.; SQUIRES, E. L.; ELSDEN, R. P.; SHIDELER, R. K. Collection and transfer of equine embryos. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 179, n. 10, p. 987-991, 1981.
- IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. MASSON-DELMOTTE, V.; ZHAI, P.; POERTNER, H. O.; ROBERTS, D. C.; SKEA, J.; SHUKLA, P. R.; PIRANI, A.; MOUFOUMA-OKIA, W.; PEAN, C.; PIDCOCK, R.; CONNORS, S.; MATHEWS, T. The context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. **Intergovernmental Panel on Climate Change**, Geneva, Switzerland, 2008.
- KAMPINGA, H. H. Chaperones in preventing protein denaturation in living cell and protecting against cellular stress. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 172, p. 1-42, 2006.
- KAYSER, J. P.; AMANN, R. P.; SHIDELER, E. L.; JASKO, D. J.; PICKETT, B. W. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, -. 601-614, 1992.
- KELLER, J. N.; LAUDERBACK, C. M.; BUTTERFIELD, D. A.; KINDY, M.S.; MARKESBERRY, W. R. Amyloid-beta peptide effects on synaptosomes from Apolipoprotein E-deficient mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, v. 1579-86, 200.
- LIM, J. M.; LIOU, S. S.; HANSEL, W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of b-mercapto-ethanol in preimplantation development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 429-439, 1996.
- MATSUZUKA, T.; OZAWA, M.; NAKAMURA, A.; USHITANI, A.; HIRABAYASHI, M.; KANAI, Y. Effects of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 2, p. 281-7, 2005.
- MCCUE, P. M.; DELUCA, C. A.; WALL, J. J. Cooled transported embryo technology. **Equine Reproduction**, No. Ed.2, v. 24, p. 2880-86, 2011.
- MCCUE, P. M.; DELUCA, C. A.; FERRIS, R. A.; WALL, J. J. How to evaluate equine embryos. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, Las Vegas, v. 55, p. 252-255, 2009.
- MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E. L. Morphologic assessment of the equine embryo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, p. 401- 406, 1988.
- MENEGASSI, S. R. O.; LOPES, L. F. D.; MORAIS, H.; ALENCAR, A. P.; LOPES, F. G.; BARCA JUNIOR, F. A. Climate change in Brazil: evolutionary, comparative and forecast study. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 155, p. 2323-2328, 2023.
- MORTENSEN, C. J.; CHOI, Y. H.; HINRICHS, K.; ING, N. H.; KRAEMER, D. C.; VOGELSANG, S. G.; VOGELSANG, M. M. Embryo recovery from exercised mares. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 237-44, 2009.
- MORTENSEN, C. J.; CHOI, Y. H.; ING, N. H.; KRAEMER, D. C.; VOGELSANG, M. M.; 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 of donor mares. **Theriogenology**, v. 74, p. 374-383, 2010.

MOUSSA M.; DUCHAMP, G.; DAEL, P. F.; BRUYAS, J. F. Effect of embryo age on the viability of equine embryos after cooled storage using two transport systems. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 11, p. 529-534, 2006.

MOUSSA, M.; TREMOLEDA, J. L.; DUCHAMP, G.; BRUYAS, J. F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; DAELS, P. F. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5°C. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 921-932, 2004.

MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R.; BRUYAS, J. F.; DAEL, P. F. 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**, v. 59, n. 7, p. 1615-1625, 2003.

MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R.; BRUYAS, J. F.; DAEL, P. F. Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 and Emcare holding solutions. **Theriogenology**, v. 58, n.2-4, p. 755-757, 2002.

MOYA-ARAUJO, C. F.; ARAUJO, G. H.; MEIRA, C. Avanços na criopreservação de embriões equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 58-66, 2010.

OUTEIRO, T. F.; KLUCKEN, J.; STRATHEARN, K. E.; LUI, F.; NGUEN, P.; ROCHET, J. C.; HYMAN, B. T.; MCLEAN, P. Small heat shock proteins protect against alpha-synuclein-induced toxicity and aggregation. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, V. 351, N. 3, P. 631-8, 2006.

OZAWA, M.; HIRABAYASHI, M.; KANAI, Y. Developmental competence and oxidative state of mouse zygotes heat-stressed maternally or in vitro. **Reproduction**, v. 124, p. 683-689, 2002.

PAPA, FREDERICO OZANAM. **Reprodução de Garanhões**. 1a. ed. Brasil: MEDVET, 2020.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; Heat-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1169-1177, 2002

PEDERSEN, W. A.; CHAN, S. L.; MATTSON M. P.; A mechanism for the neuroprotective effect of apolipoprotein E: isoform specific modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, p. 1426-33, 2000.

PINSINO, A.; TURTURICI, G.; SCONZO, G.; GERACI, F. Rapid changes in heat-shock cognate 70 levels, heat-shock cognate phosphorylation state, heat shock transcription factor, and metal transcription factor activity levels in response to heavy metal exposure during sea urchin embryonic development. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 246-54, 2011.

PUTNEY, D. J.; MALAYER, J. R.; GROSS, T. R.; THATCHER, W. W.; HANSEN, P. J.; DROST, M. Heat stress induces alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine **endometrium**. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 717-28, 1988.

RIERA, F. L.; ROLDÁN, J. E.; ESPINOSA, J. M.; FERNANDEZ, J. E.; ORTIZ, I.; HINRICHS, K. Application of embryo biopsy and sex determination via polymerase chain reaction in a commercial equine embryo transfer program in Argentina. **Reproduction, Fertility and Development**, 2019.

SANTOLARIA, P.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; BECH-SÀBAT, G.; ÂNGULO, E.; CARRETERO, T.; S'NCHEZ-NADAL, J. A.; 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. **International Journal of Biometeorology**, v. 54, n. 1, p. 93-8, 2010.

- SAKATANI, M. Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, p. 347-52, 2017.
- SAKATANI, M.; ALVAREZ, N. V.; TAKAHASHI, M.; HANSEN, P. J. Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 3080-91, 2012.
- SAKATANI, M.; YAMANAKA, K.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. Heat shock derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in vivo early-stage bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, p. 496-501, 2008.
- SAKATANI, M.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, M. Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, p. 77-82, 2004.
- SARETZKI, G.; ARMSTRONG, L.; LEAKE, A.; LAKO, M.; VON SGLINICKI, T. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. **Stem Cells**, v. 22, p. 962-971, 2004.
- SARETZKI, G.; WALTER, T.; ATKINSON, S. P.; PASSOS, J. F.; BARETH, B.; KEITH, W. N.; STEWART, R.; HOARE, S. F.; STOJKOVIC, M.; ARMSTRONG, L. Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 455-464, 2008.
- SCHLESINGER, M. J. Heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 21, p. 12111-4, 1990.
- SQUIRES, E. L. Current reproductive Technologies impacting equine embryo production. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 102981, 2020.
- SQUIRES, E. L.; IMEL, K. J.; IULIANO, M. F.; SHIDELER, R. K. Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer program. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 32, p. 409, 1982.
- SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 91-104, 1999.
- SCHUBERT, U.; ANTÓN, L. C.; GIBBS, J.; NORBURY, C. C.; YEWDELL, J. W.; BENNIK, J. R. Rapid degradation of large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. **Nature**, v. 404, p. 770-774, 2000.
- TELES FILHO, A. C. A.; SANCHEZ, D. J. D.; VIANA, A. G.; SHEHERYAR, S.; GUERREIRO, D. D.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; MARTINS, A. M. A.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O.; FONTES, W.; MOURA, A. A. A prospective study of the proteome of equine pre-implantation embryo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 59 (7), p. 14663, 2024.
- THOMPSON, D. M.; LU, C.; GREEN, P. J.; PARKER, R. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. **RNA**, v. 14, p. 2095-10, 2008.
- SWEGEN, A.; GRUPEN, C. G.; GIBB, Z.; BAKER, M. A.; DE RUIJTER-VILLANI, M.; SMITH, N. D.; STOUT, T. A. E.; AITKEN, R. J. From peptide masses to pregnancy maintenance: A comprehensive proteomic analysis of the early equine embryo secretome, blastocoel fluid, and capsule. **Proteomics**, v. 17, p. 17-18, 2017.
- VANDERWALL, D. K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 61-83, 1996.
- 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**, v. 188, p.37-42, 2022.
- WAN, J.; WINN, L. M. In utero-initiated cancer: The role of reactive oxygen species. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, v. 78, p. 326-332, 2006.

