

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 07/05/2026.

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

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE TECIDO TESTICULAR
DE CARNEIROS SUBMETIDOS A INSULAÇÃO ESCROTAL**

PAULA ZANIN RATTES

Botucatu, SP
Novembro – 2025

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

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE TECIDO TESTICULAR
DE CARNEIROS SUBMETIDOS A INSULAÇÃO ESCROTAL**

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

Paula Zanin Rattes
Orientador: Prof. Dr. João Carlos
Pinheiro Ferreira

Botucatu, SP
Novembro – 2025

R237a	Rattes, Paula Zanin Avaliação do perfil proteico de tecido testicular de carneiros submetidos a insulação escrotal / Paula Zanin Rattes. -- Botucatu, 2025 64 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira 1. Estresse térmico testicular. 2. Insulação escrotal. 3. Proteoma. I. Título.
-------	---

Nome do autor (a): Paula Zanin Rattes

Título: AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DE TECIDO TESTICULAR DE CARNEIROS SUBMETIDOS A INSULAÇÃO ESCROTAL

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

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

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro Titular

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

Profa. Dra. Thaisy Tino Dellaqua

Membro Titular

Laboratório de produção in vitro de embriões, CEO Genetics – Reprodução Animal
São Manuel/SP

Data da defesa: 07 de Novembro de 2025.

DEDICO,

À Deus, por toda luz para seguir meu caminho sempre com discernimento, a todos os meus familiares, em especial à minha mãe Silvana, avó Irma, e padrinho Carlos, que se fazem presente mesmo que em outro plano, e são meus exemplos de força, garra e determinação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a todos os espíritos de luz por ter me guiado em toda a minha caminhada pessoal e profissional, sempre me iluminando para que eu escolhesse o melhor caminho, com discernimento. Em seguida, agradeço aos meus anjos que me acompanham em todos os meus passos através da presença espiritual, minha mãe Silvana, a quem eu sigo como exemplo de garra, força e determinação, minha vó Irma, meu padrinho Carlos e minha tia Celi. Agradeço profundamente a toda à minha família, que sempre me incentivou e me apoiou para que eu seguisse meus sonhos e que também me proporcionou uma excelente educação, com muito amor, meu pai Paulo Roberto, minha irmã Júlia, meu cunhado Nicolas, minha afilhada Helena e meu sobrinho Pedro, aos meus avós paternos Paulo e Cleuza, avós maternos José e Irma, aos meus tios e tias, Susana, Luiz, Silmara, Roni, Renato, Celi, meus padrinhos Carlos e Edilene, e aos meus primos Laura, Felipe, Caio, Bruna e Victor.

Agradeço também ao meu namorado Pedro, por sempre me incentivar, me acompanhar nos momentos mais felizes e os mais desafiadores da minha caminhada, sempre proporcionando tudo para que a nossa família evolua cada vez mais. E aos meus filhos de quatro patas que são a minha felicidade, meu porto seguro, Vick, Luna, Bartô, Romeu, Julieta, Nina e meu anjinho Vitor.

Agradeço também a todos os meus colegas e amigos, que estiveram ao meu lado durante toda essa jornada da pós-graduação e com certeza, serão amigos que levarei para a vida. Aos colegas que auxiliaram durante o período experimental, gratidão a todos. Aos animais que participaram do experimento, que nos proporcionaram diversos conhecimentos, aprendizados e muito afeto.

À minha faculdade, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” que me proporcionou excelentes profissionais e um ótimo ambiente de estudo. A todos os funcionários, administradores, coordenadores e diretores, além de professores que transmitiram seu conhecimento e nos serviram de inspiração. Em especial à Professora Fabiana Ferreira de Souza pelo apoio e carinho nos momentos difíceis, por tanto conhecimento compartilhado e por ter me proporcionado um espaço em seu laboratório para que eu pudesse fazer

diversos tipos de análises, um dos momentos mais prazerosos da pós e que mais aprendi.