ZHANG, B.; PEÑAGARICANO, F.; DRIVER A.; CHEN, H.; KHATIB, H. Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4174-4182, 2011.

CAPÍTULO 2

Este artigo, será submetido ao periódico da Revista Theriogenology

ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito do estresse térmico sobre embriões equinos produzidos *in vivo* durante simulação de transporte

*Effects of heat stress on in vivo produced equine embryos during short storage
simulation*

Giulia Vignoli¹ | Karina Resende Assoni¹ | Giovana Siqueira Camargo¹ | Giovanna
Nannini¹ | Fabiana Ferreira de Souza¹ | Beatriz Lippe de Camilo ¹ | Gabriel Augusto
Monteiro ¹ | Fernanda Saules Ignácio¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, Botucatu, São Paulo, Brasil

¹São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal
Science, Botucatu, São Paulo, Brazil

*Autor correspondente:

E-mail:

fernanda.s.ignacio@unesp.br (FS Ignácio)

Resumo

O objetivo deste estudo foi simular diferentes temperaturas de transporte, submetidos ou não à estresse térmico em estufa à 50°C por 2h (ET) sobre a viabilidade de embriões equinos. Embriões de 8-9 dias foram coletados e analisados (M0) quanto a morfologia e divididos em grupo controle (n=7, avaliação imediata) e ET (n=7, estufa à 50°C/2h); grupo 15°C (n=6, 15°C) e 32°C (n=6, 32°C) em caixa isotérmica durante 24h; e grupo 15°C-ET (n=6, 15°C) e 32°C-ET (n=6, 32°C) em caixa isotérmica durante 24h submetidos a estufa (50°C) por 2h. Após as simulações foi avaliado (M1) a morfológica e estresse oxidativo (ng/mL). O ET em estufa promoveu aumento da temperatura da caixa, avaliada a cada 15 minutos, em 4h e 6h e redução até 24h (15°C-ET; 32°C-ET). O grupo ET mostrou aumento a partir do minuto 30 e ficou acima de 41,2°C por 2h. A taxa de crescimento do grupo 32°C-ET foi maior que o 15°C, 15°C-ET e ET; do grupo ET menor que o 15°C, 32°C e 32°C-ET. O grupo ET diminuiu o grau de qualidade do M0 (G1+) para o M1(G2-), e teve resposta oxidativa maior que todos os grupos. Os grupos controle, 32°C e 15°C-ET foram iguais quanto a resposta oxidativa, e o grupo 15°C foi menor que os demais grupos. Considerando o grupo controle como a resposta oxidativa esperada, o transporte a 32°C foi seguro quando não submetido ao ET e o transporte à 15°C quando exposto à altas temperaturas.

Palavras-chave: estresse térmico, qualidade embrionária, acondicionamento, simulação de transporte.

1. Introdução

Atualmente a transferência de embriões (TE) é uma das biotecnologias de maior relevância a campo, refletindo diretamente no mercado equestre atual, por potencializar a produção e comércio de produtos de alto valor agregado [1]. Conforme a crescente demanda desta biotecnologia, o transporte de embriões por curtos períodos, de aproximadamente 24h, vem ganhando destaque na rotina a campo [2,3].

Apesar de sua importância dentro dos programas de TE, os estudos que preconizaram o transporte não levaram em consideração a elevação da temperatura média global atual durante a estação reprodutiva [4,5]. À medida que as mudanças climáticas progridem, o aumento da temperatura diária tem se tornado mais frequente e intenso, podendo ultrapassar o aumento esperado de 1,5°C para os próximos anos [4,13]. O efeito dos extremos climáticos nas temperaturas sobre o desempenho reprodutivo em bovinos já foi estudado [14-16], entretanto são raros os estudos sobre estas variações nos equinos. O aumento da temperatura em resposta ao exercício físico diário por 30 minutos em éguas durante o período periovulatório e ovulatório indicou diminuição da qualidade embrionária e aumento na expressão de genes relacionados ao estresse térmico em embriões equinos [17-19]. Recentemente, um estudo associou o aumento da temperatura e umidade com a perda embrionária precoce [20], demonstrando que o aumento da temperatura interfere diretamente na qualidade e desenvolvimento embrionário em equinos, assim como em outras espécies [21].

Em ratos, embriões submetidos ao estresse térmico tiveram um aumento significativo de espécies reativas ao oxigênio (EROs) [22,23], o que também foi observado em bovinos [24,25]. O primeiro relato em embriões equinos submetidos ao estresse térmico foi em oócitos expostos a 42°C por 4h no seu estágio de maturação final expressaram genes (HSPA1A) associados às proteínas do choque térmico (HSP) em seus subsequentes blastocistos. Entre estas, a HSP70 e sua forma induzida HSPA1A foram as mais relacionadas a resposta celular à fatores estressantes, como o aumento da temperatura, evidenciando a equidade de resposta ao estresse térmico entre as espécies. [18, 26-29].

As proteínas presentes no embrião equino de 8 dias foram descritas, e incluem chaperonas e proteínas do sistema de ubiquitina-proteossoma (UPS) que estão envolvidas no dobramento e degradação proteica durante o desenvolvimento embrionário [30,31]. Considerando a abundância dessas vias proteicas no embrião, estes podem ser biomarcadores para alterações embrionárias [30], o que torna a análise proteica

importante para definir o estado de atividade e resposta do embrião às condições de transporte.

Os sistemas de transporte de embriões equinos utilizados a campo foram sustentados pelos estudos feitos para o transporte de sêmen [32], o que enfatiza a necessidade de avaliação de condições de acondicionamento que sejam adequadas às características específicas do embrião. Estudos atuais constataram efeitos benéficos sobre a expressão genica [10], qualidade morfológica e crescimento positivo [11] de embriões equinos produzidos *in vivo* acondicionados a 20°C [10] ou 25 °C [11] em comparação aos refrigerados a 5°C [10, 11]. Essas análises condizem com os dados obtidos a campo para as taxas de prenhez e desenvolvimento da gestação, que indicam taxas gestacionais mais altas após acondicionamento entre 10 e 16°C comparados a 5°C [12] e menor vesícula embrionária detectada em gestações obtidas da inovulação de embriões mantidos à 5°C [9].

No nosso conhecimento não existe estudos que avaliem o efeito do estresse térmico sobre o transporte curto de embriões equinos produzidos *in vivo*, frequentemente transportados em condições de alta temperatura, seja devido ao calor ambiental extremo ou em veículos e locais fechados. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes condições de transporte de embriões equinos produzidos *in vivo* compatíveis com o transporte a campo e o efeito do estresse térmico sobre a viabilidade embrionária.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza e obtidos das empresas Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e Thermo Fisher Scientific (São Paulo, SP, Brasil).

2.2. Aspectos éticos

Os aspectos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Experimento Animal (CONCEA) foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovado pela Comissão Institucional de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo nº 0214/2022.

2.2. Animais e grupos experimentais

O estudo foi conduzido na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na estação reprodutiva de 2022/23 e 2023/24, utilizando 15 éguas

mestiças, cíclicas, com escore corporal de 4 e idade média de 11 anos, da área de Reprodução Animal e Posto de Monta – FMVZ, localizado no Campus de Botucatu-SP, situado à latitude de 22°53'09''sul e longitude de 48°26'42''oeste, em altitude de 804 metros.