Ao meu orientador, Prof. João Carlos Pinheiro Ferreira, a quem eu serei eternamente grata, que foi um grande incentivador, em todos os meus projetos, desde minha primeira iniciação científica, e um grande amigo que me apoiou e não desistiu de mim, mesmo com todos os percalços que surgiram durante o período da pós.

Adicionalmente, agradeço às Agências de Fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Aqueles que contemplam a beleza da Terra encontram reservas de força que durarão enquanto a vida existir. Há algo infinitamente curativo nos refrões repetidos da natureza — a certeza de que o amanhecer vem após a noite, e a primavera após o inverno.”

Rachel Carson

RESUMO

RATTES, P.Z. AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE TECIDO TESTICULAR DE CARNEIROS SUBMETIDOS A INSULAÇÃO ESCROTAL. Botucatu – SP. 2025. 64p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Mamíferos necessitam manter a temperatura testicular entre 3 °C e 5 °C abaixo da corporal para que a espermatogênese ocorra de maneira eficiente. O estresse térmico compromete esse equilíbrio, provocando alterações moleculares que podem levar à infertilidade em machos. Este estudo avaliou as modificações no proteoma testicular de ovinos por 14 dias após insulação escrotal aguda (24 ou 48 horas). Foram utilizados 25 carneiros (Santa Inês × Dorper) reprodutivamente aptos, distribuídos em cinco grupos experimentais. O grupo controle foi castrado sem exposição ao estresse térmico, enquanto os demais grupos foram castrados 24 horas (24h), 48 horas (48h), 7 dias (7d) e 14 dias (14d) após o início da insulação escrotal de 48 horas. A orquiectomia semiaberta foi realizada com anestesia e analgesia adequadas, seguida de isolamento, fragmentação, processamento e análise dos testículos por espectrometria de massa. A análise estatística foi conduzida no MetaboAnalyst 6.0, utilizando o teste t de Student para comparação entre os grupos tratados e o controle, considerando significativas diferenças com FDR < 0,05. A análise multivariada incluiu análise de componentes principais (PCA) para identificar padrões de agrupamento e proteínas discriminantes. Proteínas com Log2FC > 1,5 e FDR < 0,05 foram consideradas diferencialmente abundantes. Os resultados foram representados por *heatmaps* (10 proteínas de maior variância) e volcano plots, e a interseção proteica entre grupos foi avaliada com diagramas de Venn. O estresse térmico testicular induziu alterações progressivas no proteoma testicular dos ovinos. Nos períodos iniciais (24h e 48h), as mudanças foram discretas, com poucas proteínas diferencialmente expressas (1–4) e sem separação clara entre os perfis globais, indicando sobreposição parcial entre os grupos. A análise funcional revelou ativação precoce de mecanismos antioxidantes e metabólicos, envolvendo PRDX2, PRDX4 e PGK1, bem como processos iniciais de resposta ao estresse e inflamação. Aos 7 dias, surgiram tendências de agrupamento e modulações em proteínas associadas à homeostase redox, chaperonas e remodelação nuclear, destacando-se HSPA1L, PRDX4, RPRD1A e H3F3A, refletindo impactos sobre reprodução, diferenciação sexual e maturação dos gametas. Aos 14 dias, as alterações se consolidaram, com separação clara dos perfis proteômicos e enriquecimento funcional em atividades catalíticas, ligação a nucleotídeos, reorganização do citoesqueleto e remodelação nuclear. Proteínas-chave incluíram HSPB1, PRDX4, PGK1, TUBA1B, TUBA8 e RPRD1A. Os resultados indicam que o estresse térmico provoca efeitos cumulativos, persistentes e progressivos na homeostase testicular, afetando mecanismos antioxidantes, reparo proteico, organização estrutural e, potencialmente, a função reprodutiva em ovinos.