Os embriões foram recuperados das éguas por lavagem uterina e separados, aleatoriamente, em 6 grupos experimentais: controle (n= 7, avaliação imediata após colheita); 15°C (n= 7, acondicionados à 15°C em caixa isotérmica por 24 h); 32°C (n= 6, acondicionados em caixa isotérmica à 32°C por 24 h); 15°C-ET (n=6 , acondicionados à 15°C em caixa isotérmica por 24 h e submetido ao estresse térmico em estufa à 50°C por 2h); 32°C-ET (n= 6, acondicionados à 32°C em caixa isotérmica por 24 h e submetido ao estresse térmico em estufa à 50°C por 2 h) e ET (n= 7, submetidos ao estresse térmico imediato em estufa à 50°C após coleta por 2 h).

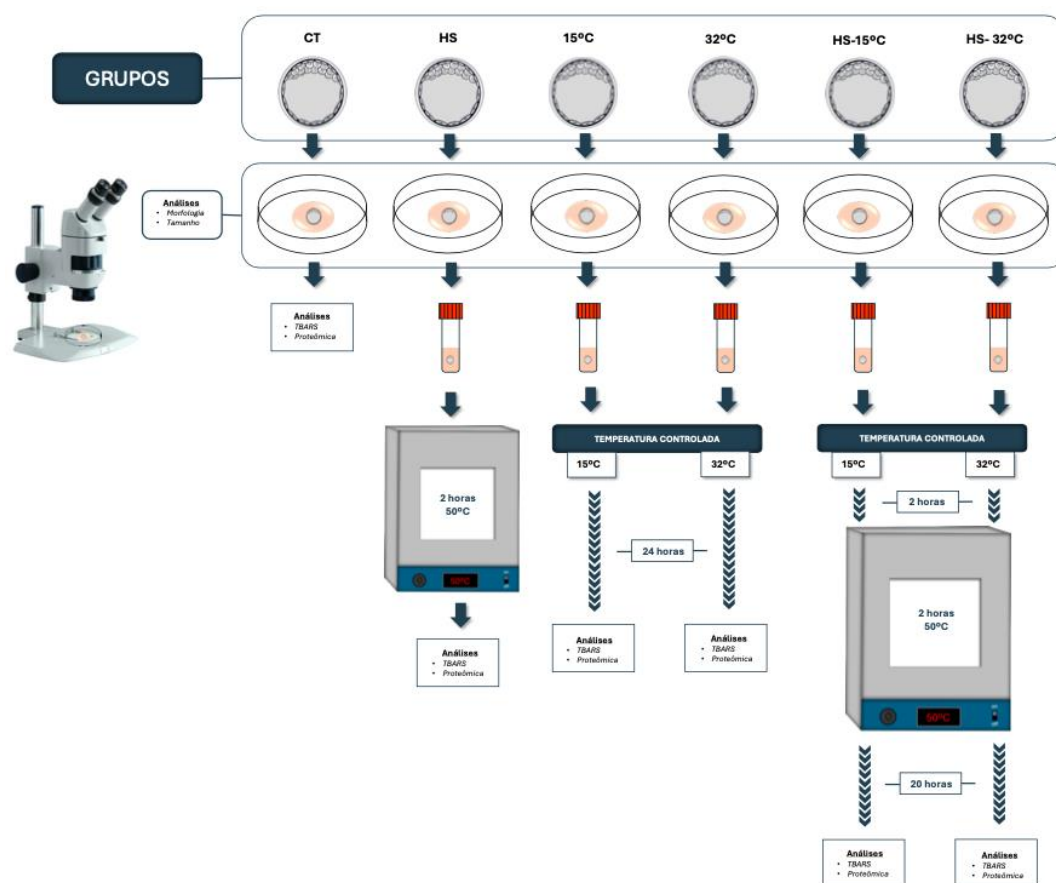


Fig. 1. Design experimental apresentando os diferentes sistemas de acondicionamento para transporte nos grupos testados (15°C, 32°C, 15°C-ET e 32°C-ET), e dos embriões submetidos diretamente ao estresse térmico em estufa à 50°C.

2.3. Preparação das doadoras

O acompanhamento do crescimento folicular das éguas foi conduzido pela palpação e ultrassonografia (Minday DP-10®, Shenzhen, China) transretal uma vez ao dia. A ovulação foi induzida utilizando 200 µg de deslorelina (Sincrorrelin®, Ourofino SaúdeAnimal, Cravinhos, São Paulo, Brasil) por via intramuscular nas éguas com folículos maiores ou igual a 35mm e edema uterino grau 2 ou 3 [33]. Vinte e quatro horas após a indução as éguas foram inseminadas com sêmen fresco diluído na dose de 1×10^9 células espermáticas móveis, obtidos de 3 garanhões com qualidade espermática e fertilidade comprovadas. Após a detecção da ovulação (D0), os embriões foram coletados 8 a 9 dias após por meio da lavagem uterina [34].

2.4. Manipulação e acondicionamento embrionário

Após a lavagem uterina, o conteúdo do filtro foi depositado sobre uma placa de petri (90x15mm) e o rastreamento do embrião feito em esteromicroscópio (Nikon SMZ800N®, Tóquio, Japão). Após a identificação, os embriões foram lavados em 10 gotas do meio comercial de manutenção embrionária (TQC Holding Embryo lifeVitrocell®, Campinas, São Paulo, Brasil).

Todos os embriões foram transferidos para um criotubo contendo 2 mL de meio de manutenção. Para os grupos 15°C, 32°C, 15°C-ET e 32°C-ET, os criotubos contendo o embrião foram acondicionados em caixa isotérmica (Botuflex®, Botucatu, São Paulo, Brasil). Foi utilizado um gelo rígido de gel reutilizável mantido em freezer a -20°C por 48h (grupo 15°C e 15°C-ET). Os gelos foram previamente preparados, mantidos por um período de 48h à -20°C. Para acondicionamento à 32°C, foram utilizados dois gelos rígidos reutilizáveis, previamente mantidos em banho-maria à 32°C por um período de 48 h (grupo 32°C e 32°C-ET).

Os sistemas de transporte se mantiveram em duas diferentes condições: temperatura ambiente por 24 horas (Grupos 15°C e 32°C) e sob estresse térmico em estufa, com ambiente controlado à 50°C por 2 horas (Grupos 15°C-ET e 32°C-ET). Os embriões do grupo ET foram submetidos às mesmas condições de estresse térmico, porém sem acondicionamento em caixa (criotubo colocado diretamente na estufa).

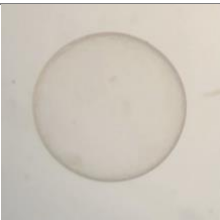
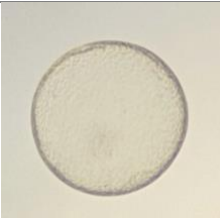
Para avaliação das variações de temperatura dentro e fora da caixa isotérmica ao longo das 24h de procedimento, um termômetro foi colocado em tubo Falcon contendo ringer com lactato e o criotubo com o embrião. A temperatura foi anotada a cada 2h nas primeiras 6h, para controle da curva de refrigeração, e a cada 6h para avaliação da manutenção. De temperatura até as 24h. Nos sistemas submetidos ao estresse térmico, a

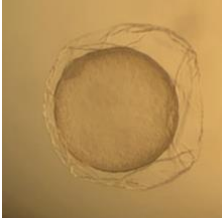
caixa isotérmica foi colocada em estufa à 50°C por 2h. Durante este período a temperatura interna e externa foi avaliada a cada 15 minutos. Os embriões do grupo ET colocado em criotubo contendo 2 mL de meio de manutenção foram diretamente para estufa à 50°C por 2h, com avaliação interna e ambiente, a cada 15 minutos.