Palavras-chave: estresse térmico; proteoma; testículo

ABSTRACT

RATTES, P.Z. **PROTEOMIC PROFILING OF TESTICULAR TISSUE IN RAMS SUBJECTED TO SCROTAL INSULATION**. Botucatu – SP. 2025. 64p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Mammals must maintain testicular temperature approximately 3–5 °C below core body temperature to ensure efficient spermatogenesis. Thermal stress disrupts this balance, triggering molecular alterations that may lead to male infertility. This study evaluated changes in the testicular proteome of sheep over 14 days following acute scrotal insulation (24 or 48 hours). A total of 25 reproductively sound rams (Santa Inês × Dorper) were allocated into five experimental groups. The control group was castrated without exposure to heat stress, whereas the remaining groups were orchiectomized at 24 hours (24h), 48 hours (48h), 7 days (7d), and 14 days (14d) after the initiation of a 48-hour scrotal insulation period. Semi-open orchiectomy was performed under appropriate anesthesia and analgesia, followed by tissue isolation, fragmentation, processing, and mass spectrometry-based proteomic analysis. Statistical analyses were conducted using MetaboAnalyst 6.0. Student's t-test was applied to compare treated groups to the control, with differences considered significant at FDR < 0.05. Multivariate analysis included Principal Component Analysis (PCA) to identify clustering patterns and discriminant proteins. Proteins with Log2FC > 1.5 and FDR < 0.05 were classified as differentially abundant. Results were visualized using heatmaps (top 10 proteins with highest variance) and volcano plots, and proteomic overlap among groups was assessed using Venn diagrams. Testicular heat stress induced progressive alterations in the testicular proteome. In the early periods (24h and 48h), changes were subtle, with few differentially expressed proteins (1–4) and no clear separation between global proteomic profiles, indicating partial overlap among groups. Functional analysis revealed early activation of antioxidant and metabolic responses, involving PRDX2, PRDX4, and PGK1, as well as initial stress-response and inflammatory processes. At 7 days, clustering tendencies emerged alongside modulation of proteins associated with redox homeostasis, chaperone activity, and nuclear remodeling, including HSPA1L, PRDX4, RPRD1A, and H3F3A, reflecting effects on reproduction, sexual differentiation, and gamete maturation. By 14 days, these alterations were consolidated, with clear separation of proteomic profiles and enrichment of functions related to catalytic activity, nucleotide binding, cytoskeletal reorganization, and nuclear remodeling. Key proteins included HSPB1, PRDX4, PGK1, TUBA1B, TUBA8, and RPRD1A. Overall, the findings indicate that thermal stress elicits cumulative, persistent, and progressive disturbances in testicular homeostasis, affecting antioxidant defense systems, protein repair mechanisms, structural organization, and potentially reproductive function in sheep.

Keywords: thermal stress; proteome; testis

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Anatomia e fisiologia testicular	3
2.2. Termorregulação	4
2.3. Estresse térmico testicular	5
2.3.1. Modelos experimentais para indução de estresse térmico	5
2.3.2. Respostas moleculares ao estresse térmico	7
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS	9
3.1. Hipótese(s)	9
3.2. Objetivo	10
4. REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 2	1
ARTIGO CIENTÍFICO	16
Resumo	17
1. Introdução	18
2. Material e métodos	19
2.1. <i>Design experimental</i>	19
2.3. <i>Temperatura e monitoramento térmico</i>	21
2.4. <i>Orquiectomia</i>	21
2.5. <i>Análise do perfil proteico testicular</i>	22
3. RESULTADOS	25
4. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÃO	57
AGRADECIMENTOS	57
CONFLITO DE INTERESSES	57
REFERÊNCIAS	57

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os ruminantes desempenham um papel relevante na economia brasileira, contribuindo diretamente e indiretamente para a geração de empregos, além da produção de alimentos, couro, fibras, lã e seus subprodutos. Embora em menor número, os pequenos ruminantes, como ovinos e caprinos, também são importantes fonte de renda e uma alternativa para produção de proteína, não sendo menos relevantes que os bovinos.

A ovinocultura tem se expandido progressivamente no Brasil. Em 2023, o rebanho ovino brasileiro apresentou um crescimento de 1,26% em relação ao efetivo registrado em 2022. O estado da Bahia lidera o ranking nacional, com aproximadamente 4 milhões de cabeças, seguido por Pernambuco e Rio Grande do Sul, que possuem, em média, 3 milhões de ovinos cada estado (1). Esse avanço reforça a crescente relevância da espécie dentro dos sistemas produtivos nacionais, especialmente em regiões onde a atividade se adapta bem às condições climáticas e ao perfil socioeconômico dos produtores.

Apesar da crescente produção, as mudanças climáticas têm se mostrado um fator relevante na redução de índices de produção de pequenos ruminantes (2). Estudos demonstram que temperaturas elevadas afetam diretamente o desempenho reprodutivo desses animais, especialmente de carneiros (3), além de comprometerem seu bem-estar, o que, diminui a produtividade e consequentemente, prejuízos econômicos. Nesse contexto, torna-se essencial compreender os mecanismos fisiológicos relacionados à resposta ao estresse térmico, de modo a subsidiar estratégias de manejo e mitigação adequadas em ambientes de maior desafio térmico.

Os ovinos são animais homeotérmicos, ou seja, capazes de manter sua temperatura corporal estável frente as variações da temperatura ambiente pela produção e/ou perda de calor. O intervalo crítico de termoneutralidade para a espécie varia entre 12 °C e 32 °C (4). Quando o limite é ultrapassado, especialmente acima dos 35 °C, há comprometimento da termorregulação, levando à ativação de mecanismos fisiológicos compensatórios. Nessa condição, destacam-se o aumento da frequência respiratória, principal forma de termorregulação nos ovinos, a redução da ingestão voluntária de alimentos e o aumento da sudorese. No entanto, os ovinos apresentam um déficit de glândulas sudoríparas, o que torna a sudorese uma estratégia ineficiente da regulação

térmica (5,6). Essa susceptibilidade sistêmica reflete-se de maneira marcante no aparelho reprodutivo masculino.

Os testículos, ou gônadas masculinas, localizam-se externamente à cavidade abdominal, o que os torna mais susceptíveis ao estresse térmico ambiental. Estão alojados dentro do escroto, uma estrutura pendular responsável pela termorregulação testicular. Essa característica permite que os testículos mantenham uma temperatura aproximadamente 4 °C inferior à temperatura corporal, fenômeno indispensável para o adequado desempenho de suas funções fisiológicas (7). Quando essa diferença térmica é reduzida, mesmo que transitoriamente, ocorre um desequilíbrio homeostático com repercussões imediatas e progressivas no tecido testicular.

Quando ocorre o aumento da temperatura testicular, o estresse térmico provoca alterações significativas no perfil proteico tecidual, células germinativas e nos espermatozoides, influenciando diretamente a espermatogênese e a qualidade espermática. Em bovinos, estudos demonstram que a expressão de proteínas da família *heat shock proteins* (HSPs), incluindo HSP70 e HSP90, é modulada em resposta à hipertermia, atuando na manutenção da integridade proteica e na proteção contra o estresse oxidativo (8,9). Além disso, foram identificadas alterações em proteínas envolvidas na motilidade e na integridade da membrana espermática, evidenciando a sensibilidade das células germinativas à elevação da temperatura testicular. Em ovinos, observa-se uma mudança no perfil de proteínas antioxidantes, metabólicas e estruturais, incluindo HSPs, indicando que a hipertermia induz adaptações moleculares complexas no tecido testicular e no plasma seminal (10,11). Esse conjunto de evidências demonstra que a resposta ao estresse térmico é profundamente determinada por mecanismos proteômicos adaptativos.