2.5. Avaliação morfológica

Os embriões foram avaliados em dois momentos, logo após a recuperação e manipulação embrionária (M0), e após acondicionamento para simulação de transporte (M1) por 24h (grupos 15°C, 32°C, 15°C-ET e 32°C-ET) ou 2h (grupo ET). Nos dois momentos foram avaliadas fase de desenvolvimento embrionário (Blastocisto inicial [Bi], Blastocisto ou Blastocisto expandido[Bx]), mensuração do diâmetro utilizando régua micrométrica e grau de qualidade morfológica 1-5 [34] adaptado em Grau 1+ (Excelente +), 1- (Excelente -), 2+ (Bom +), 2- (Bom -), 3+ (Pobre +), 3- (Pobre -), 4 (Degenerado) e 5 (ócito não fertilizado) (Tabela. 1). A avaliação morfológica subjetiva da qualidade embrionária foi feita por três avaliadores experientes de maneira independente.

Tabela. 1. Classificação morfológica descritiva adaptada de McKinnon e Squires (1988) e Camargo *et al.* (2024).

GRAU (1-5) CLASSIFICAÇÃO		DESCRIÇÃO
1+	Excelente +	 Sem anormalidades observadas, esférico, células uniformes em tamanho, cor e textura, tamanho e estágio de desenvolvimento compatíveis com a idade pós-ovulação.
1-	Excelente -	 Mesmas características descritas para o grau 1+, porém com escurecimento menor que 10% das células e mudança leve de textura.
2+	Bom +	 Pequenas imperfeições, com poucos blastômeros extrusados e debris, poucas irregularidades em forma, tamanho, extrusão de células do trofoblasto, escurecimento maior que 30% das células e mudança de textura leve a moderada; pequenas separações entre trofoblasto e cápsula.

2 -	Bom -		Mesmas características descritas para o grau 2+, porém com as alterações morfológicas visualmente mais evidenciadas, mudança de textura moderada a severa.
3 +	Pobre +		Imperfeições de níveis moderados, como grande porcentagem de blastômeros degenerados ou debris, colapso parcial da blastocèle ou contrações moderadas do trofoblasto da cápsula.
3 -	Pobre -		Mesmas características descritas para grau 3+, porém com as alterações morfológicas visualmente mais evidenciadas.
4	Degenerado		Problemas graves e facilmente identificados, como alta % de blastômeros extrusados, e colapso completo da blastocèle, ruptura da cápsula, ou completa degeneração e morte embrionária.
5	UFO		Oócito não fecundado (chatos, não rolam, tipo prato)

2.6. Preparação dos embriões

As análises moleculares foram feitas no Laboratório de proteômica aplicada na Reprodução Animal (LAPROT), FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Os embriões foram lavados individualmente em 5 gotas sequenciais de PBS pH 7,2, em seguida foi adicionado 200 µL de solução tampão modificada RIPA (150 mmol NaCl, 1% Triton X-100, 1% desoxicolato de sódio, 0.1% dodecil sulfato de sódio, 0.8 mmol EDTA, 1.0 µg/mL aprotinina, 1.0 µg/mL leupeptina, e 35.0 µg/mL PMSF em 50 mmol Tris-HCL pH 7.2) [35, 36]. As amostras foram sonicadas em banho de gelo, centrifugadas à 10.000 x g por 30 minutos em 4°C, o sobrenadante foi recuperado e armazenado à -80°C [37].

2.7. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)

O estresse oxidativo foi determinado pela reação ao ácido tiobarbitúrico (espontâneo) para estabelecer as concentrações de malonaldeído. Inicialmente para reação espontânea, foi utilizada uma alíquota de 100 µL da amostra embrionária e

adicionado 200 μ L TCA 10% (3:1) gelado. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 15.000 xg por 10 minutos em 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recuperado (300 μ L).

Sequencialmente foi adicionado 300 μ L do TBA 1% e incubado por 15 minutos em banho-seco à 90-100°C em tubo fechado. A reação foi interrompida em gelo por 30 segundos. A leitura foi conduzida em nanoespectômetro a 532 nm (NanoDropTM2000, ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA). A concentração foi baseada em curva padrão confeccionada com concentrações conhecidas de MDA.

2.8. *Análise estatística*

Para avaliação das curvas de temperatura foi realizada verificação de normalidade dos conjuntos de dados com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em resposta a não normalidade, procedeu-se a transformação logarítmica para normalizar as distribuições. Para os dados normalizados, as métricas foram apresentadas como média +/- erro padrão, enquanto para os não normalizados, foram realizadas mediante os intervalos interquartis. Análises longitudinais da comparação de medidas repetidas em grupos, ao longo do tempo, foram realizadas mediante o modelo de efeitos mistos (REML), apropriado para dados com medidas repetidas. As comparações entre grupos foram efetuadas utilizando ANOVA para dados normalmente distribuídos, e teste Kruskal-Wallis para os não paramétricos. Na ocorrência de diferenças significativas, o teste post hoc de Tukey foi implementado para identificar exatamente em qual grupo se manifestou.

Foram realizadas regressões lineares com base no tamanho e taxa de crescimento dos embriões nos diferentes grupos (15°C, 32°C, 15°C-ET, 32°C-ET e ET) e os momentos (M0 e M1). Para controle de erro foi realizada a clusterização pelas éguas. O teste ANOVA two way foi utilizado para avaliação dos diferentes momentos dentro de cada grupo, porém não foi detectado diferença estatística. E para avaliação do grau de qualidade embrionário foi realizado teste Wilcoxon para comparação dos momentos por grupos.

As amostras foram submetidas ao teste de normalidade (Shapiro Wilk), não indicando normalidade dos dados que foram apresentados na distribuição de Poisson, sendo assim, optou-se por um modelo linear generalizado para comparação do estresse oxidativo entre os grupos. O software GraphPad Prism versão 9.0.0 e o Stata 17 OSB software foram utilizados para realizar as análises. Todas as análises utilizaram utilizando nível de significância de 5% para detecção das diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Curva de temperatura

As diferenças entre os momentos no mesmo grupo e entre os grupos no mesmo momento das curvas de temperatura durante o acondicionamento por 24h em caixa isotérmica a 15°C, a 32°C e sob condições de estresse térmico estão representadas na Fig. 2, também as variações de temperatura ambiental durante o período analisado.