Portanto, as abordagens proteômicas fornecem informações valiosas sobre os mecanismos de defesa molecular dos testículos frente ao estresse térmico, revelando potenciais alvos para estratégias de mitigação, como o manejo ambiental, a suplementação com antioxidantes ou a seleção genética para resistência ao calor.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações no proteoma testicular de ovinos induzidas por insulação escrotal aguda (24 ou 48 horas), durante os primeiros 14 dias após o estímulo térmico.

4. REFERÊNCIAS¹

1. Aragão Magalhães K, Caprinos ovinos e. pesquisa da Pecuária Municipal 2023: rebanhos de caprinos e ovinos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa; 2024. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos>
2. Al-Dawood A. towards heat stress management in small ruminants: a review. *Annals of Animal Science*. 2017;17(1):59–88.
3. El-Zeftawy M, Mahmoud GB, Hassan M. Impact of thermal stress exposure on seminal quality, antioxidant defence system, TNF- α and TIMP-3 in Ossimi ram. *Reproduction in Domestic Animals*. 2020;55(7):870–881.
4. da Costa Baêta F, de Fátima Souza C. Ambiência em edificações rurais: conforto animal. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1997. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=S5SQAAAACAAJ>
5. McManus CM, Faria DA, Lucci CM, Louvandini H, Pereira SA, Paiva SR. Heat stress effects on sheep: Are hair sheep more heat resistant? *Theriogenology*. 2020;155:157–167.
6. Titto CG, Veríssimo CJ, Pereira AMF, Geraldo A de M, Katiki LM, Titto EAL. Thermoregulatory response in hair sheep and shorn wool sheep. *Small Ruminant Research*. 2016;144:341–345.
7. Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH. Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 1997;13(2):271–282.
8. de Freitas AC, Reolon HG, Abduch NG, Baldi F, Silva RMO, Lourenco D, et al. Proteomic identification of potential biomarkers for heat tolerance in Caracu beef cattle using high and low thermotolerant groups. *BMC Genomics*. 2024;25(1)
9. Liu S, Liu Y, Bao E, Tang S. The protective role of heat shock proteins against stresses in animal breeding. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(15).
10. Song Y, Zhao X, Aihemaiti A, Haire A, Gao Y, Niu C, et al. The mechanism of heat stress resistance during spermatogenesis in Turpan Black Sheep. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022;9.

¹ Referências organizadas de acordo com as regras de Vancouver

- 1 11.Viana Neto AM. Parâmetros seminais e proteoma do plasma seminal de
2 carneiros Morada Nova submetidos a insulação escrotal intermitente.
3 Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2018.
- 4 12.König HE, Liebich H-G. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas
5 colorido. 7ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed; 2021. 854 p.
- 6 13.Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. 3rd ed. Pullman,
7 Washington: Current Conceptions, Inc.; 2015. 381 p.
- 8 14.Neill JD, editor. Knobil and Neill's physiology of reproduction. 3rd ed.
9 Amsterdam: Elsevier; 2006.
- 10 15.Cardoso FM, Queiroz GF. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium
11 and daily sperm production of Brazilian hairy rams. *Animal Reproduction*
12 *Science*. 1988;17(1–2):77–84.
- 13 16.Kolasa A, Misiakiewicz K, Marchlewicz M, Wiszniewska B. The generation of
14 spermatogonial stem cells and spermatogonia in mammals. *Reproductive*
15 *Biology*. 2012;12(1):5–23.
- 16 17.Mrowka R, Reuter S. Thermoregulation. *Acta Physiologica*. 2016;217(1):3–5.
- 17 18.Nagashima K. Central mechanisms for thermoregulation in a hot environment.
18 *Industrial Health*. 2006;44(3):359–67.
- 19 19.Mota-Rojas D, Titto CG, Orihuela A, Martínez-Burnes J, Gómez-Prado J,
20 Torres-Bernal F, et al. Physiological and behavioral mechanisms of
21 thermoregulation in mammals. *Animals*. 2021;11(6):1730.
- 22 20.Cunningham JG, Klein BG. Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology.
23 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders; 2013. 608 p.
- 24 21.Silverthorn DU. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. Porto Alegre,
25 RS: Artmed; 2010. 957 p.
- 26 22.Capela LG, Leites IC, Mateus LM, Romão RP, Pereira RMLN, Lopes-da-
27 Costa L. Effects of seasonal chronic heat stress on body thermoregulation,
28 cortisol release and uterine health in postpartum native Alentejana and
29 Mertolenga beef cattle. *BMC Veterinary Research*. 2025;21:404.
- 30 23.Wang J, Li J, Wang F, Xiao J, Wang Y, Yang H, et al. Heat stress on calves
31 and heifers: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*.
32 2020;11:79.
- 33 24.Kastelic JP, Coulter GH, Cook RB. Scrotal, surface, subcutaneous,
34 intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. *Theriogenology*.
35 1995;44(2):147–152.

- 1 25. Noordhuizen-Stassen EN, Charbon GA, de Jong FH, Wensing CJG.
2 Functional arterio-venous anastomoses between the testicular artery and the
3 pampiniform plexus in the spermatic cord of rams. *Journal of Reproduction*
4 *and Fertility*. 1985;75(1):193–201. doi:10.1530/jrf.0.0750193
- 5 26. Teixeira MB, Ferreira JCP, Codognoto VM, Rossi ES, Pupulim AGR, de
6 Carvalho JC, et al. Heat stress induced by testicular insulation for 24 or 48 h
7 rapidly impairs epididymal sperm quality and reduces spermatogenesis in
8 rams. *Small Ruminant Research*. 2025;243:107443.
- 9 27. Robinson BR, Netherton JK, Ogle RA, Baker MA. Testicular heat stress, a
10 historical perspective and two postulates for why male germ cells are heat
11 sensitive. *Biological Reviews*. 2023;98(2):603–622.
- 12 28. Menegassi SRO, Pereira GR, Dias EA, Rocha MK, Carvalho HR, Koetz C, et
13 al. Infrared thermography as a noninvasive method to assess scrotal
14 insulation on sperm production in beef bulls. *Andrologia*. 2018;50(3):e12904.
- 15 29. Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH, Saacke RG. Insulating the scrotal neck
16 affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull.
17 *Theriogenology*. 1996;45(5):935–942.
- 18 30. Newton LD, Kastelic JP, Wong B, Van Der Hoorn F, Thundathil J. Elevated
19 testicular temperature modulates expression patterns of sperm proteins in
20 Holstein bulls. *Molecular Reproduction and Development*. 2009;76(1):109–
21 118.
- 22 31. Rahmani M, Tavalaei M, Drevet JR, Nasr-Esfahani MH. Role of endoplasmic
23 reticulum stress in the male reproductive system. *Cell Journal*.
24 2023;25(7):437–446.
- 25 32. Pereira GR, de Lazari FL, Dalberto PF, Bizarro CV, Sontag ER, Koetz Junior
26 C, et al. Effect of scrotal insulation on sperm quality and seminal plasma
27 proteome of Brangus bulls. *Theriogenology*. 2020;144:194–203.
- 28 33. Brito LFC, Silva AEDF, Barbosa RT, Unanian MM, Kastelic JP. Effects of
29 scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular
30 echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls. *Animal*
31 *Reproduction Science*. 2003;79(1–2):1–15.
- 32 34. Rizzoto G, Ferreira JCP, Codognoto VM, Oliveira KC, Mogollón García HD,
33 Pupulim AGR, et al. Testicular hyperthermia reduces testosterone
34 concentrations and alters gene expression in testes of Nelore bulls.
35 *Theriogenology*. 2020;152:64–68.
- 36 35. Alves MBR, Andrade AFC de, Arruda RP de, Batissaco L, Florez-Rodriguez
37 SA, Oliveira BMM de, et al. Recovery of normal testicular temperature after
38 scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects
39 on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration.
40 *Theriogenology*. 2016;86(3):795–805.e2.