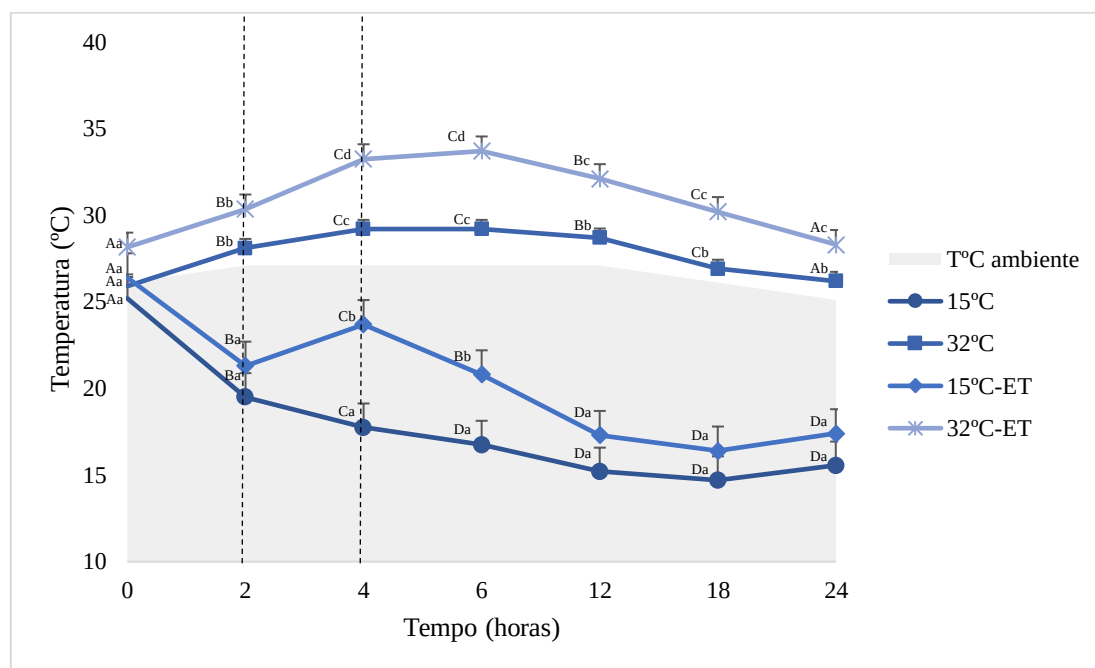


Fig. 2. Média $\pm$ SEM das temperaturas internas nos sistemas de acondicionamento para transporte submetidos ou não ao estresse térmico em estufa à 50°C (15°C, 32°C, 15°C-ET, 32°C-ET). As linhas tracejadas indicam o período que os grupos submetidos ao estresse térmico (15°C-ET, 32°C-ET) foram colocados dentro da estufa. A área sombreada delimita as temperaturas dentro da variação média da temperatura ambiental aferida ao longo do tempo. (A, B, C, D) As letras maiúsculas indicam as diferenças entre os momentos no mesmo grupo ($P < 0,05$), e (a, b, c, d) as minúsculas as diferenças entre os grupos no mesmo momento.

A diferença da temperatura interna na caixa nos sistemas submetidos ao estresse térmico em estufa à 50°C estão representadas na Fig. 3, apresentando a diferença entre os momentos dentro de cada grupo e entre os grupos no mesmo momento.

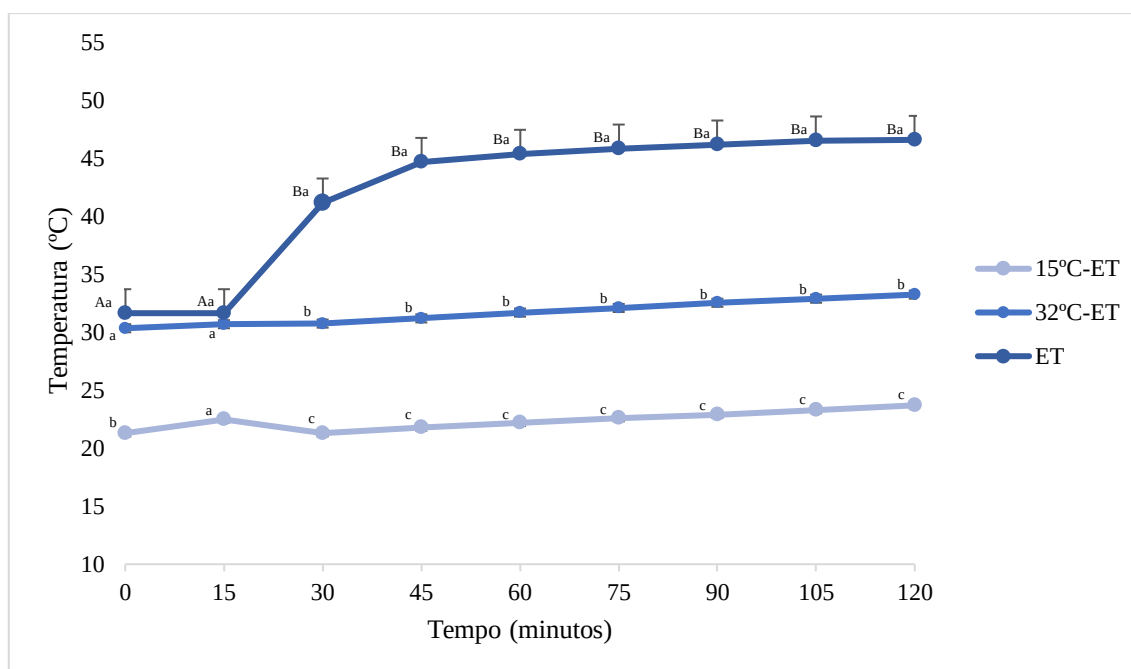


Fig.3. Média $\pm$ SEM das temperaturas nos sistemas submetidos ao estresse térmico em estufa à 50°C (15°C-ET, 32°C-ET e ET). (A, B, C, D) As letras maiúsculas indicam as diferenças entre os momentos no mesmo grupo ($P < 0,05$), e (a, b, c, d) as minúsculas as diferenças entre os grupos no mesmo momento.

3.2 Tamanho e grau de qualidade dos embriões

A comparação do tamanho dos embriões entre todos os grupos no M0, independente do tipo de acondicionamento, não diferiu entre os grupos. Entretanto, o tamanho/taxa de crescimento no M1, representado na Fig. 4, diferiu entre os grupos.

O grupo 15°C (1333 μm e taxa de crescimento = +17,4%) sendo menor que o grupo 32°C-ET (1758 μm e taxa de crescimento = +32,6%; $P = 0,026$) e maior que o grupo ET (1300 μm e taxa de crescimento = + 2,7%; $P = 0,038$). Para o grupo 32°C (2116 μm e taxa de crescimento = +32,1%), o tamanho/taxa de crescimento dos embriões em M1, foi maior ($P=0,01$) que o grupo ET.

Nos sistemas submetidos ao estresse térmico em estufa (50°C), o grupo 15°C-ET (1883 μm e taxa de crescimento = +10,7%) obteve tamanho/taxa de crescimento menor ($P = 0,045$) que o grupo 32°C-ET. Enquanto o grupo 32°C-ET foi maior ($P = 0,026$) que os grupos 15°C, 15°C-ET ($P = 0,045$) e ET ($P = 0,012$). Já o grupo ET demonstrou ser menor que os grupos 15°C ($P = 0,038$), 32°C ($P = 0,011$) e 32°C-ET ($P = 0,012$).

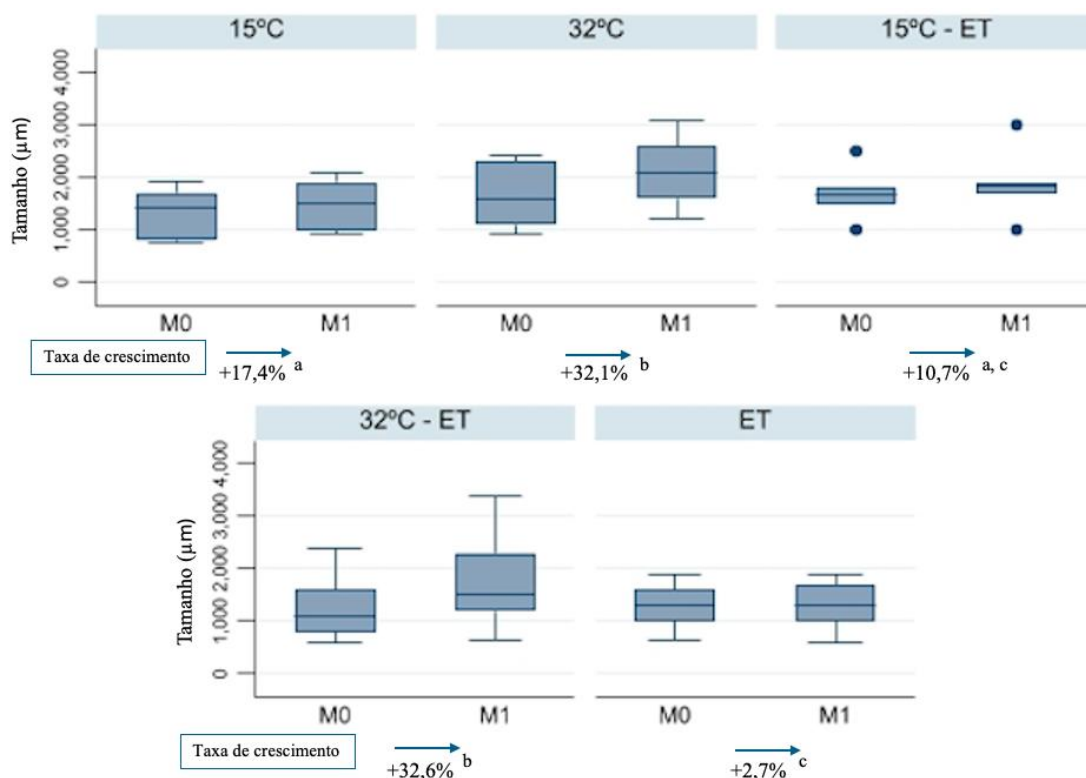


Fig. 4. Box plot da mediana dos tamanhos (μm), mudança percentual média e taxa de crescimento entre M0 e M1 de embriões equinos de 8 dias colocados em sistemas de acondicionamento para transporte de 24h em diferentes temperaturas, submetidos ou não ao estresse térmico em estufa à 50°C por 24h (grupos 15°C, 32°C, 15°C-ET e 32°C-ET), e de embriões colocados sem sistema de acondicionamento prévio em estufa à 50°C (grupo ET) por 2h. As letras a, b e c indicam as diferenças significativas ($P < 0,05$).

A distribuição da qualidade embrionária entre M0 e M1 dos diferentes grupos e estresse térmico estão apresentadas na Tabela. 2.

Tabela 2. Grau de qualidade morfológica dos embriões em diferentes sistemas de acondicionamento (15°C e 32°C), submetidos ao estresse em estufa à 50°C (15°C-ET e 32°C-ET) e embriões não colocados em sistemas, somente em estufa à 50°C (ET). (*) indica a diferença significativa entre M0 e M1 dentro de cada grupo ($P < 0,05$).

Graus (%)							
	G1+	G1-	G2+	G2-	G3+	G3-	G4
15°C							
M0	85,7 (6/7)	14,3 (1/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)
M1	85,7 (6/7)	14,3 (1/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)
15°CET							
M0	66,6 (4/6)	0 (0/6)	33,3 (2/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
M1	83,3 (5/6)	16,7 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
32°C							
M0	50 (3/6)	50 (3/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
M1	50 (3/6)	50 (3/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)

32°CET							
M0	66,6 (4/6)	16,7 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	16,7 (1/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
M1	16,7 (1/6)	50 (3/6)	33,3 (2/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)	0 (0/6)
ET							
M0	100 (7/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)
M1*	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	71,4(5/7)	0 (0/7)	0 (0/7)	28,6 (2/7)

A morfologia estereomicroscópica associada aos diferentes grupos e embriões colocados em criotubo diretamente na estufa são apresentadas na Fig. 5. Os grupos 15°C, 32°C, 15°C-ET e 32°C-ET foram avaliados no primeiro momento (M0) e após 24h de acondicionamento (M1), e o grupo ET no momento inicial (M0) e após 2h submetido ao estresse térmico em estufa à 50°C (M1). Em ambos os grupos acondicionados a 32°C houve crescimento dos embriões, e é possível notar em alguns (Fig. 4. 32°C embriões 3, 4 e 6 no M1, 32°C-ET embriões 2, 3, 4, 5 e 6) irregularidade em textura maior que 50% e escurecimento das células do trofoblasto após as 24h. No grupo 15°C nota-se alteração de textura dos blastômeros no embrião 7 após as 24h. Entretanto, no grupo 15°C-ET a maioria dos embriões manteve suas características morfológicas, sem alterações perceptíveis. Os embriões sujeitos diretamente ao estresse térmico (grupo ET) apresentaram mudanças notáveis em sua qualidade morfológica, textura e cor.

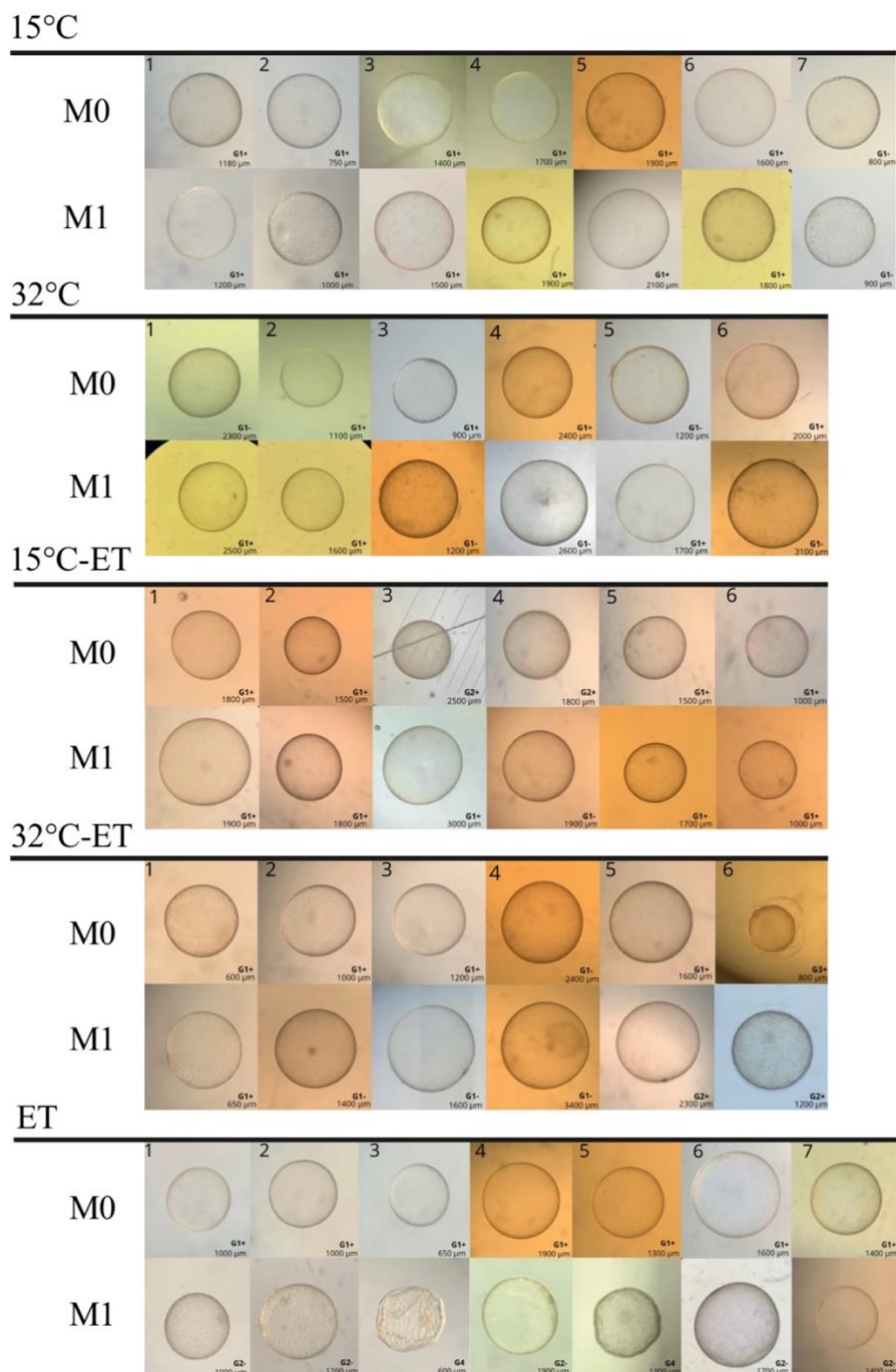


Fig. 5. Avaliação estereomicroscópica das características morfológicas de embriões equinos em diferentes sistemas de acondicionamento para transporte submetidos (15°C-ET e 32°C-ET) ou não (15°C e 32°C) à estresse térmico em estufa à 50°C, e embriões colocados em criotubo diretamente na estufa à 50°C. Avaliações foram feitas após a coleta de embriões 8 dias após ovulação (M0) e após 24h de acondicionamento nos sistemas e 2h após estresse me estufa para o grupo ET (M1). Tamanho dos embriões (µm) e grau de qualidade morfológica (G1+, G1-, G2+, G2-, G3+, G3- ou G4) são indicados.