- 1 36. Fan X, Xi H, Zhang Z, Liang Y, Li Q, He J. Germ cell apoptosis and expression
2 of Bcl-2 and Bax in porcine testis under normal and heat stress conditions.
3 *Acta Histochemica*. 2017;119(3):198–204.
- 4 37. El-Sheikh AS, Casida LE. Motility and fertility of spermatozoa as affected by
5 increased ambient temperature. *Journal of Animal Science*. 1955;14(4):1146–
6 1150.
- 7 38. Li Z, Li Y, Zhou X, Dai P, Li C. Autophagy involved in the activation of the
8 Nrf2-antioxidant system in testes of heat-exposed mice. *Journal of Thermal*
9 *Biology*. 2018;71:142–152.
- 10 39. Hasani A, Khosravi A, Rahimi K, Afshar A, Fadaei-Fathabadi F, Raoofi A, et
11 al. Photobiomodulation restores spermatogenesis in transient scrotal
12 hyperthermia-induced mice. *Life Sciences*. 2020;254:117790.
- 13 40. Khosravi A, Hasani A, Behnam P, Piryaee A, Pirani M, Aliaghaei A, et al. An
14 effective method for establishing animal models of azoospermia and
15 oligospermia. *Andrologia*. 2021;53(7):e14101.
- 16 41. Rizzoto G, Boe-Hansen G, Klein C, Thundathil JC, Kastelic JP. Acute mild
17 heat stress alters gene expression in testes and reduces sperm quality in
18 mice. *Theriogenology*. 2020;158:375–381.
- 19 42. Braga Emidio N, Girardi Carpanez A, Ramos Quellis L, Silva Farani P, Gomes
20 Vasconcelos E, Faria-Pinto P. Proteômica: uma introdução aos métodos e
21 aplicações. *HU Revista*. 2015;41(3–4):101–111. Disponível em:
22 <http://www.piercenet.com/method/sample-preparation-mass-spectrometry>
- 23 43. Barbosa EBV, Polachini GM, Henrique T, De Marqui ABT, Tajara HH.
24 Proteômica aplicada ao estudo do câncer: revisão. *Revista da Associação*
25 *Médica Brasileira*. 2012;58(3):366–375.
- 26 44. Brötz-Oesterhelt H, Bandow JE, Labischinski H. Bacterial proteomics and its
27 role in antibacterial drug discovery. *Mass Spectrometry Reviews*.
28 2005;24(4):549–565.
- 29 45. Valledor L, Jorrín J. Back to the basics: maximizing the information obtained
30 by quantitative two-dimensional gel electrophoresis analyses by an
31 appropriate experimental design and statistical analyses. *Journal of*
32 *Proteomics*. 2011;74(1):1–18.
- 33 46. Yang CX, Chen L, Mou Q, Yang YW, Wang Y, Yin Z, et al. HSP90AA1
34 promotes viability and lactate production but inhibits hormone secretion of
35 porcine immature Sertoli cells. *Theriogenology*. 2022;194:64–74.
- 36 47. Rizzoto G, Shahat AM, Kastelic JP, Carlos J, Ferreira P, Da A, et al.
37 Atualização sobre o estresse térmico testicular. *Anais da VI Reunião Anual*
38 *da Associação Brasileira de Andrologia Animal*; 10–11 junho 2022;
39 Campinas, SP, Brasil. 2022. doi:10.21451/1809-3000.RBRA2022.016.

- 1 48. Li W, Zhang X, Shen J, Weng X. Effect of season on testicular development
2 and spermatogenesis in Hu sheep: insights from antioxidant indices,
3 oxylipins, and transcriptomics. *Animals*. 2025;15(19):2824.
- 4 49. Reolon HG, Abduch NG, Freitas AC, Silva RMO, Fragomeni BO, Lourenco D,
5 et al. Proteomic changes of the bovine blood plasma in response to heat
6 stress in a tropically adapted cattle breed. *Frontiers in Genetics*.
7 2024;15:1492735.