3.3 TBARS

A mediana comparativa entre os grupos quanto a produção de EROs está representada na Fig.6, PELA reação do malonaldeído ao ácido tiobarbitúrico expresso em ng/mL.

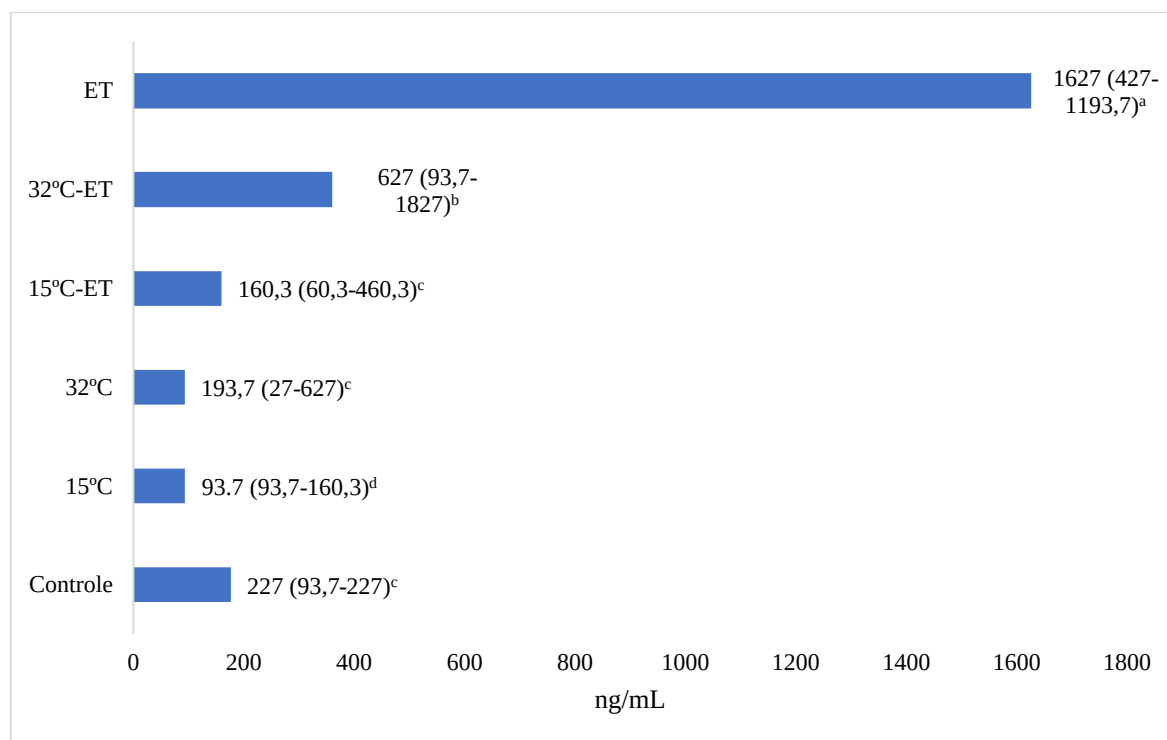


Fig. 6. Mediana comparativa entre os grupos 15°C, 32°C, 15°C-ET, 32°C-ET quanto a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) utilizando a reação do melonaldeído ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, ng/mL). As letras indicam as diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos (a, b, c, d, e).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível observar que a curva de temperatura dos sistemas de transporte em caixas isotérmicas, utilizados atualmente à campo, sofrem interferência de extremos climáticos externos. As caixas isotérmicas possuem um sistema de resfriamento passivo, apresentando inconsistência na curva de temperatura pela dependência da temperatura inicial, barreiras de calor, massa da amostra utilizada, isolamento externo e temperatura ambiente [39]. A temperatura de 50°C por 2h, se apresentou compatível à alcançada dentro de carros sob condições ambientais condizentes com a do mundo [4,13], e promoveu aumento significativo das temperaturas internas das caixas quando comparado com as mantidas em temperatura ambiente, demonstrando que, mesmo sendo de fácil acesso e baixo custo, este sistema apresenta eficácia limitada na manutenção da

temperatura interna desejada.

A curva de refrigeração à 15°C e acondicionamento do embrião ocorreram como o descrita na literatura nos sistemas de transporte seminal [39-40]. Entretanto, o controle de temperatura interno na caixa isotérmica e o transporte de embriões equinos de 8-9 dias produzidos *in vivo* mantidos à 32°C não foi aferido anteriormente, mas foi baseado em estudos de transporte de embriões bovinos e equinos produzidos *in vitro*, em sistemas ativos à 37°C fornecendo curva adequada de temperatura [41-43]. A variação média da temperatura durante as 24h de acondicionamento foi apenas de 4°C, e a curva de temperatura para o grupo 32°C foi a mais homogênea entre os grupos testados.

No sistema de acondicionamento à 15°C, o estresse térmico promoveu aumento da temperatura interna da caixa, porém a curva de refrigeração foi retomada e as temperaturas se igualaram às dos sistemas não submetidos ao estresse térmico, a partir da hora 12. Em contrapartida, no sistema de acondicionamento à 32°C, o estresse térmico em estufa levou ao aumento da temperatura interna da caixa que se manteve acima do observado no grupo não colocado em estufa, durante as 24h. Considerando que as curvas esperadas e desejadas sejam obtidas pelos sistemas de 15°C e 32°C, não submetidos ao estresse térmico, ou seja, em condições de temperatura ambiente avaliada neste estudo, a refrigeração à 15°C se mostrou mais eficiente na manutenção da temperatura interna esperada em caixa isotérmica, em comparação a do sistema à 32°C. Avanzi et al. [32] testaram a curva de temperatura para transporte seminal em caixa isotérmica (Botuflex®, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil) à 5°C colocada em estufa à 40°C por 24h, e relataram interferência na temperatura interna da caixa atingindo somente 15°C com diminuição da viabilidade seminal a partir das 12h de acondicionamento.

A manutenção do embrião em criotubo colocado diretamente na estufa à 50°C por 2h visou demonstrar tanto o efeito protetor da caixa isotérmica, quanto o risco de deixar o embrião sem acondicionamento prévio em ambientes fechados, como carros durante condições compatíveis com a estação de monta no verão [4]. A temperatura do embrião subiu consideravelmente ultrapassando temperaturas consideradas normais para a espécie equina (38,5°C) [38], variando entre 41,2 e 46,6°C, temperaturas estas acima das atingidas na hipertermia.

Considerando o impacto das diferentes temperaturas no tamanho e taxa de crescimento dos embriões, houve homogeneidade entre todos os embriões antes de serem submetidos aos sistemas de transporte. Entretanto, após as 24h a taxa de crescimento diferiu entre os grupos. O fato dos embriões resfriados menores pode ser justificado por

não avancem em seus estágios de desenvolvimento em temperaturas baixas [6,9]. Estudos relatam que embriões refrigerados sofrem mudanças morfológicas significativas como colapso da blastocela com separação da cápsula embrionária, recuo de áreas isoladas de células do trofoblasto, blastômeros extrusados, aumento da aparência granular de superfície e escurecimento celular [9], também apresentaram aumento de células mortas após 6h de transporte refrigerado [2] e alterações epigenéticas [10].

A taxa de crescimento dos embriões transportados à 15°C foi intermediária quando comparados aos submetidos à altas temperaturas sem acondicionamento prévio e os transportados à 32°C, sob estresse térmico ou não. É importante ressaltar que os embriões colocados diretamente na estufa em criotubo, foram mantidos por 2h e avaliados, levando a um menor desenvolvimento embrionário em comparação aos outros grupos que foram avaliados 24h após sistema de transporte.

Os embriões acondicionados à 32°C apresentaram maior taxa de crescimento, independente do grupo, e este dado vai em conformidade com outro estudo mostrando que embriões acondicionados à 25°C apresentaram um aumento médio de 25,9% de diâmetro em 24h, contraposto à uma diminuição média de -4,3% em embriões refrigerados [11]. Um estudo recente demonstrou que embriões de 7 e 8 dias acondicionados à 20°C apresentaram expressão de genes associados ao desenvolvimento embrionário semelhante aos expressos em embriões no útero, sugerindo efeitos benéficos do transporte em sistemas com temperaturas condizentes com as ambientais [10].

O método de análise de qualidade embrionária de eleição à campo é subjetivo, usando esteriomicroscopia, buscando avaliar tamanho, textura e coloração dos embriões [34]. Porém, visando detectar alterações que possam passar despercebidas as classificações convencionais, foi recomendada uma avaliação mais detalhada da qualidade morfológica embrionária. Pelas imagens nota-se mudança leve, moderada ou severa de textura nos embriões após transporte, a qual deve ser melhor identificada quanto ao que representa à qualidade embrionária. As alterações significativas na morfologia embrionária, levando a classificações que indicam baixas taxas gestacionais após transferência (qualidade regular e pobre) [34], foram observadas nos embriões submetidos diretamente ao estresse térmico, não nos acondicionados.

Embora poucas alterações morfológicas foram identificadas nos embriões mantidos nos sistemas de transporte à 15°C ou 32°C, sob estresse térmico ou não, as leves alterações precisam de mais estudos quanto a seu impacto na viabilidade embrionária. Esta discussão é fortalecida pelos achados na avaliação do estresse oxidativo dos

embriões.

A produção de EROs foi maior nos embriões dos grupos nos embriões submetidos ao estresse térmico direto na estufa, o que se assemelha ao encontrado em embriões de outras espécies em resposta a altas temperaturas. Aumento da produção de EROs na tuba uterina e embriões submetidos a altas temperaturas (35°C) seguido por diminuição do desenvolvimento embrionário, em ratos [46,47]. O aumento de EROs pode levar ao seu acúmulo nos embriões em desenvolvimento, e a um aumento de apoptose celular, alterações genicas e pode acarretar injúrias graves ao embrião [48, 49].

Considerando que o grupo controle representou a resposta oxidativa esperada para os embriões de 8 ou 9 dias produzidos *in vivo*, os grupos 32°C e 15°C-ET apresentaram produção de EROs semelhante ao grupo controle. Porém, o grupo 15°C foi significativamente menor em sua resposta oxidativa em comparação aos outros, o que pode ser relacionado a diminuição do metabolismo embrionário celular em baixas temperaturas [9], ou devido a lesões causadas pela refrigeração. Embriões acondicionados à 5°C por 24h apresentaram maior porcentagem de células mortas, marcadas por DAPI e aumento de apoptose celular, avaliado por TUNEL [50, 51], indicando que o transporte em baixas temperaturas influencia de forma negativa a qualidade embrionária e a taxa de prenhez [9,12].

Em contrapartida, o grupo 32°C-ET apresentou alta produção de EROs, sendo menor apenas que o grupo ET evidenciando que o embrião submetido ao sistema de transporte em caixa isotérmica sofre com o aumento de temperatura externa, que mostra não ser um sistema seguro para transporte de embriões. Os produtos tóxicos provenientes do aumento da resposta oxidativa causam injúrias celulares, modificando proteínas, carboidratos e outros, influenciando diretamente a integridade e função celular, como vias de sinalização e integridade gênica [52,53].

A escolha por testar o sistema à 32°C neste estudo foi baseada na temperatura mais próxima à encontrada na égua [38] e aos estudos de reaquecimento e transporte após vitrificação de embriões equinos [44, 45]. No entanto, por manter o metabolismo mais elevado que em baixas temperaturas, é necessário considerar o meio em que os embriões serão mantidos, para que sejam capazes de sustentar as necessidades do embrião. Neste estudo foi utilizado o meio de manutenção utilizado à campo com o intuito de avaliar as condições disponíveis na rotina do médico veterinário. Nos estudos citados que avaliaram as temperaturas mais elevadas (20 e 25°C), os meios utilizados também foram meios de manutenção (“holding”) comercialmente disponíveis e não dependentes de ambientes

controlados. Já os embriões equinos produzidos *in vitro* foram transportados em Equitainer com os equipamentos internos aquecidos à 38,2°C em meio base não dependente de CO₂ (DMEN/F-12 com 20% de FBS) [45]. Demonstrando que os meios de manutenção comerciais podem ser utilizados nos sistemas de transporte de embriões equinos.

Os embriões do grupo 32°C apresentaram produção de EROs igual ao do grupo controle aparentando ser uma temperatura adequada para transporte de embriões equinos, quando a caixa isotérmica não é submetida a altas temperaturas. Porém, quando o sistema for submetido ao estresse térmico o transporte a 15°C (grupo 15°C-ET) pode ser mais adequado.

Os resultados encontrados estão de acordo com outros estudos, que demonstraram efeitos benéficos do transporte de embriões equinos à 20°C [10], e aumento da taxa de crescimento e grau de qualidade de embriões acondicionados à 25°C por 24h [11], indicando melhor crescimento, desenvolvimento e qualidade dos embriões transportados a temperaturas condizentes com as ambientais. Entretanto, com o aumento da temperatura média global e os extremos climáticos ao longo do dia [4] são necessários mais estudos preconizando sistemas confiáveis para transporte seguro dos embriões, que não sofram interferência dos aumentos de temperatura.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que o sistema de acondicionamento para transporte à 15°C mostrou ser melhor quando submetido a altas temperaturas, por promover retorno esperado da curva de temperatura. Enquanto o sistema à 32°C, quando não submetido a altas temperaturas, demonstrou ser mais seguro mantendo a homogeneidade da curva de temperatura ao longo das 24h de transporte. Os dois grupos apresentaram produção EROs semelhantes ao grupo controle e o aumento na taxa de crescimento embrionária durante as 24h de transporte. O estresse térmico em embriões não acondicionados em caixa isotérmica levou a temperaturas acima da corporal, à uma resposta oxidativa elevada e degeneração embrionária em apenas 2h em estufa à 50°C, revelando a importância de um sistema de acondicionamento próprio para os embriões equinos produzidos a campo, associado com variações climáticas atuais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES), Brasil (código de financiamento 001).

Esta pesquisa utilizou instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). A equipe da instalação Espectometria e Espalhamento é reconhecida pela assistência durante o experimento (número das propostas).

CONFLITO DE INTERESSES

Nada a declarar.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Giulia Vignoli: Writing – original draft, Methodology, Data curation. Giovana Siqueira Camargo: Methodology, Formal analysis. Karina Resente Assoni: Methodology, Formal analysis, Data curation. Giovana Nannini: Methodology, Formal analysis. Beatriz Lippe de Camilo: Data curation. Fabiana Ferreira de Souza: Methodology, Formal analysis, Data curation. Gabriel Augusto Monteiro: Methodology. Fernanda Saules Ignácio: Writing – review & edition, Writing- original draft, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation.

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.cbpa.org.br/portal/publicacoes/rbra/2010/rbrajm2010.html>
- [4] Menegassi SRO, Lopes LFD, Morais H, Alencar, AP, Lopes FG, Barca Junior FA. Climate 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 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C 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 Meteorol 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.org/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](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 5°C 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, Meyer 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-Ispuerto I, L'pez-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C, López-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-Ispuerto 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, Takahashi 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](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.org/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.org/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.anireprosci.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](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30643-0)
- [35] Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. *Protein Methods*, 1996. John Wiley & Sons, New York.
- [36] Peach M, Marsh N, Macphée 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>
- [37] McKinnon AO, Squires EL. Morphologic assessment of the equine embryo. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:401-6. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30643-0](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](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: McKinnon 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](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, Hinrichs K. Vitrification of in vitro-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 redox status in the 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](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](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. *World Allergy Organ J* 2012;5(1):9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>